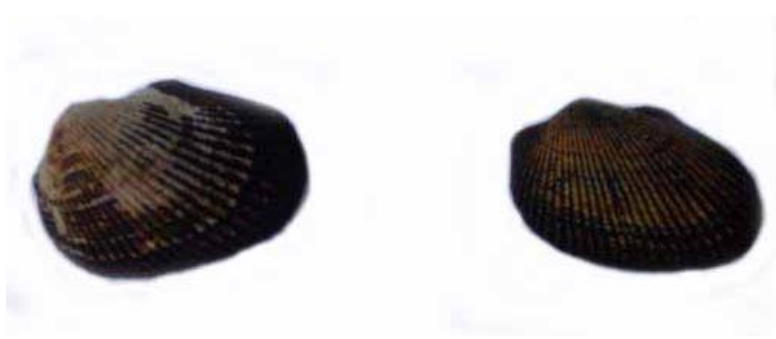




Aplicación de un RT - PCR para la identificación de Hepatitis A, en muestras de “conchas negras



Directora de Investigación

MSc. Agnés Saborío Coze

Investigadores

MSc. Agnés Saborío Coze

Lic. Erick Sandoval Palacios

Toma de muestras

Ing. Juan Ramón Bravo

Lic. Eufrecia Balladares

Edición y diseño

MSc. María José Almanza Abud

Lic. Raúl Lenín Rivas

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero de las personas americanas a través de la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Estados Unidos de Norteamérica (USAID) por medio del Centro de Recursos Costeros de la Universidad de Rhode Island, Centro Acuicultura del Pacífico y Recursos Costeros de la Universidad Hawaii Hilo como parte del programa Sustainable Coastal Communities and Ecosystems (SUCESS). Acuerdo cooperativo No. EPP-A-00-04-00014-00.

RESUMEN

Anadara tuberculosa es el molusco de mayor importancia comercial en Nicaragua. Estos moluscos se alimentan por filtración, pudiendo llegar a convertirse en portadores de contaminación biológica, por esta razón el CIDEA se propuso valorar si había un riesgo de contraer el Virus de la Hepatitis A., al consumir estos moluscos. Se recolectaron un total de 234 conchas negras provenientes de los Esteros Padre Ramos, Aserradores y El Realejo, estas muestras fueron procesadas por la técnica de biología molecular, Reverso Transcriptaza de la Reacción en Cadena de la Polimeraza (RT-PCR) obteniéndose un resultado positivo de una muestra proveniente del estero El Realejo, demostrándose que hay un riesgo de contraer este virus al consumir este tipo de molusco.

Palabra Clave:

Infección
Hepatitis A
Conchas Negras

Abstract.

Anadara tuberculosa is the most commercially important shellfish in Nicaragua. These molluscs are fed by filtration, and may become carriers of biological contamination, for this reason it was proposed CIDEA assess if there was a risk of contracting the virus of Hepatitis A., to consume these molluscs. We collected a total of 234 shells from the Esteros Padre Ramos Aserradores and Realejo, these samples were processed by the techniques of molecular biology, the Reverse Transcriptaza Reaction Chain of Polimeraza (RT-PCR) get a positive result of a sample collected in the estuary Realejo, demonstrating that there is a risk of contracting the virus through the consumption of this type of mollusc.

Ficha técnica:

Saborío, Agnés; Sandoval, Erick. 2008. Aplicación de un RT-PCR para la identificación de Hepatitis A, en muestras de conchas negras (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*). Chinandega-Nicaragua. 15 páginas.

INDICE DE CONTENIDO

	No. de páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1 Área de estudio	4
2.2 Obtención y almacenamiento de la muestra	5
2.3 Extracción del ARN viral	5
2.4 Amplificación del ARN extraído.....	5
III RESULTADOS	6
IV. DISCUSION DE RESULTADOS	8
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	9
VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	10

I. INTRODUCCIÓN

La especie *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*, conocida como Concha negra, es un molusco bivalvo que se encuentra frecuentemente en los ecosistemas de manglares y se distribuye desde la laguna de Ballenas en Baja California (Estados Unidos) hasta el sur de Tumbes, en el Perú (Keen 1971).

