



Detección y caracterización de virus patógenos emergentes de interés general en seguridad alimentaria

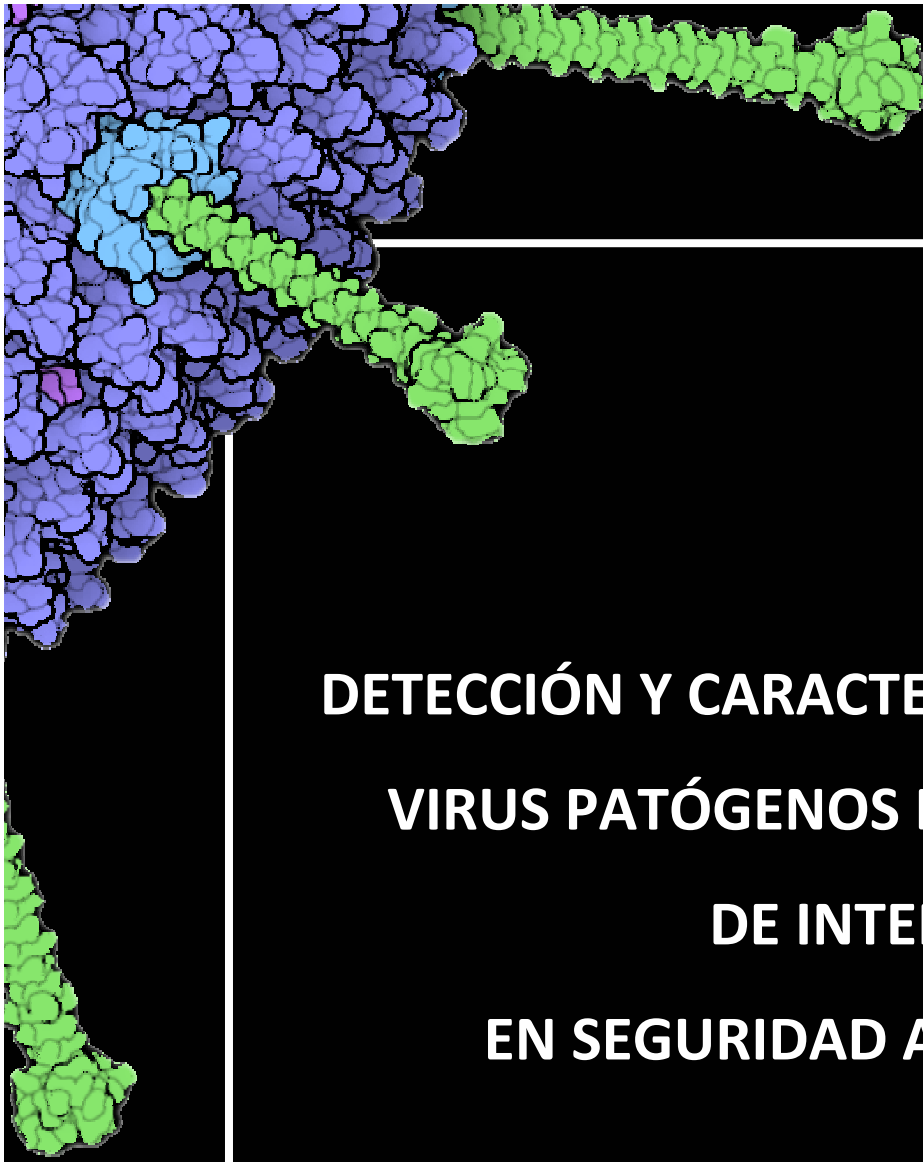
Detection and characterization of emerging viral pathogens of general interest in food safety

Jesús Rodríguez Manzano

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
VIRUS PATÓGENOS EMERGENTES
DE INTERÉS GENERAL
EN SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Jesús Rodríguez Manzano

**Tesis Doctoral
Barcelona, Marzo 2012**

Detección y caracterización de
virus patógenos emergentes
de interés general
en seguridad alimentaria

*Detection and characterization
of emerging viral pathogens
of general interest
in food safety*

Por/By Jesús Rodríguez Manzano

Marzo 2012



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

Programa de Doctorado: Microbiologia
Ambiental y Biotecnología

TESIS DOCTORAL/THESIS

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS PATÓGENOS EMERGENTES
DE INTERÉS GENERAL EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

*DETECTION AND CHARACTERIZATION OF EMERGING VIRAL PATHOGENS
OF GENERAL INTEREST IN FOOD SAFETY*

Memoria presentada por
Memory presented by

Jesús Rodríguez Manzano

para optar al grado de
to obtain the degree of

Doctor en Biología
Doctor in Biology

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Rosina Gironés Llop (Catedrática en Microbiología)
en el Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

*Thesis developed under the supervision of PhD. Rosina Gironés Llop (Professor in Microbiology)
in the Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona*

Director,
Supervisor,

Autor,
Author,

Rosina Gironés Llop

Jesús Rodríguez Manzano



Rosina Gironés Llop, Professor of Microbiology in the University of Barcelona,

DECLARES:

That Jesús Rodríguez Manzano has performed the work entitled “Detection and characterization of emerging viral pathogens of general interest in food safety” under my direction in order to obtain the degree of Doctor in Biology and that it fulfils the requirements to obtain the “Europea Doctor” mention, and that the work is ready to be presented from the present day.

Signed: Rosina Gironés Llop

Barcelona, 20th March 2012

A mi familia, en especial a mis padres, por el apoyo y amor incondicional que he recibido durante todos estos años de sacrificios

"All questions about life have the same answer: natural selection"

Henry Bennet-Clark

AGRADECIMIENTOS/ACKNOWLEDGMENTS

Antes de introducir el tema que aquí se desarrolla, quisiera expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo y que por supuesto, han sido una parte muy importante de mi vida durante los últimos años. De antemano pido perdón por si alguien no se siente suficientemente reconocido en este apartado, pero afortunadamente me he cruzado con mucha gente interesante y como consecuencia no hay suficiente espacio para escribir unos agradecimientos que estén a vuestra altura. Quiero que sepáis que cada uno de vosotros es una pieza esencial de lo que hoy considero que soy.

