

Estudis anteriors a la present tesi han avaluat la contaminació vírica en mol·luscs bivalves i la seva relació amb els diferents microorganismes models proposats; no obstant, aquests estudis s'han dut a terme utilitzant una gran varietat de metodologies i centrant-se en zones de producció molt concretes. En el marc de la Unió Europea, mancava un estudi comparatiu de zones de producció situades en zones geogràficament molt diverses i per tant, molt diferents a tots nivells, però que han de complir certes normatives establertes per la Unió Europea.

Metodologies per a la detecció de virus humans en mol·luscs bivalves.

S'ha validat i estandarditzat un mètode de detecció molecular de patògens vírics humans en mol·luscs bivalves en tres laboratoris diferents. Aquests laboratoris van presentar nivells d'eficiència similars quan analitzaren suspensions estàndard de virus. En analitzar mostres contaminades de forma natural, s'observà certa heterogeneïtat que, en part, es devia a la variabilitat inherent de les mateixes mostres i en part, als baixos nivells de virus, propers al límit de detecció de la tècnica. No obstant, tampoc es descartaren variacions inter- i intra-laboratoris.

Aquest mètode de detecció, el qual ha estat aplicat pels laboratoris espanyol, grec i suec, ha estat desenvolupat a partir de procediments prèviament descrits (Henshilwood i col., 1998; Pina i col., 1998b; Muniain-Mujika i col., 2000) i fou seleccionat després de comparar-lo amb altres mètodes pel que fa a sensibilitat i facilitat d'aplicació. Així, el mètode triat és molt sensible i, en comparació al protocol basat en l'extracció directa dels àcids nucleics, és de més fàcil aplicació al laboratori. De fet, ha estat aplicat per altres laboratoris no participants en el present estudi (Casas i col., 2002; Burkhardt, comunicació personal). Els resultats obtinguts per PCR foren confirmats per assaigs independents i per seqüenciació del genomes vírics amplificats. El procediment seleccionat es basa en l'extracció i homogenització de l'hepatopàncreas del mol·lusc, l'elució de les partícules víriques amb tampó glicina amb pH bàsic i ultracentrifugació. És un mètode que ha demostrat ser efectiu en quant a l'eliminació de possibles inhibidors de la retrotranscripció presents en els extractes de mol·luscs. Els estudis de sensibilitat realitzats mostren un límit de detecció de 5 a 50

partícules víriques per poliovirus 1 per gram de teixit de bivalve, una de les sensibilitats més altes descrites fins al moment (Shieh i col., 1999; Suñén i Sobsey, 1999; Legeay i col., 2000; Casas i Suñén., 2001; Mullendore i col., 2001).

D'altra banda, cal tenir en compte que la utilització de tècniques de PCR en la rutina dels laboratoris d'anàlisi d'aliments sovint es veu limitada pel seu cost i per la disponibilitat d'un volum adequat de mostra. És per això que vam desenvolupar una PCR multiplex que ens permetés detectar a l'hora adenovirus humans, enterovirus i virus de l'hepatitis A sense perdre l'elevada sensibilitat que hem assolit amb les PCR clàssiques. Els resultats obtinguts mostren que la PCR multiplex desenvolupada, tot i assolir aquests nivells de sensibilitat quan els tres virus es troben en concentracions semblants, presenta un funcionament òptim quan les tres espècies virals es troben en uns nivells que no difereixen més d'un logaritme. Malgrat aquesta darrera observació, la proporció entre els tres virus entèrics detectats separatament per PCR clàssiques es manté en utilitzar la PCR multiplex desenvolupada.

Sobre la distribució de virus humans en mol·luscs bivalves.

Durant un any i mig i per primer cop, s'ha estudiat de forma simultània la distribució de patògens vírics humans en mol·luscs bivalves a diferents àrees de producció de la Unió Europea. Així doncs, s'ha pogut estudiar l'epidemiologia molecular dels adenovirus humans, enterovirus, virus de l'hepatitis A i norovirus a Espanya, Grècia, Regne Unit i Suècia.