La zona de Aserradores, Padre Ramos y El Realejo en Nicaragua son las tres zonas de mayor extracción de la concha negra, aproximadamente el 90% de la extracción total del país se da en esos tres esteros (CIDEA, 2005).

En Nicaragua, alrededor de 2,000 personas promedio están dedicadas a la extracción artesanal de conchas negras, distribuidas en doce playas. La extracción promedio por persona es de siete docenas por día, la extracción se realiza 22 días por mes y en periodos de 7 a 10 meses, especialmente durante el verano. Las extracciones anuales calculadas de las dos especies conocidas como conchas negras es de 1, 088,680 y 1, 368,780 respectivamente (CIDEA, 2005).

Las conchas negras habitan principalmente en las raíces del mangle rojo *Rhizophora spp.* este molusco respira y se alimenta por medio de un mecanismo de filtración, como respuesta a su condición de animal sedentario. La actividad de filtración se da a través de los sifones o branquias con que cuentan las especies de bivalvos. Estas estructuras permiten que el animal promueva una corriente del agua que lo rodea y que esta sea inhalada permitiéndole atrapar o concentrar las partículas alimenticias presentes en ella (Santelmo et al. 1992). En promedio las conchas negras filtran diariamente 50 litros de agua (Fernández et al. 1977, Martínez et al 1991), convirtiéndose de esta manera en acumuladores o potenciadores de bacterias, virus, y residuos químicos (Gerba y Goyal 1978, Murphy et al 1979, McNeely 1979, Rao et al 1984, Wanke y Guerrant 1987).

La determinación de los coliformes fecales ha sido la prueba que se ha utilizado para evaluar el grado de contaminación fecal de las aguas y de los bivalvos que viven en ellas (Fernández 1977, McNeely 1979) Sin embargo algunos autores han demostrado que los virus entéricos (virus hepatitis A), por su resistencia a pH ácidos sobreviven por tiempos mas largos que los coliformes fecales, haciendo importante la detección directa de estos agentes (Metcalf 1978, Richard et al, 1982, Le Guyader et al, 1993, Gaswami et al 1993).

El virus de la hepatitis A, pertenece a la familia *Picornaviridae* es un virus pequeño, esférico y carente de envoltura, el genoma del VHA está formado por una única cadena de RNA lineal de sentido positivo, debido a sus características estructurales es un virus muy estable y resistente a los agentes físicos y químicos lo que explica su gran facilidad para transmitirse a través del agua y de alimentos en condiciones teóricamente adversas para los virus.

Cuando los virus de la hepatitis A, son ingeridos por las conchas negras, son atrapados en la mucosa de las agallas y son transportados por movimientos ciliares a la boca y luego al estómago. Los virus pueden ser digeridos por enzimas, y son transportados protegidos por macrófagos hacia la musculatura del molusco bivalvo o pueden ser eliminados por las heces (Campos 1990, Martínez et al 1991) los virus de animales de sangre caliente no se replican en los moluscos bivalvos. De esta manera los bivalvos actúan como concentradores de virus, aumentando así la probabilidad de infección cuando son consumidos crudos o mal cocidos.

Aun no se conoce la incidencia de los brotes de gastroenteritis víricas transmitidas por los alimentos, pero algunos autores creen que son bastante comunes (FAO 1997). La transmisión de enfermedades virales al hombre por el consumo de moluscos bivalvos se conoce desde los años 50 (Roos 1956).