*En primer lugar quisiera agradecer a la **Dra. Rosina Gironés** la oportunidad brindada para poder realizar la Tesis en su grupo de investigación y permitir así la realización de un objetivo personal muy importante, aunque parezca increíble desde bien pequeño he tenido la motivación de realizar este proyecto y sin su ayuda no hubiera sido posible. Gracias **Rosina** por tu confianza y por todas las facilidades y medios con los que has contribuido tanto a mi formación profesional como personal.*

*Este apartado que sigue a continuación está dedicado a los que han sido y son responsables de que hoy me encuentre escribiendo estas líneas, la gente del **Labo 8**. Todo empezó durante mi tiempo como colaborador, hace ya siete años. En esa época el ala derecha del laboratorio estaba habitada por **Ayalke, Carlitos, Néstor** (un tío listo donde los haya), **Piluqui** (mi mentora en el laboratorio) y **Silvia** (gracias por creer que valía para esto y por toda la ayuda proporcionada), mientras que en el ala izquierda podíamos encontrar a **Sari** (la alegría de la huerta) y **Alejandra** (desde Bolivia con amor). Realmente, tengo que reconocer que fueron tiempos magníficos y que todos vosotros sois gente maravillosa de la que he aprendido un montón, aunque no quisiera dejar pasar la ocasión para recordaros que jamás he apartado de mi mente una potencial venganza por la bromita de bienvenida y, ya que nunca es tarde si la dicha es buena, espero que sigáis esperando el día en que **Tip-boy/Rodman/Dennis** os la devuelva (porque ese día llegará...). De este grupo mencionado debo destacar a los ahora **Dr. Carlos** (la rubia) y **Dr. Ayalkibet** (mi hermano etíope), creo que no hay páginas suficientes para describir las anécdotas compartidas y lo mucho que hemos llegado a hablar de CIENCIA mientras nos tomábamos unas birras. Gracias a vosotros dos, pack Benetton, he descubierto lo grande que es nuestra profesión y el poder que tiene la amistad. Seguidamente debo dar gracias al pequeño **Byron** (moreno divino), hemos compartido muchas horas dentro y fuera del laboratorio (especialmente en Sevilla y Floripa), y he aprendido mucho de ti. Sinceramente*

espero que podamos continuar igual en proyectos futuros, colaborando por el mundo entero!!!! Acercándonos un poco más al presente, me encuentro con **Annita**, ha sido todo un placer tener una coetánea de Tesis tan guapa y con un corazón tan grande, hemos tardado en conocernos pero he descubierto que eres una gran chica, espero que todo te vaya genial y que la Tesis que terminarás en breve sea un éxito. Más recientemente aparecieron; **Cerver**, siempre dispuesta a poner música, hablar de castells y echarse unas risas; **Marta**, sin duda alguna un fichaje de gran potencial y buenas cualidades, trabaja duro que el éxito te espera; **Laura**, inquieta por naturaleza y llena de buenas intenciones; **Sandra**, la compañera que me vio debutar en el mundo de impartir clases, paciente y bondadosa (¿o no?); **Persi**, la última incorporación del grupo, un tío alegre, divertido e inteligente (nunca tendrás mi poyata) y **Tarik**, no sé que tiene este chico pero me tiene encantado (¡Hala Madrid!). Todos vosotros sois el futuro inmediato del laboratorio y todavía nos queda mucho por hacer. Espero estar a vuestro lado para poder disfrutar de muchas otras historias divertidas. Ha sido un placer compartir risas y pasar junto a vosotros el tiempo transcurrido en el laboratorio, las horas de la comida, cafés de media tarde y alguna que otra fiesta. No quisiera olvidarme de la gente que nos ha visitado durante este tiempo (**Viviana, Rachel, Rabia, Juliana**,...) y que ha dejado huella en el laboratorio; un placer haberos conocido!

También quiero agradecer a los profesores, especialmente a la **Dra. Rosa Araujo** y al **Dr. Miquel Calvo**, y a la **secretaria del Departamento de Microbiología** por toda la ayuda prestada durante este tiempo, demostrando muy a menudo una paciencia infinita!!!

Aunque no quiero convertir este apartado en un soporífero listado de nombres, no puedo dejar de agradecer a los compañeros del Departamento de Microbiología (¡qué lugar!). Comenzando por los históricos (**Bonjoch, Óscar, Quím, Unai, Pere, Markus, Mari, Cristina**,... tela marinera) y no tan históricos (**Miriam, Arnau, Maruja, Aiora, Rachel, Eriel, Mário, Arnau Bassegoda, Sara**,...) de Fase I y II, hasta llegar a los nuevos fichajes: **Álex** (mi doble valenciano), **Andrés** (puro macho ecuatoriano), las chiquitas y chiquitos del labo 10 (**Marta Gómez, Marta Colomer, Anna, Pablo, Andreu**,...), **Fran** (Oye loco, ¿te vienes a Albacete?), **Mónica** (¡vamos canaria!),... Gracias a todos vosotros, por los buenos ratos que hemos pasado charlando y las risas compartidas en el laboratorio, en el pasillo y fuera del mundo académico!

Quiero dar la gracias también a **Nerea** (Beguristain,...), mi pamplonica preferida, por las historias y momentos compartidos, aguantar a Ayalke y a mi nos es tarea fácil (te perdono por no recordarme durante los primeros cuatro años en el departamento). En este apartado

también quiero incluir de manera especial a **Morata** (el que no juega en el Castilla) y **Eli** (-sonda de los elefantes), pienso que sois una pareja estupenda llena de buenas intenciones y energía positiva (más o menos), me alegro mucho de haber tenido la oportunidad de conoceros mejor y poder consideraros como mis amigos. Aunque no he sido partícipe de la época dorada del departamento, quiero que sepáis que me parecéis de lo mejor que ha pasado por aquí!

Thank you very much (dank je wel!) to all the people in LZO of the RIVM, especially **Dra. Ana Maria de Roda** to supervise my work when I was there and to greatly contribute to my formation and English improvement (from zero to an understandable level). I don't want to forget the special time shared with **Joost** (el niño prodigio), **Harold** (my Dutch brother), **Martijn** (THE SUPERVISOR), **Manoj**, **Saskia**, **Willemijn**... It was a great time together, all of you are the best!!! Gracias también a **Irene** (gemelos de bici) y **Naike**, mis amigas del Norte!!

Thank you very much to **Dr. Purcell** and **Dra. Emerson** from NIH in Washington DC to support me during the short stay and to allow me collaborate for a while with the HEV world. It was a pleasure to work with two great scientists of your level.

Muito obrigado ao grupo de brasileiros com o qual tive o prazer de conviver nos últimos anos!!! He tenido la suerte de presenciar el inicio de las colaboraciones con Fio Cruz y la UFSC, cuando mi querida **Dra. Marize** (siempre repleta de energía y sonriente) llegó al laboratorio temiendo ir sola por la Diagonal!!! Después llegaron **Adriana** (Nossa..., esto eeesss ver-dad!), **Caroline** (Naxos, Barcelona, Utrecht, New York,...) y la **Dra. Celia** (gracias por permitirme conocer tu laboratorio y pasar unas semanas magníficas en Florianópolis). Gracias a **Ana Paula**, **Vanessa**, **Izabella**, **Naira**, **Francielle**, **Heldom**, **Carmen**,... siempre llevaré conmigo la hospitalidad y manera de vivir de la gente de Brasil. Saudade de vocês!