L'hepatitis A es considera endèmica al Mediterrani i, tot i que la prevalença dels anticossos contra VHA ha disminuït a la població (Dal-Ré i col., 2000), encara es detecta amb una certa freqüència en les aigües residuals d'aquestes regions (Pina i col., 2001b). D'altra banda, freqüentment es descriuen brots de gastroenteritis causats per norovirus i associats al consum de marisc (Lees, 2000). Aquest dos virus, NV i VHA, que es troben entre els virus de major importància epidemiològica associats al consum de marisc, han estat aïllats en mol·luscs bivalves destinats al consum humà immediat (p.e., marisc procedent de zones tipus A o sotmesos a un procés de depuració). Cal afegir que s'ha aïllat VHA a Espanya, Grècia

i Regne Unit, essent aquest el primer cop que es descriu una soca de VHA en bivalves en aquest darrer país. També és important assenyalar que els norovirus són l'únic grup de virus entèrics amb un patró estacional al llarg del període de mostreig, amb nivells més baixos en els mesos més càlids. L'aparent patró estacional ve reforçat per la relació estadísticament significativa dels norovirus amb la temperatura. Aquests resultats confirmen observacions fetes per altres autors (Miossec i col. 2000) sobre l'estacionalitat tant en la detecció de norovirus en l'ambient com en els pics de brots causats per norovirus. Miossec i col. sostenen que l'estacionalitat observada en els pics de norovirus en mol·luscs bivalves del Mediterrani podria tenir relació amb les fortes pluges que es donen en els períodes hivernals. En els seus estudis, demostren que els perfils de contaminació vírica en mol·luscs bivalves presenten similituds amb les variacions de la incidència de diarrees agudes en la població i la importància de les pluges.

Pel que fa els adenovirus humans i els enterovirus, els estudis epidemiològics es veuen limitats pel fet que les persones infectades sovint actuen com a portadors asimptomàtics. Pot donar-se el cas que la malaltia no sigui evident fins que s'infecti una altra persona, fet que pot ocórrer lluny de la font original. Per tant, calen més estudis per a determinar la relació entre els nivells de contaminació vírica detectats per PCR en bivalves i el potencial efecte patogènic després del seu consum. Els resultats del nostre estudi mostren que els adenovirus humans són els virus més prevalents en totes i cadascuna de les àrees estudiades. Cal assenyalar que el 89% de les mostres positives per a qualsevol dels virus estudiats, són també positives per la presència d'adenovirus. En realitzar una anàlisi estadística de dependència (test de Fischer) entre els diferents virus, els adenovirus humans apareixen com a l'únic grup de virus entèric amb un relació estadísticament significativa amb els altres virus humans analitzats. Aquests fets, junt amb l'elevada resistència a diferents processos d'inactivació (Gerba i col., 2003), fan que els adenovirus humans puguin ser útils com a índex molecular de contaminació vírica d'origen humà.

Indicadors de contaminació vírica en mol·luscs bivalves.

El present estudi és el primer del qual tenim

coneixement en què s'ha avaluat l'eficàcia predictiva de diferents microorganismes indicadors en diverses zones de cultiu de marisc europees. A l'analitzar la presència d'indicadors en zones climàticament i geogràficament molt diverses, intentem esbrinar si hi ha o no un únic patró en la relació indicador-patogen, ja que pot ser que no existeixi un model universal vàlid per a tota Europa, ni molt menys per a tot el món.

Mentre que els virus humans s'han estudiat a partir de la dissecció de l'hepatopàncreas per tal d'obtenir la major sensibilitat, els diferents microorganismes indicadors s'han analitzat a partir del conjunt de teixits tous i líquid intervalvar, un procés que resulta de fàcil aplicació en la rutina dels laboratoris d'anàlisi d'aliments. Aquesta diferència entre ambdós procediments pot tenir certa influència a l'hora de comparar els resultats obtinguts. No obstant, cal indicar que mentre que s'analitzaren 3 grams d'animal pels indicadors, l'equivalent a 1 o 2 grams d'animal eren analitzats per la presència de virus humans.

Els tractaments de depuració avaluats a Espanya i Regne Unit no redueixen de forma aparent ni els nivells de fags F-ARN, ni els dels colifags somàtics, ni els dels fags de *Bact. fragilis*, ni molt menys els de virus humans, tot i que resulten eficaços per a reduir els nivells d'*E. coli*. Per tant, queda clar que els estàndards establerts per la legislació actual, basats en *E. coli*, per a mol·luscs bivalves sotmesos a un procés de purificació no són suficients, observació que es veu reforçada pels nombrosos casos de brots vírics associats al consum de marisc depurat (Lees, 2000). Així doncs, queda patent la necessitat d'avaluar de nou els criteris establerts per la legislació en referència als processos de depuració tant pel que fa a la durada d'aquests com a microorganismes amb una cinètica d'eliminació semblant a les dels patògens vírics.