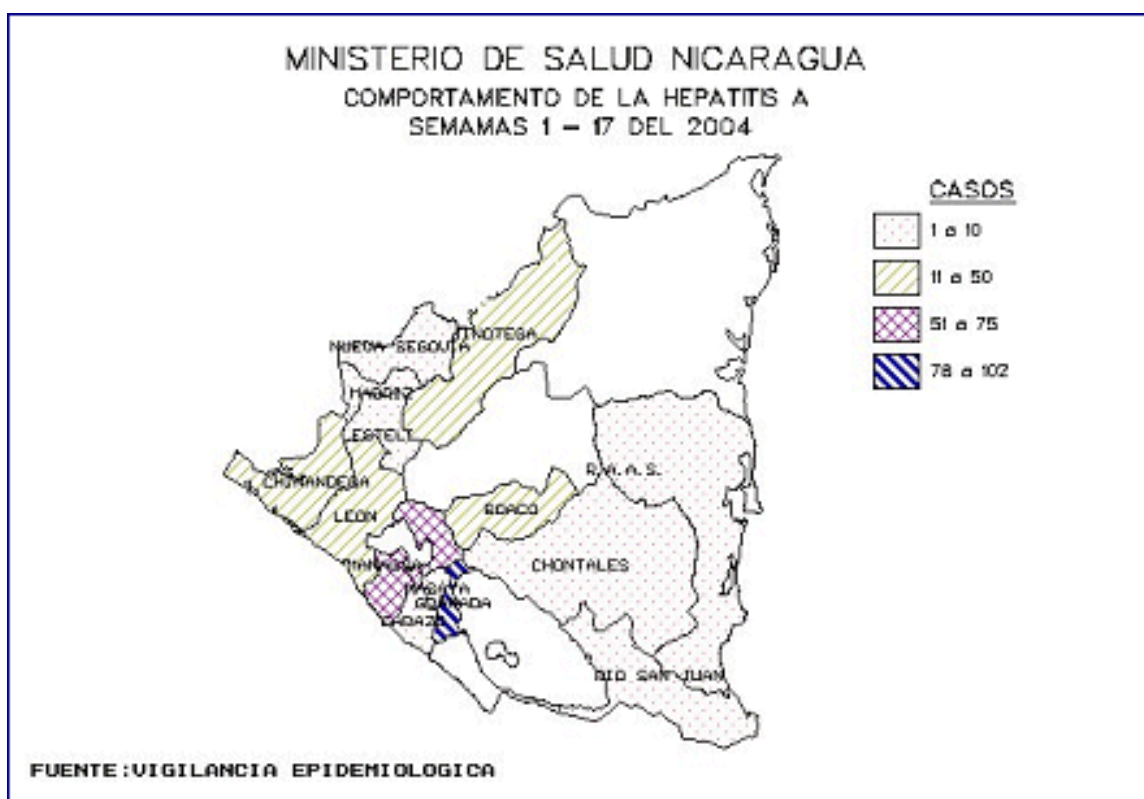
Los virus son inertes fuera de la célula viva del hospedero, pero pueden sobrevivir, esto significa que independientemente del tiempo, la temperatura u otras condiciones físicas, los virus no se multiplican en el agua o en los alimentos. Su presencia en los productos pesqueros es simplemente el resultado de la contaminación. La dosis infectante de los virus necesaria para causar enfermedades transmitidas por los alimentos es probablemente mucho más pequeña que la de las bacterias (Cliver 1988). Los virus se encuentran en grandes cantidades en las heces de las personas infectadas. La contaminación fecal directa o indirecta es la fuente más común de contaminación de los alimentos. Los moluscos bivalvos encabezan la lista de vehículos alimentarios en los brotes de enfermedades virales (FAO 1997, Kligen y Cole 1991).

Según Gerba (1988), la supervivencia de los virus en el ambiente y en los alimentos depende de distintos factores, entre los que se encuentran: la temperatura, la salinidad, la radiación solar y la presencia de sólidos orgánicos, así los virus entéricos son capaces de sobrevivir durante varios meses en el agua de mar a temperaturas $<10^{\circ}\text{C}$, este periodo es mucho más largo que, p. ej., el de las bacterias coliformes (Melnick y Gerba 1980). Por lo tanto no existe ninguna correlación o hay poca, entre la presencia de los virus y las bacterias indicadoras de contaminación fecal que se utilizan normalmente. Todos los virus entéricos son también resistentes al pH ácido, a las enzimas proteolíticas y a las sales biliares del intestino. El virus de la Hepatitis A es uno de los virus más estables al calor, tiene un periodo de inactivación de 10 minutos a 60°C (Eyles, 1989).