Gracias a todos los Can Rutianos (**Silvia**, **Irene**, **Alicia**, **Gemosa**, **Vero**, **Mini yo**, **Elisabet**,...) y especialmente a **Carmen Ramil**. Tengo que reconocer que el año que estuvimos trabajando juntos fue divertido y productivo a la par. Aunque finalmente no pudimos ser compañeros por más tiempo, siempre tendré un cariño especial por el Servicio de Microbiología del Hospital Germans Trias i Pujol. Espero que sigamos en contacto por mucho tiempo!!

Para mis amigos del pueblo (PIERA TB EXISTE) y fuera de él. Especialmente, **Xavi** (aragüís, araguàs,...), **Dani** (Rock & roll baby!), **Miquel** (desde los 3 años!!), **Meritxell** (la chica que sonríe y reparte por igual), **Cris** (llegaste un día y te enamoramos), **Vane** (gracias por traer

a tus amigas) y **Mero** (¡mucha química!). Juntos hemos compartido la infancia, adolescencia y madurez: fútbol, básquet, atletismo, fiestas, bares cutres, noviazgos, penas, alegrías, secretos, ilusiones, viajes, aventuras, pisos,... en definitiva, el descubrir la vida. Sinceramente os digo que espero seguir compartiendo mucho más con vosotros!

Quiero agradecer muy especialmente a mi familia (los *flowers*). En primer lugar quiero dar las gracias a mis padres (**Jesús** y **Lola**), que siempre han estado ahí cuando los he necesitado, ofreciéndome su apoyo y dándome aliento en los momentos difíciles. Ambos sois muy importantes en mi vida y me habéis enseñado los valores más fundamentales. Si consigo que estéis la mitad de orgullosos de mí, de lo que yo lo estoy de vosotros, ya me doy por satisfecho! A mi hermana (**Silvia**), siempre me he sentido querido y apreciado por tu parte, la gran confianza que siempre has depositado en mí me da fuerzas para seguir adelante. Me haces sentir que soy alguien especial capaz de conseguir lo que quiera! Pase lo que pase, siempre estaré ahí para lo que necesites. A mi cuñado (**Luis**), una buena persona incapaz de hacer daño a nadie. A pesar que aún tengo pendiente ganarte al ping-pong, estoy orgulloso de tenerte como parte de la familia! A mis sobrinos (**Hugo** y **Berta**), también conocidos como los *Farris*, vuestro *TITO* os quiere un montón y espera que tengáis una vida plagada de éxitos. Aunque sois igual que un terremoto con patas, ¡no hay nada mejor que teneros cerca! A mi suegra (**Petri**), por acogerme dentro de la familia rápidamente y hacerme sentir parte de ella. ¡Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible alcanzar las diferentes metas propuestas, os quiero a todos!

Finalmente quiero dar las gracias a mi **Sarita**, la persona más importante de mi vida. Desde el día en que nos conocimos hemos conectado a la perfección y siempre has estado a mi lado demostrándome que puedo contar contigo para todo. Llevamos más de diez años juntos compartiendo buenos y malos momentos, pasar contigo cada uno de ellos hace que la vida tenga sentido. ¡¡¡Espero que esta nueva etapa que empezaremos como doctores sea tan bonita como la que hemos vivido hasta el día de hoy!!! ¡TQM guapa!

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

La Tesis Doctoral aquí presentada tiene como objetivo principal el estudio de virus patógenos emergentes de interés en seguridad alimentaria, mediante la evaluación de su prevalencia y diseminación ambiental, y la caracterización del riesgo asociado a la presencia de virus patógenos en la reutilización de agua residual y en el consumo de moluscos bivalvos.

Principalmente se ha estudiado la presencia de HEV, HAV, NoV, nuevos poliomavirus (KIPyV, WUPyV y MCPyV) y HAdV (como indicador de la contaminación fecal). Para lograr dichos objetivos se han analizado muestras de agua residual y agua de río, agua regenerada y moluscos bivalvos, caracterizando así las principales fuentes de contaminación fecal ambiental y de alimentos, y constatando el riesgo microbiológico asociado al consumo de marisco. Durante el desarrollo de esta Tesis se ha tratado de mejorar la metodología disponible para la concentración de partículas víricas en agua residual, así como aportar información acerca de la eficiencia de eliminación de patógenos humanos que tiene lugar al aplicar tratamientos de depuración en estaciones depuradoras de agua residual y en empresas productoras de marisco. Por último, debido a la creciente utilización de herramientas informáticas para establecer modelos matemáticos que nos permitan estimar los riesgos de infección y enfermedad asociados al consumo de alimentos y aguas contaminadas, se decidió profundizar en este nuevo ámbito de la microbiología en el que se realizan análisis cuantitativos de riesgo microbiológico, estableciendo un modelo matemático para evaluar el riesgo microbiológico asociado al consumo de moluscos bivalvos contaminados por NoV.

A grandes rasgos, el trabajo descrito se ha desarrollado en dos bloques. En la primera parte de la Tesis se ha trabajado principalmente con agua residual cruda y muestras recolectadas en distintos puntos del tratamiento que llevan a cabo las estaciones depuradoras de agua residual, mientras que en el segundo bloque se han evaluado muestras de moluscos bivalvos procedentes de mercado y empresas productoras de marisco.

El trabajo desarrollado se ha dividido en siete estudios comprendidos en cinco capítulos: (I) evaluación de los patrones de excreción y prevalencia de patógenos víricos emergentes como potenciales contaminantes del agua mediante el estudio de agua residual, (II) evaluación de la eficiencia de eliminación de patógenos e indicadores microbianos en estaciones depuradoras de agua residual donde se incluyen tratamientos terciarios, (III) desarrollo e implementación de un método eficiente de bajo coste para la concentración de

partículas víricas en agua residual y detección mediante técnicas de PCR, (IV) seguimiento de la presencia de patógenos víricos e indicadores virales en moluscos bivalvos de mercado y, (V) modelización matemática del riesgo de infección y enfermedad por norovirus asociado al consumo de marisco. Cada uno de los cinco capítulos incluidos en esta Tesis ha dado lugar a diversos artículos científicos publicados o sometidos para una publicación científica.

De acuerdo con los requisitos exigidos para obtener la mención europea, los idiomas escogidos para realizar esta memoria han sido el castellano y el inglés. La base de esta Tesis son los artículos publicados y sometidos que han sido incluidos en la sección de resultados. Todos los artículos han sido escritos en inglés y van acompañados con un resumen en castellano al inicio de cada apartado. También se ha incorporado un resumen general, unos objetivos y conclusiones generales escritos en ambos idiomas. El resto de secciones se ha escrito íntegramente en castellano.

PRESENTATION OF THE THESIS

The Doctoral Thesis presented here has as main objective the study of emerging viral pathogens of interest in food safety, by assessing its environmental prevalence and spread, and characterizing the risk associated with the presence of pathogenic viruses in the reuse of sewage and consumption of bivalve molluscan.