Les anàlisis inicials mostraren un cert grau de relació entre tots els possibles indicadors i la contaminació per virus humans, però cal tenir en compte que els resultats obtinguts presenten una elevada variabilitat, sobretot, pel que fa a les zones A, A/B i B. Les associacions més fortes i amb menys variabilitat es donen a les zones més contaminades, les quals corresponen a les zones B del nord d'Europa. En zones menys

contaminades (zones A i B a Espanya), en canvi, la correlació dels diferents indicadors de contaminació fecal amb la presència de virus humans és menys robusta.

Quan ens centrem en certes zones de producció, en concret, les situades al Delta de l'Ebre, veiem que s'hi reproduïen les característiques de distribució d'AdH, EV, VHA i NV més amunt descrites. Aquestes zones de producció presentaren durant tot el període d'estudi nivells d'*E. coli* molt baixos i consistents amb la seva classificació segons la normativa actual. Al comparar les nostres dades amb dades prèvies obtingudes pel Centre d'Aqüicultura de Sant Carles de la Ràpita, veiem que es tracta de zones on els nivells d'*E. coli* s'han mantingut estables durant més de quatre anys. És important destacar que, malgrat que en aquestes àrees els nivells d'*E. coli* no presenten cap relació amb la presència dels virus humans estudiats, en la zona A, amb uns nivells d'*E. coli* sovint per sota del límit de detecció, la proporció de virus humans és marcadament inferior a la de la zona B.

Entre els grups de bacteriòfags estudiats, el fags F-ARN foren els que presentaren la relació estadísticament més significativa amb els virus humans, mostrant una capacitat predictiva forta pels norovirus, però dèbil per adenovirus, enterovirus i virus de l'hepatitis A. En general, els colifags somàtics foren els més detectats en totes les àrees estudiades, i els fags que infecten *Bact. fragilis* els que es detectaren amb una freqüència menor. La distribució dels fags F-ARN va mostrar un patró estacional, amb els nivells alts registrats durant els mesos més freds. Aquesta tendència estacional, com hem dit abans, es dona també en els norovirus, però no en els altres virus humans estudiats.

Del model de regressió logística aplicat, es desprèn que els fags F-ARN només presenten una relació estadísticament significativa quan s'analitzen els 468 resultats a l'hora. No obstant, la utilitat d'aquest paràmetre no queda clara en l'avaluació de la contaminació per virus humans de mol·luscs bivalves procedents de les zones A i B netes, especialment les localitzades al sud d'Europa. En aquestes àrees, la majoria de mostres foren negatives

pels fags F-ARN i, per tant, aquest paràmetre no donaria cap mena d'informació complementària sobre la presència de virus patògens en comparació als nivells d'*E. coli*. Malgrat tot, el mètode de quantificació dels fags F-ARN és un procediment estandarditzat i implementat amb èxit tant en els laboratoris que han participat en aquest estudi com en altres arreu del món. L'enumeració dels fags F-ARN podria ser útil com a paràmetre complementari a *E. coli* en certs casos, com per exemple, norovirus al Regne Unit.

Brion i col. (2003) han analitzat la matriu de dades generada en aquest estudi pel sistema de xarxes neurals per tal de determinar si és possible predir la presència o absència de norovirus en mol·luscs bivalves (veure Annex I per a més informació sobre xarxes neurals). La importància relativa de cadascuna de les variables del model i la seva capacitat predictiva es comparen amb les obtingudes amb els models de regressió logística aplicats en el capítol II d'aquesta tesi. El model ensinistrat de xarxa neural identifica el 73,9% de mostres positives per NV, resultat comparable amb el millor model de regressió logística (on la temperatura no és una variable classificatòria), que és del 74,3% per NVI i del 67,4% per NVII. El model de xarxa neural és superior pel que fa la classificació absència de NV (97,2% contra 75,6% per NVI i 75,8% per NVII) i per la taxa de classificació correcta general (93,4% contra 75,5% per NVI i 75,1% per NVII). Ambdós tipus d'anàlisi troben la variable País significativa, fet d'esperar degut a les diferències entre els nivells d'indicadors i certs fenòmens climàtics ocorreguts durant el mostreig. En resum, tant en l'anàlisi per regressió logística com per xarxes neurals artificials s'observa una clara dependència de cara a la variable País, fet que suggereix l'existència de patrons individuals en relació al clima, utilització del sòl i malalties endèmiques.

El fet que no hi hagi una correlació clara entre cap grup dels fags proposats com a indicadors i els virus humans estudiats podria fer necessària la detecció molecular de patògens vírics específics (NV i VHA) o dels adenovirus humans, els quals han mostrat una relació estadísticament significativa amb la presència dels altres virus.