En Nicaragua, la Hepatitis es una enfermedad de notificación obligatoria, la cual se diagnostica principalmente mediante datos clínicos, debido al déficit de reactivos en el laboratorio de referencia del MINSA. La hepatitis aguda es una enfermedad frecuente en nuestro país, sobre todo la hepatitis A, la cual se presenta en algunas ocasiones en forma de brotes epidémicos.

Hasta la semana epidemiológica No. 17 se han reportado a través del Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional del Ministerio de Salud un total de 285 casos sospechosos de hepatitis, de los cuales el 94% (267), fueron diagnosticados con sospecha clínica de hepatitis A, lo que representa una tasa de morbilidad de $0,47 \times 10,000$ hab. Al comparar las estadísticas con igual periodo del año 2003, se observa una leve reducción del 9% (26 casos menos), en relación al total de casos notificados (308), correspondiendo en este año el 95% (293) a hepatitis A para una tasa de morbilidad de $0,53 \times 10,000$ habitantes. La curva epidémica de casos sospechosos en el presente año a partir de la semana epidemiológica número 2, presenta un comportamiento similar a la ocurrida en el año 2003.

Figura 1: Mapa de distribución de la Hepatitis A en Nicaragua



Es por todas estas razones antes expresadas que el diagnóstico del Virus de la Hepatitis A (VHA) se torna muy importante en las zonas de recolecta y cultivo de moluscos. Ya que todos los años hay incremento de casos clínicos de VHA en el orden de 11 a 50 casos por año en esas zonas y de 51 a 75 casos en el Departamento de Managua, donde se aglutina la mayor población del país y es la zona del país de mayor consumo de conchas negras.

El objetivo de este estudio es conocer si el consumo de conchas negras es un riesgo de infección con el virus de la Hepatitis A en Nicaragua.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El área de recolección de las especies de conchas negras fue en tres esteros ubicados en el nor occidente del país, por ser la zona de mayor extracción de dicho recurso. En la figura 2 y 3, se presentan los sitios en donde se hizo la recolección de las especies.

Figura 2: Mapa de Nicaragua con la ubicación del área de estudio

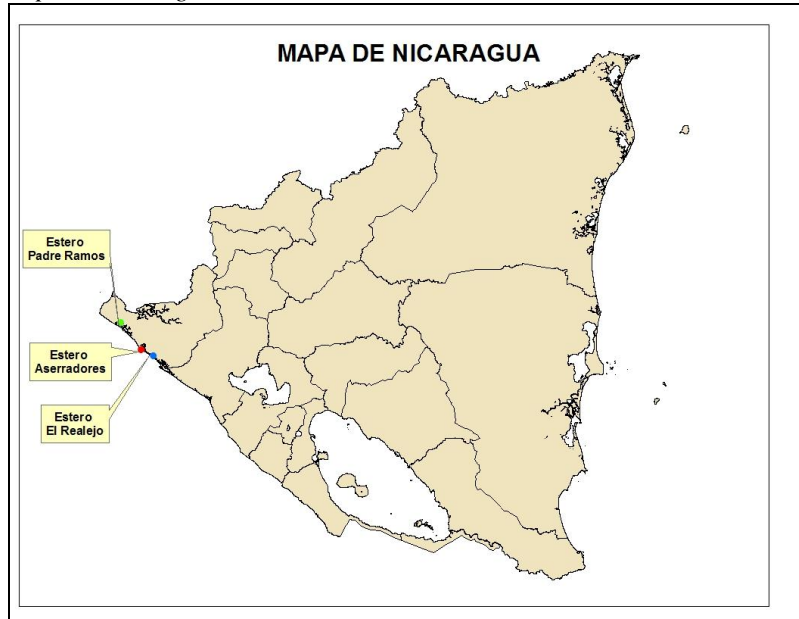
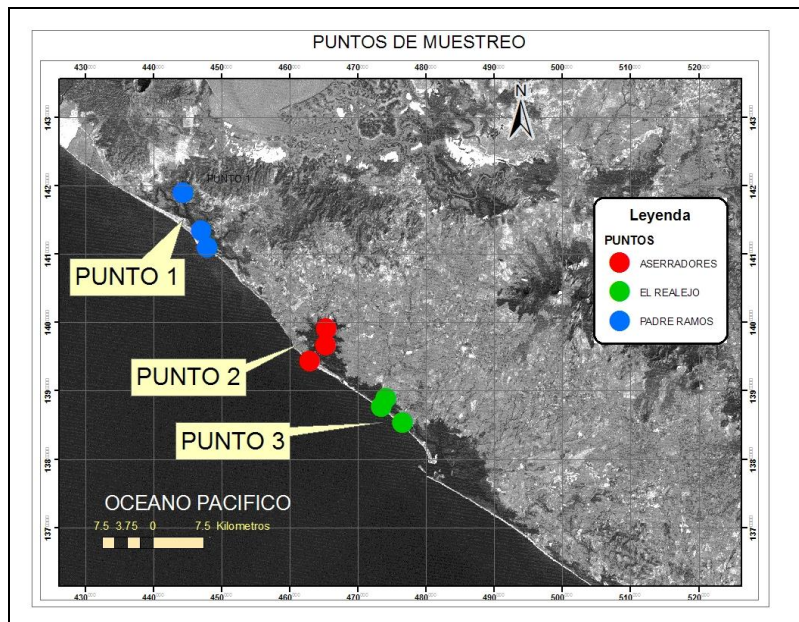