Mainly, it was studied the presence of HEV, HAV, NoV, new polyomavirus (KIPyV, WUPyV and MCPyV) and HAdV (as an indicator of faecal contamination). To achieve these objectives samples of sewage and river water, reclaimed water and bivalve molluscan were analyzed, characterizing the main sources of faecal contamination of the environment and food, and noting the microbiological risk associated with consumption of seafood. During the development of this Thesis it was intended to improve the available methodology for concentrating viral particles from sewage, as well as provide information about the removal efficiency of human pathogens that occurs when applying depuration treatments in sewage treatment plants and seafood producers. Finally, due to the increasing use of computational tools to establish mathematical models that allow us to estimate the risks of infection and disease associated with consumption of contaminated food and water, we decided to go into this new field in microbiology in which quantitative microbiological risk analyses are performed, establishing a mathematical model to assess the microbiological risk associated with consumption of bivalve molluscan contaminated by NoV.

Broadly, the described work has been developed in two blocks. In the first part of the Thesis, raw sewage samples collected at different sampling points of treatments performed by sewage treatment plants were the primary objects of study, while in the second block samples of bivalve molluscan from market and seafood producers were evaluated.

The work is divided into seven studies included in five chapters: (I) evaluation of the excretion patterns and prevalence of emerging viral pathogens as potential water pollutants by studying sewage, (II) evaluation of removal efficiency of pathogens and microbial indicators in sewage treatment plants which include tertiary treatment, (III) development and implementation of an efficient low cost procedure for the concentration of viral particles from sewage and detection by PCR technology, (IV) monitoring the presence of viral pathogens and viral indicators in market bivalve molluscan and (V) mathematical modeling of the risk of norovirus infection and illness associated with consumption of shellfish. Each of the five

chapters in this Thesis has given rise to various scientific articles already published or submitted for scientific publication.

In accordance with the requirements for the European mention, the chosen languages for the development of this memory have been Spanish and English. The published and submitted articles that have been included in the results section are the basis of this Thesis. All articles were written in English and are accompanied with a summary in Spanish at the beginning of each section. It has also been included an overview, the objectives and the conclusions written in both languages. The remaining sections have been written entirely in Spanish.

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados.
a. de C.	Antes de Cristo.
aa	Aminoácidos.
AdV	Adenovirus.
AgT	Antígeno tumorales T.
Agt	Antígeno tumorales t.
AgTm	Antígeno tumoral T medio.
AstV	Astrovirus.
ATP	Adenosín Trifosfato.
BKPyV	Poliomavirus BK (del inglés BK Polyomavirus).
BOE	Boletín Oficial del Estado.
CCA	Comisión del Codex Alimentarius.
CCFH	Comité del codex sobre higiene de los alimentos (del inglés Codex Committee on Food Hygiene).
CEE	Comunidad Económica Europea.
CF	Coliformes Fecales.
cm²	Centímetro cuadrado.
CRE	Elementos de replicación en cis (del inglés Cis-acting Replication Element).
DAF	Flotación por aire disuelto (del inglés Dissolved Air Flotation).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés Desoxyribonucleic Acid).
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
ECRM	Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico.
EDAR	Estación Depuradora de Agua Residual.
EF	Estreptococos Fecales.
ERM	Evaluación de Riesgos Microbiológicos.
<i>et al.</i>	Y colaboradores.
etc.	Etcétera.
EV	Enterovirus.
F	Fertilidad.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (del inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations).
FCV	Calicivirus felino (del inglés Feline Calicivirus).
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos (del inglés Food and Drug Administration).
g	Gramos.
GC	Copias genómicas (del inglés Genomic Copies).
h	Horas.
HAdV	Adenovirus humano (del inglés Human Adenovirus).
HAV	Virus de la hepatitis A (del inglés Hepatitis A Virus).
HBV	Virus de la hepatitis B (del inglés Hepatitis B Virus).
HEV	Virus de la hepatitis E (del inglés Hepatitis E Virus).
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (del inglés Human Immunodeficiency Virus).

HPyV	Poliomavirus humano (del inglés Human Polyomavirus).
IgG	Immunoglobulina G.
IRES	Punto de unión al ribosoma (del inglés Internal Ribosomal Entry Site).
J	Julios.
JCPyV	Poliomavirus JC (del inglés JC Polyomavirus).
Kb	Kilobases.
KDa	Kilodaltons.
Kg	Kilogramos.
L	Litro.
m³	Metro cúbico.
MCC	Carcinoma de células de Merkel (del inglés Merkel Cell Carcinoma).
MCPyV	Poliomavirus de células Merkel (del inglés Merkel Cell Polyomavirus).
mg	Miligramos.
min	Minutos.
mJ	Milijulios.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
MPa	Milipascales.
MPN	Número más probable (del inglés Most Probable Number)
MPyV	Poliomavirus murino (del inglés Murine Polyomavirus).
mRNA	RNA mensajero (messenger RNA).
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	Nanómetros.
NoV	Norovirus.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORF	Pauta de lectura abierta (del inglés Open Reading Frame).
ORI	Origen de replicación.
p.e.	Por ejemplo.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).
PCV1	Circovirus porcino tipo 1 (del inglés Porcine Circovirus type 1).
PDU	Unidades de PCR (del inglés PCR Detectable Units).
pH	Potencial de Hidrógeno.
PML	Leucoencefalopatía multifocal progresiva (del inglés Progressive Multifocal Leukoencephalopathy).
ppm	Partes por millón.
pRb	Proteína del Retinoblastoma.
PyV	Poliomavirus (del inglés Polyomavirus).
RC	Complejo replicativo (del inglés Replication Complex).
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid).
RPA	Proteína de replicación A (de inglés Replication Protein A).
RR	Región Reguladora.
RT-PCR	PCR con transcriptasa inversa (del inglés Reverse Transcription PCR).
RV	Rotavirus.
RVA	Rotavirus grupo A.
s.	Siglo.

S	Coeficiente de Sedimentación.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
spp.	Especie.
SV40	Virus de simio 40 (del inglés Simian Virus 40).
TCID₅₀	Dosis infectiva media de cultivo tisular (del inglés Median Tissue Culture Infective Dose).
TCR	Región del control transcripcional (del inglés Transcription Control Region).
UFC	Unidades Formadoras de Colonia.
UFP	Unidades Formadoras de Placa.
UK	Reino Unido (del inglés United Kingdom).
USA	Estados Unidos (del inglés United States of America).
USEPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (del inglés United States Environmental Protection Agency).
UV	Ultravioleta.
VLP	Pseudo-partículas virales (del inglés Virus-Like Particles).
xg	Fuerza centrífuga relativa.
μm	Micrómetros.
μW	Microvatios.

CONTENIDO DE LA TESIS

Agradecimientos/Acknowledgments	i-iv
Presentación de la Tesis	v-viii
• Castellano.....	v
• English.....	vii
Abreviaturas	ix-xi
Contenido de la Tesis	xiii-xvi
1. Introducción general	1-73
1.1. Contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos.....	3-8
1.1.1. Virus implicados en brotes epidémicos de origen ambiental.....	5
1.1.2. Bacterias implicadas en brotes epidémicos de origen ambiental.....	6
1.1.3. Parásitos implicados en brotes epidémicos de origen ambiental.....	8
1.2. El agua residual como agente transmisor de enfermedades infecciosas.....	9-17
1.2.1. Etapas del tratamiento de aguas residuales.....	11
1.2.2. Usos ambientales de la reutilización de aguas residuales en España.....	13
1.2.3. Presencia de virus en agua residual.....	14
1.2.4. Métodos de concentración de virus en agua residual.....	15
1.3. Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de enfermedades infecciosas.....	17-29
1.3.1. Legislación y zonas de producción de marisco.....	20
1.3.2. Estrategias para eliminar la contaminación microbiológica tras la recolección.....	22
1.3.3. Microorganismos modelo.....	26
1.4. Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos.....	30-33
1.4.1. Antecedentes.....	30
1.4.2. Evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos.....	31
1.4.3. Virus en alimentos.....	33
1.5. Virus de la hepatitis A.....	33-42
1.5.1. Historia.....	33
1.5.2. Características moleculares.....	35
1.5.3. Características físico-químicas y estabilidad.....	36
1.5.4. Diversidad genética.....	37
1.5.5. Diversidad serotípica.....	38
1.5.6. Replicación del virus.....	38
1.5.7. Epidemiología.....	38
1.5.8. Zonas endémicas y no endémicas.....	39
1.5.9. Seroprevalencia.....	40
1.5.10. Profilaxis.....	41
1.6. Virus de la Hepatitis E.....	42-51
1.6.1. Historia.....	42
	xiii

1.6.2. Características moleculares.....	44
1.6.3. Características físico-químicas y estabilidad.....	46
1.6.4. Diversidad genética.....	46
1.6.5. Diversidad serotípica.....	48
1.6.6. Replicación del virus.....	48
1.6.7. Epidemiología.....	49
1.6.8. Zonas endémicas y no endémicas.....	49
1.6.9. Seroprevalencia.....	50
1.6.10. Profilaxis.....	51
1.7. Norovirus humanos.....	52-57
1.7.1. Historia.....	52
1.7.2. Características moleculares.....	52
1.7.3. Características físico-químicas y estabilidad.....	53
1.7.4. Diversidad genética.....	54
1.7.5. Replicación del virus.....	55
1.7.6. Epidemiología.....	56
1.7.7. Sintomatología clínica.....	56
1.7.8. Inmunidad.....	57
1.8. Adenovirus humanos.....	57-62
1.8.1. Historia.....	57
1.8.2. Características moleculares.....	58
1.8.3. Características físico-químicas y estabilidad.....	59
1.8.4. Diversidad genética.....	59
1.8.5. Diversidad serotípica.....	60
1.8.6. Replicación del virus.....	60
1.8.7. Epidemiología.....	61
1.8.8. Oncogenicidad.....	62
1.9. Poliomavirus.....	62-71
1.9.1. Historia.....	62
1.9.2. Características moleculares.....	63
1.9.3. Características físico-químicas y estabilidad.....	65
1.9.4. Replicación del virus.....	66
1.9.5. Oncogenicidad.....	67
1.9.6. Vías de transmisión de poliomavirus humanos.....	69
1.9.7. Poliomavirus de células de Merkel.....	69
1.9.8. Epidemiología.....	70
1.10. Otros virus presentes en la contaminación ambiental.....	71-73
1.10.1. Enterovirus.....	71
1.10.2. Astrovirus.....	72
1.10.3. Rotavirus.....	72
2. Objetivos	75-80
• Castellano.....	77
• <i>English</i>	79

3. Publicaciones	81-88
<ul style="list-style-type: none"> • Listado de publicaciones..... 83 • Informe de participación en los artículos..... 85 • Informe del factor de impacto de los artículos 87 	
4. Resultados	89-248
Capítulo I. Infecciones por virus patógenos en la población, análisis de la prevalencia y diseminación ambiental.....	91-126
<ul style="list-style-type: none"> • Resumen estudio 1..... 93 • Estudio 1: Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples..... 97 • Resumen estudio 2..... 107 • Estudio 2: Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain 109 • Resumen estudio 3..... 119 • Estudio 3: Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants..... 121 	
Capítulo II. Estudio de la eficiencia de eliminación de patógenos virales en plantas depuradoras de agua residual y control microbiológico del agua regenerada....	127-140
<ul style="list-style-type: none"> • Resumen estudio 4..... 129 • Estudio 4: Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water..... 133 	
Capítulo III. Desarrollo de nuevos métodos de concentración de partículas víricas en agua residual.....	141-168
<ul style="list-style-type: none"> • Resumen estudio 5..... 143 • Estudio 5: New methods for the concentration of viruses in urban sewage using quantitative PCR..... 147 	
Capítulo IV. Evaluación de la contaminación viral en moluscos bivalvos de mercado y eficiencia de la eliminación vírica en procesos de depuración de moluscos.....	169-204
<ul style="list-style-type: none"> • Resumen estudio 6..... 171 • Estudio 6: Failure to control viral contamination in molluscan shellfish applying current depuration treatments..... 175 	
Capítulo V. Desarrollo de un modelo matemático para la valoración cuantitativa del riesgo de infección y enfermedad por norovirus asociado al consumo de marisco.....	205-230
<ul style="list-style-type: none"> • Resumen estudio 7..... 207 • Estudio 7: Quantitative risk assessment for human norovirus infection due to oyster consumption..... 211 	

5. RESUMEN GENERAL	231-264
• Castellano.....	233
• <i>English</i>	249
6. CONCLUSIONES	265-270
• Castellano.....	267
• <i>English</i>	269
7. REFERENCIAS	271-304
8. ANEXOS	305-316
• Otras publicaciones no incluidas en la Tesis.....	307

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos

A nivel mundial, las enfermedades transmitidas a través de aguas y alimentos contaminados constituyen un problema que en las últimas décadas se ha complicado considerablemente (Koopmans *et al.*, 2002). Entre los factores asociados a estos recientes cambios globales se pueden señalar, entre otros, el crecimiento de la población, la pobreza, la urbanización en los países subdesarrollados y el comercio internacional de alimentos. Cada vez más se manifiesta un mayor interés por la contaminación del agua y el suelo por microorganismos patógenos, especialmente por virus. Este problema, como factor en la diseminación de microorganismos patógenos, tiene consecuencias considerables que aún no han sido plenamente evaluadas. La mayoría de los ríos que sirven como fuentes de agua potable en nuestra región transportan cantidades variables de aguas de desecho, que se ven incrementadas en los periodos en que disminuye el caudal. La urbanización rápida, tanto de los países desarrollados como de los países en vías de desarrollo, ha dado lugar a problemas críticos en el suministro de agua y en la eliminación de desechos. Las crecientes demandas de fuentes de agua utilizables debidas al aumento de la población mundial y a la concurrente expansión de la industria hacen inevitable el aprovechamiento de las aguas residuales domésticas. Al mismo tiempo, los adelantos tecnológicos dentro de la industria alimentaria y una creciente conciencia de que la inocuidad de los alimentos es un tema que debe abordarse a lo largo de la cadena alimentaria, desde los inicios de producción hasta el momento del consumo, está influyendo claramente en los sistemas alimentarios mundiales.