Figura 3: Mapa de los esteros en donde se hizo la recolección de las especies



2.2 Obtención y almacenamiento de la muestra

La recolección de las muestras se realizó mensualmente desde Octubre del 2006 hasta Septiembre 2007. Las muestras fueron obtenidas en los centros de acopio de conchas negras, de cada uno de los esteros seleccionados. En estos centros de acopio se tomaron 10 conchas al azar y fueron transportadas al laboratorio de microbiología del CIDEA–UCA en un termo con hielo.

El laboratorio CIDEA UCA tiene acreditado analitos con las norma NTON equivalente a la ISO 17025. En el laboratorio estas muestras fueron codificadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para el análisis del virus de la hepatitis A se tomaron 10 muestras de conchas negras por estero; estas fueron divididas en tres submuestras que fueron analizadas por separado.

2.3 Extracción del ARN viral

Los moluscos bivalvos fueron lavados con agua de grifo, y fueron abiertos con un cuchillo estéril, el contenido de 3 conchas negras fue vertido en un beaker estéril y se homogenizó.

De este homogenizado, se tomó 25 mg de muestra y se colocó en un vial estéril de 1.5ml, que contenía previamente 300 μl de solución de lisis RNAGents del kit de extracción (RNAGents Total RNA Isolation System Promega). Se homogenizó y se le adicionó 30 μl de acetato de sodio 2M, se agitó en un vortex por 2 minutos.

Se adicionaron 300 μl de fenol-cloroformo-isoamil se agitó nuevamente en el vortex por 2 minutos y se colocó en hielo por 15 minutos, se centrifugó a 12 mil rpm, por un período de tiempo de 20 minutos a 4°C . Luego, se removió la fase acuosa a un nuevo vial donde se le adicionó igual volumen de Isopropanol, esto se dejó por 30 minutos a -20°C , se centrifugó a 10 mil rpm, por 10 minutos a 4°C , se descartó el Isopropanol y se adicionó 1ml de etanol al 75%, se centrifugó por 10 minutos a 12 mil rpm, a una temperatura de 4°C , se descartó el etanol y se dejó secar el pellet, reconstituyéndose con 250 μl de agua libre de nucleasa.

2.4 Amplificación del ARN extraído

Se utilizó el HAVGene Detection KIT, este kit cuenta con 2 pares distintos de primers (cebadores) en la primera reacción se obtiene un fragmento de 780pb y en la segunda reacción se obtiene un fragmento de 311pb, este Kit tiene la capacidad de detectar entre 10 y 100 partículas virales por ml.

En la primera reacción se utilizaron 45 μl del buffer Rx-Mix-R1, 0.5U de Taq polimeraza, y 5U de enzima Reversotranscriptasa mas 5 μl del ARN extraído. Esto se amplificó en el termociclador de la siguiente manera Reversotranscripción 42°C por 30 minutos, Desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos y 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

En la segunda reacción o el nested PCR, se tomaron 45µl del buffer Rx-Mix-R2 y 0.5U de Taq polimeraza mas 5µl del producto de la primera amplificación. Esto, se amplificó en el termociclador de la siguiente manera: Desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos y 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 5 minutos.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5%, mas bromuro de ethidio en una corriente eléctrica de 100w por 15 minutos.

III RESULTADOS

Se procesaron en total 78 muestras combinadas de conchas negras, (equivale a 234 conchas negras), y 12 controles totalizando 90 muestras.

Del total de muestras combinadas, solamente una salió positiva a VHA (ver tabla 1). Esta muestra positiva fue recolectada en el mes de marzo del 2007, en el estero El Realejo del departamento de Chinandega.

La muestra DM-07-51 presentó 2 bandas de cDNA, la primera fue de 780 pares de base, y la segunda fue de 311 pares de base (ver línea 10 en la figura 4) esta doble banda se debe a que este RT-PCR amplifica dos veces el mismo gen, esto le da al método más sensibilidad. En la misma figura 4 se observan los controles positivos en las líneas 11 y 12, estos controles tienen peso molecular de 780 y 311pb.

Tabla 1: Resultados de las muestras de conchas negras procesadas en el Laboratorio

Muestra	Resultado	Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
DM-06-172	Neg	DM-06-198	Neg	DM-07-29	Neg
DM-06-172	Neg	DM-06-198	Neg	DM-07-29	Neg
DM-06-172	Neg	DM-06-198	Neg	DM-07-29	Neg
DM-06-173	Neg	DM-06-199	Neg	DM-07-30	Neg
DM-06-173	Neg	DM-06-199	Neg	DM-07-30	Neg
DM-06-173	Neg	DM-06-199	Neg	DM-07-30	Neg
DM-06-191	Neg	DM-07-09	Neg	DM-07-39	Neg
DM-06-191	Neg	DM-07-09	Neg	DM-07-39	Neg
DM-06-191	Neg	DM-07-09	Neg	DM-07-39	Neg
DM-06-195	Neg	DM-07-10	Neg	DM-07-51	Pos
DM-06-195	Neg	DM-07-10	Neg	DM-07-51	Neg
DM-06-195	Neg	DM-07-10	Neg	DM-07-51	Neg
DM-06-196	Neg	DM-07-12	Neg	DM-07-52	Neg
DM-06-196	Neg	DM-07-12	Neg	DM-07-52	Neg
DM-06-196	Neg	DM-07-12	Neg	DM-07-52	Neg

Tabla 2: Resultados de las muestras de conchas negras procesadas

Muestra	Resultado	Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
DM-07-66	Neg	DM-07-90	Neg	DM-07-116	Neg
DM-07-66	Neg	DM-07-90	Neg	DM-07-116	Neg
DM-07-66	Neg	DM-07-90	Neg	DM-07-116	Neg
DM-07-67	Neg	DM-07-92	Neg		
DM-07-67	Neg	DM-07-92	Neg		
DM-07-67	Neg	DM-07-92	Neg		
DM-07-82	Neg	DM-07-102	Neg		
DM-07-82	Neg	DM-07-102	Neg		
DM-07-82	Neg	DM-07-102	Neg		
DM-07-84	Neg	DM-07-111	Neg		
DM-07-84	Neg	DM-07-111	Neg		
DM-07-84	Neg	DM-07-111	Neg		
DM-07-85	Neg	DM-07-112	Neg		
DM-07-85	Neg	DM-07-112	Neg		
DM-07-85	Neg	DM-07-112	Neg		

Figura 4: Gel de agarosa con el cDNA de Hepatitis A de la muestra positiva DM-07-51



IV. DISCUSION DE RESULTADOS

La muestra DM-07-51, es la muestra positiva de VHA, esta muestra fue recolectada en El Realejo durante el mes de marzo del 2007, (época de verano), siendo esta la temporada en que más se consume la concha negra en Nicaragua.