Se ha estimado que aproximadamente 3.000 millones de personas en todo el mundo carecen de sistemas de saneamiento y que el 95% de las aguas residuales domésticas son vertidas al medio sin ser tratadas. Como consecuencia de estas deficiencias sanitarias y de la falta de aguas de bebida limpias, se calcula que cada año 3.500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica, y 3,3 millones de personas mueren anualmente de enfermedades entéricas. La razón principal de esta situación es el alto coste que supone la puesta a punto de procesos de tratamiento y el mantenimiento de las infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario, de los que solamente se benefician el 6% de la población mundial (Niemczynowicz, 1997; Langford, 2005).

Las rutas de transmisión de los microorganismos patógenos entéricos en el medio ambiente son muy diversas (Figura 1). Se ha comprobado que la población puede adquirir una infección mediante diferentes vías, incluyendo:

- Ingestión de agua contaminada.
- Ingestión de moluscos bivalvos vivos crudos o poco cocinados que hayan crecido en aguas contaminadas.
- Ingestión de vegetales irrigados con aguas contaminadas o abonados con biosólidos procedentes de estaciones depuradoras de agua residual (EDAR).
- Contacto con aguas contaminadas destinadas a usos recreacionales.
- Contacto con aerosoles generados a partir de aguas contaminadas.

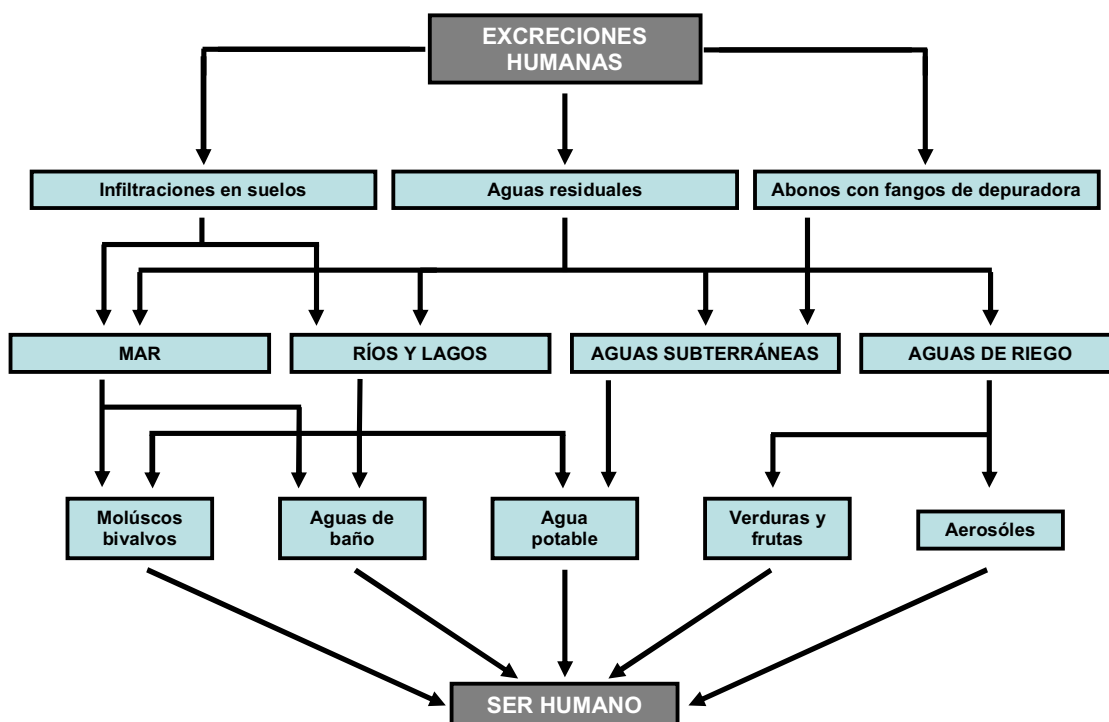


Figura 1. Ruta de transmisión fecal-oral de los microorganismos entéricos humanos en el medio ambiente. Modificado de Melnick *et al.*, 1978

Las toxo-infecciones de etiología diversa vinculadas a agua y alimentos que acaban afectando a la población humana de todos los rincones del mundo comportan un importante tema de estudio a nivel de salud pública, en el tema que aquí nos ocupa nos centraremos en las de origen microbiológico, más concretamente en virus.

1.1.1. Virus implicados en brotes epidémicos de origen ambiental

El listado de virus potencialmente patógenos presentes en agua residual incluye virus de genoma DNA como los adenovirus (AdV) y poliomavirus (PyV), y virus de genoma RNA como el virus de la hepatitis A (HAV) y E (HEV), norovirus (NoV), rotavirus (RV), enterovirus (EV) y astrovirus (AstV), entre otros. Los adenovirus humanos (HAdV) y poliomavirus humanos JC y BK (JCPyV y BKPyV) se encuentran en una elevada prevalencia en todas las áreas estudiadas (Pina *et al.*, 1998a; Bofill-Mas *et al.*, 2000; Girones *et al.*, 2010). EV, NoV, RV y AstV han sido ampliamente descritos mostrando prevalencias variables según el periodo del año y la presencia de brotes epidémicos entre la población (Okoh *et al.*, 2010). La presencia de HAV varía en función del área geográfica estudiada, aunque su detección en agua residual urbana de zonas caracterizadas como endémicas es muy elevada. HEV, al igual que HAV, es más abundante en países donde el saneamiento es pobre. Se han descrito cepas de HEV propias del agua residual de muchos países industrializados, así como la existencia de casos esporádicos de hepatitis agudas originadas por éstas cepas no importadas (Pina *et al.*, 2000; Clemente-Casares *et al.*, 2003; Purcell y Emerson, 2008). Además, cepas de HEV también infectan cerdos, jabalíes y ciervos, y son frecuentemente detectadas en agua residual de mataderos y de zonas urbanas de Europa que actualmente se consideran no endémicas (Purdy y Khudyakov, 2011).