Este resultado positivo demuestra que hay un riesgo epidemiológico, y de inocuidad alimentaria, ya que de éstas conchas son las que se consumen en las distintas ciudades del país, en mercados, supermercados, restaurantes, hoteles, donde turistas nacionales y extranjeros consumen este producto.

La contaminación de estos moluscos con el virus de la hepatitis A, es consecuencia de contaminación de las aguas con excretas de seres humanos infectados. Una persona infectada con Hepatitis A descarta de 10¹¹-10¹² partículas virales/g de heces (Casas, 2007).

Estudios previos del CIDEA (Sandoval y Saborío, 2007) muestran la fuerte contaminación por excretas humanas y animales que existe en dicho Estero donde se identificaron a los coliformes fecales como los indicadores de la calidad bacteriológica. La contaminación de los esteros es consecuencia de falta de tratamiento de las aguas residuales y de la mala construcción y/o ubicación de las letrinas de las comunidades que habitan alrededor de los esteros.

Algunos autores han demostrado que los virus entéricos, por su resistencia sobreviven por mas tiempos que los coliformes fecales, (Metcalf 1978, Richard et al, 1982, Le Guyader et al, 1993, Gaswami et al 1993), por lo que no es suficiente utilizar los índices de infección por coliformes fecales para determinar la inocuidad del producto.

La dosis mínima infectante de los virus es muy baja por lo que la presencia de un pequeño número de partículas virales es un peligro potencial para la salud. En este sentido hay que tener en cuenta que los virus entéricos no se multiplican ni en el agua ni en el interior de las conchas negras, pero dentro de ellas permanecen mucho más estables que en el ambiente al estar protegidos frente a factores ambientales que pueden influir en su viabilidad.

Otros autores han demostrado que los sistemas de depuración de *E. coli* (coliformes fecales) en los moluscos no tienen ningún efecto sobre los virus que están presentes en los moluscos, y que la presencia de altas concentraciones de coliformes fecales no es indicador de una posible presencia viral. (Formiga et al 2002, Romalde 2002).

El porcentaje de muestras positivas en este estudio fue del 0.78% muy bajo, pero el objetivo principal de este estudio era demostrar si existía riesgo de transmisión de Virus de la Hepatitis A, a través de las conchas negras en Nicaragua.

Otros autores han realizado estudios de presencia de la Hepatitis A, en moluscos bivalvos en otros países, encontrándose muestras positivas, (Formiga et al 2002).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe el riesgo de contaminación con el virus de la Hepatitis A, al consumir conchas negras crudas.

La contaminación de las conchas negras es consecuencia de la falta de tratamiento de las aguas negras de las comunidades aledañas a los esteros.

Se recomienda, establecer programas de monitoreo de la calidad bacteriológica y viral de las conchas negras, ya que actualmente no existe ningún control de la calidad microbiológica o viral, por parte de las autoridades de gobierno. También es recomendable hacer monitoreos de la calidad de las aguas de donde se extraen los moluscos.