Muchos de los virus considerados como contaminantes del agua son responsables de infecciones subclínicas, causando síntomas en una pequeña parte de la población infectada. Los EV son un buen ejemplo de lo mencionado, aunque causan una amplia diversidad de síntomas clínicos, incluyendo enfermedades que afectan al sistema nervioso central. Las enfermedades producidas por infecciones de origen vírico son muy variadas, desde enfermedades respiratorias, frecuentemente asociadas con HAdV, hasta hepatitis agudas causadas por HAV y HEV. Otras infecciones comúnmente relacionadas con RV, HAdV y NoV incluyen gastroenteritis severas en niños y adolescentes (Hart *et al.*, 2009). La evolución de la enfermedad depende de factores como la ruta de infección, la dosis infecciosa del agente vírico, la edad, salud, estado inmunológico y estado nutricional del individuo infectado (embarazo, presencia de otras infecciones o enfermedad), y el acceso a cuidados sanitarios. Algunos virus, como JCPyV, BKPyV y determinados HAdV, producen infecciones durante la infancia, estableciendo así infecciones persistentes

Los virus que se transmiten vía alimentos o aguas contaminadas son típicamente estables en el medio ambiente debido a la ausencia de envuelta lipídica y a la resistencia a

condiciones adversas, como demuestra su capacidad de sobrevivir en el tracto digestivo. Como ejemplo, entre las enfermedades asociadas con aguas para usos recreacionales, NoV tiene un papel muy importante ya que es uno de los principales responsables de brotes víricos originados en este tipo de matriz, seguido por los HAdV (Sinclair *et al.*, 2009).

1.1.2. Bacterias implicadas en brotes epidémicos de origen ambiental

Los principales agentes bacterianos responsables de gastroenteritis son *Salmonella* y *Campylobacter* (Westrell *et al.*, 2009). *Salmonella* suele encontrarse en menor número en agua que indicadores bacterianos tales como los coliformes fecales (CF), estreptococos fecales (EF) o los enterococos, los cuales muestran una presencia de varios órdenes de magnitud mayor (Sidhu y Toze, 2009). No obstante, se estipula que niveles bajos de *Salmonella* (15 – 100 unidades formadoras de colonia [UFC]) en agua suponen un riesgo para la salud pública (Jyoti *et al.*, 2009).

Especies termotolerantes de *Campylobacter* han sido descritas frecuentemente en aguas superficiales y biosólidos procedentes de plantas depuradas de agua residual (Sahlström *et al.*, 2004). Otros patógenos bacterianos frecuentemente detectados son *Shigella*, *Yersinia* y *Vibrio cholera*, siendo responsables de brotes infecciosos vinculados a agua o mariscos contaminados (Sharma *et al.*, 2003). *Legionella pneumophila* tiene un ciclo vital acuático muy complejo que afecta drásticamente a su estado de actividad. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en una amplia diversidad de entornos acuáticos, como pueden ser ambientes humanos controlados que contienen agua (p.e. sistemas de refrigeración o tuberías que forman parte de las redes de distribución de agua potable). El recrecimiento en el interior de los protozoos permite que estos patógenos sean capaces de sobrevivir a la cloración y que la generación de aerosoles en estos sistemas contribuya a su transmisión en humanos, a través de la infección de los macrófagos alveolares y finalmente generando una enfermedad respiratoria (McDade *et al.*, 1977; Steinert *et al.*, 2002).

Además de estos patógenos vinculados a enfermedades transmitidas por agua, existen otros grupos de bacterias que también se transmiten por esta misma vía, algunos de los cuales se consideran patógenos emergentes. *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 es un patógeno de origen fecal que se detecta frecuentemente en agua (Bavaro, 2009). Ha sido detectado en el 2% de biosólidos crudos procedentes de las EDAR, aunque se desconoce la cantidad presente en el agua residual cruda o su supervivencia a los tratamientos aplicados (Sidhu y Toze, 2009).

Recientemente, en mayo de 2011 (Alemania), este patógeno ha sido responsable de un brote infeccioso que ha afectado a 3.842 personas. La elevada proporción de pacientes que desarrollaron un síndrome hemolítico-urémico convierte a este brote en el más relevante desde que la *E. coli* enterohemorrágica fue identificada como patógeno humano. Investigaciones epidemiológicas han revelado que la soja fue el producto contaminado con agua residual que introdujo la infección en la cadena alimentaria (Beutin y Martin, 2012).

Listeria monocytogenes es una bacteria ubicua aislada a partir de un amplio rango de fuentes ambientales, incluyendo suelos, agua, efluentes de las EDAR, alimentos, y heces de humanos y animales (Barbuddhe y Chakraborty, 2009). Brotes recientes han demostrado que *Listeria monocytogenes* puede producir gastroenteritis en individuos sanos así como una sintomatología más severa en pacientes inmunocomprometidos (Barbuddhe y Chakraborty, 2009; Wilkes *et al.*, 2009). *Vibrio vulnificus* es un patógeno oportunista capaz de causar gastroenteritis, necrosis severa de tejidos blandos y/o septicemia primaria, con una tasa de mortalidad elevada. Dicha enfermedad se asocia con la ingestión de marisco o la exposición con agua contaminada. *Vibrio vulnificus* ha sido recuperado a partir de pescado, marisco, agua y sedimentos (Harwood *et al.*, 2004). Recientemente ha sido aislado en muestras de agua residual urbana (Igbinosa *et al.*, 2009).

Helicobacter pylori es uno de los agentes etiológicos responsables de gastritis y úlcera péptica y duodenal. Además, la infección es reconocida como un factor de riesgo en el desarrollo de linfoma gástrico del tejido linfoide asociado a mucosa. *Helicobacter pylori* está presente en aguas de superficie y agua residual (Queralta *et al.*, 2005), y los biofilms presentes en sistemas de distribución de agua potable se consideran un potencial reservorio (Park *et al.*, 2001). Hasta el momento no se ha conseguido cultivar *Helicobacter pylori* a partir de muestras ambientales de agua y su capacidad de sobrevivir manteniendo su capacidad de infección sigue siendo un tema controvertido. Debido a la dificultad intrínseca para ser cultivado junto con la falta de métodos de cultivo estandarizados aplicables en muestras ambientales, existen muy pocos estudios que hablen de su presencia en el medio ambiente (Percival y Thomas, 2009). En cambio, *Arcobacter* spp., considerado un patógeno emergente responsable de enfermedades en animales domésticos y diarreas en humanos, es frecuentemente estudiado y detectado en alimentos de origen animal, en particular en aves de corral, así como en diferentes tipos de agua: subterránea, superficial, residual cruda y de mar (Ho *et al.*, 2006). Diversos estudios concluyen que el agua representa una vía importante en la transmisión de *Arcobacter* spp., sugiriendo la ruta fecal-oral para humanos y animales (González *et al.*, 2007).