Investigar el período requerido de depuración de la concha negra a fin de establecer sistemas de depuración para las conchas que se extraigan de zonas contaminadas con coliformes fecales. Identificar el producto que ha sido depurado a fin de que los intermediarios o consumidores puedan conocer la calidad del producto.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Casas Nerea. 2007. *Presencia de virus entéricos patógenos en moluscos bivalvos*. AZTI-Tecnalia
<http://www.alimentatec.com/muestrapaginas.asp?nodo1=43&nodo2=0&idcontenido=605&content=17>
2. Cantelmo, F. & T. carter. 1992. *A physiological indicator of hard clam commercial depuration*. MTS Journal 23:9-13
3. Cliver, D.O. 1988. *Virus transmission via foods*. Food technol. 42: 241-248.
4. CIDEA, 2005. *Estudio de mercado de moluscos, ostras, mejillones y almejas en Centroamérica y del mercado interno de conchas negras en Nicaragua*.
5. Eyles, M.J. 1989 Viruses. *In Foodborne Microorganisms of public Health Sigficance*. 4th ed: Buckle, K.A. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group. P.O. Box 277, Pymble NSW 2073, Australia.
6. Fernandez, B. & T. Brunker. 1977. *Estudio bacteriológico de bivalvos del golfo de Nicoya, Costa Rica* (I parte). Rev Biol. Trop. 25:101-107.
7. Formiga – Cruz, G. Tofiño-Quesada, S. Bofill-Mas, D.N. Lees, K. Henshilwood, A.K. Allard, A.C. Conde-Hansson, B.E. Herroth, A.V. Vantarakis, A. Tsibouxi, M. Papapertropoulou M.D Furones, and R. Girones. *Distribution of Human Virus Contamination in Shellfish from Diferrent Growing Areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom*. *Appli. Environ. Microbiology*. Dec 2002 p. 5990-5998.
8. 2073, Australia.
9. Gaswami B.B., G. Siege & T. A. Celula. 1993. *Detection of hepatitis A, in Mercenia mercenaria by coupled reverse transcription and polymerase using reaction*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2765-2770.
10. Gerba, C. P. and S. M. Goyal 1978. *Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: A rewiev*. J. Food protects. 41, 742
11. Gerba, C.P. 1988. *Viral diseases transmission by seafoods*. Food technol. 42, 99-102
12. Keen, A. 1971. *Sea shells of tropical best America*. 2 ed. California. Stanford University Press.
13. Kligen, M.B. and M.T. Cole 1991. *Viruses in seafood. In Microbiology of Marine Food Products* Eds: D.R ward and C. Hackney. Van Nostrand Reinhold 197-209.

14. Le Guyader F., V. Apaire-Marchais, J. Brillej & S. Billaudel. 1993. *Use of genetic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination*. Appl. Environ. Microbiol. 59:3963-3968.
15. Martínez E., F. Egea, D: Castro, M. Morinigo, P. Romero & J. Barrigo. 1991. *Accumulation and depuration of pathogenic microorganisms by the mollusk *Chlamelea gallina*, Under controlled laboratory conditions* J. Food protection. 54:612-618
16. Melnick, J.C. and C.P. Gerba 1980. *The ecology of enteroviruses in natural waters*. CRC Crit. Rev. Environ. 10, 65
17. Metcalf T.G., E. Moulton & D. Eckerson 1980. *Improved Method and test Strategy for Recovery of Enteric viruses from shellfish*. Appl. Environ. Microbiol. 39: 141-152
18. Murphy A.M., G.S. Grohmann, P.J. Christopher, W.A. Lopez, G.R Davey & R.H Millsom. 1979 *An Australian Wide outbreak of gastroenteritis from oyster caused by norkwalk virus*. Med. J. aust. 2:329-333
19. McNeely R.N. V.P. Neimanis & L. Dwyer. 1979 *Water Quality Sourcebook. A guide to Water Quality Parameters. Inland waters directorate*. Water Quality Branch, Ottawa, Canada p.17-57
20. Rao V.C, K.M. Seidal, S.M. Goyal, T.G. Metcalf & J.L. Melnick 1984. *Isolation of enteroviruses from water suspended solids and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorb into sediments*. Appl. Environ. Microbiol. 48:404-409
21. Richard G.P., D.L. Goldmintz, D.L. Green & J.A. Babinchak 1982. *Rapid Method for Extraction and concentration of poliovirus from Oyster Tissues* J. Virol. Meth. 5:285-291.
22. Roos, R. 1956. *Hepatitis epidemic conveyed by oysters*. Svenska Lakartidningen 53:989.
23. Sandoval, Erick; Saborío, Agnés. 2007. *Análisis de calidad microbiológica del agua en los sitios de recolección de conchas negras (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*)*. En el Dpto. de Chinandega – Nicaragua.
24. Wanke C.A. & R.L. Guerrant. 1987. *Viral Hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water*. Inf. Dis. Clin. N. 1:649-664