1.1.3. Parásitos implicados en brotes epidémicos de origen ambiental

El parasitismo hace referencia a la relación entre dos organismos, parásito y huésped, en la cual el parásito obtiene un beneficio en forma de crecimiento y reproducción produciendo un daño al huésped. Existen parásitos de muchos tipos pero para el propósito del trabajo aquí desarrollado nos vamos a centrar en los protozoos. Existen una gran variedad de patógenos, como pueden ser *Cryptosporidium*, *Entamoeba*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Microsporidia* y *Giardia*, que representan un riesgo real de infección a través del agua (Smith *et al.*, 2004). Entre los protozoos se conoce que los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* son muy resistentes en el ambiente (Cacciò, 2003). *Cryptosporidium* ha sido detectado en diferentes fuentes de agua residual de bebida y es considerado un importante contaminante (Xiao y Ryan, 2008). La infección ocurre tras la ingestión de alimentos, agua de bebida o agua para uso recreacional contaminados con ooquistes (fase esporulada). Existen 20 especies de *Cryptosporidium* y alrededor de 40 genotipos, entre éstos, *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* son responsables de más del 95% de los casos de cryptosporidiosis reportadas humanas (Xiao y Ryan, 2008).

Giardia se asocia frecuentemente a agua contaminada, aunque de las diferentes especies definidas únicamente *Giardia duodenalis*, también conocida como *Giardia intestinales* o *Giardia lamblia*, se ha encontrado vinculada a humanos y otros mamíferos (van der Giessen *et al.*, 2006). Gran parte de las fuentes de agua superficial contaminadas con *Giardia duodenalis* se contaminan a través de agua residual tratada, agua residual sin tratar, lixiviados de abonos procedentes de zonas agrícola y, en el caso de aguas cristalinas, animales salvajes. Se han descrito concentraciones superiores a 10^4 quistes/L de agua residual cruda y 10^2 quistes/L de agua superficial (Wallis *et al.*, 1996). Los quistes son estructuras de resistencia que pueden sobrevivir en agua durante semanas, incluso meses. *Cryptosporidium spp.* y *Giardia duodenalis* se encuentran frecuentemente ligados a brotes infecciosos relacionados con aguas y alimentos, afectando a humanos y a un amplio rango de animales domésticos salvajes (Fayer, 2004). Ambos parásitos se sitúan entre las principales causas de diarrea en humanos y animales en el mundo entero, y son potencialmente responsables de la reducción de la esperanza de vida de los huéspedes inmunodeprimidos (Smith *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2008). Los quistes y ooquistes de *Giardia spp.* y *Cryptosporidium spp.* son más resistentes al cloro que las bacterias entéricas. El número de parásitos necesario para inducir una infección se estima alrededor de 10 ooquistes para *Cryptosporidium spp.* (Fayer *et al.*, 2000) y 10 quistes para *G. duodenalis* (Adam, 2001).

1.2. El agua residual como agente transmisor de enfermedades infecciosas

Debido al actual incremento masivo de población mundial, se considera que el agua se convertirá en uno de los recursos más escasos durante el transcurso del presente siglo, entendiendo la escasez de agua como la situación en la que un país o una región no dispone de un mínimo de 1.000 m³/persona/año (Pereira *et al.*, 2009) (Figura 2). De hecho, desde hace más de diez años se asume que los niveles de consumo de agua potable son insostenibles tanto para los países en vías desarrollo como para los países desarrollados y que, a nivel global, el consumo de agua ha incrementado tres veces más de lo esperado respecto el aumento de la población. Como consecuencia directa de este fenómeno podemos observar el deterioro de la salud de la población de determinadas regiones, la limitación del desarrollo de la economía y agricultura, y la vulnerabilidad de multitud de ecosistemas (UNCSD, 1997). Por otro lado, la mayoría de desechos originados por la actividad humana acaban incorporándose a diferentes cuerpos de agua (lago, mar, océano, etc.) a través de aguas y vertidos residuales de origen urbano, agrícola e industrial y fuentes de contaminación difusas. Aunque la recogida de aguas residuales data de tiempos remotos, el tratamiento para su depuración es relativamente reciente, situándose a finales del s. XIX y principios del s. XX (Cooper, 2001). El primer caso que constató la necesidad imperiosa de tratar el agua residual se remonta al 1855, cuando John Snow demostró la vinculación de un brote de cólera en Londres y la contaminación por agua residual del Río Támesis (revisado en Cooper, 2001).

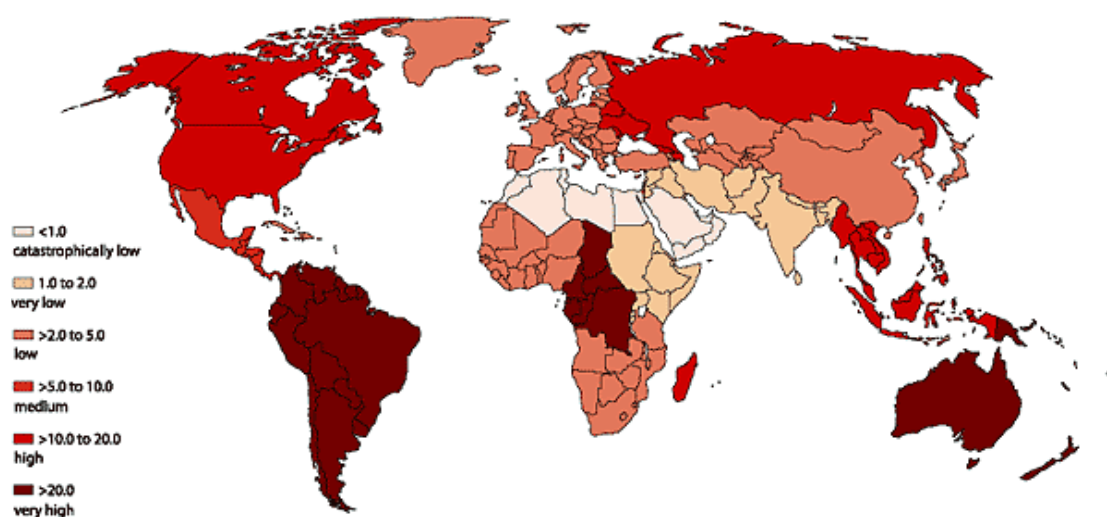


Figura 2. Disponibilidad mundial de agua per cápita (1.000 m³/año) y país (UNEP, 2002)

La necesidad de depurar los efluentes producidos como consecuencia de la actividad humana, en especial los de origen urbano, para evitar la contaminación ambiental es un hecho incuestionable. La reutilización de las aguas depuradas para usos diversos, como el regadío o la recarga artificial de acuíferos, permite la recuperación parcial de los costes derivados del proceso de depuración y, en las zonas áridas y semiáridas proporciona un recurso de agua alternativo. Si bien desde finales del s. XX el agua procedente de las EDAR ha sido utilizada para fines diversos, es durante la última década cuando se está registrando un incremento mayor en la utilización de este recurso (Levine y Asano, 2004, Hochstrat *et al.*, 2005). Los usos derivados de su aplicación abarcan desde los menos restrictivos (p.e. riego de bosques) hasta los más exigentes (p.e. riego de productos agrícolas para su consumo en fresco), siempre y cuando se consigan unos criterios de calidad del agua mínimos para que su utilización sea segura. Posiblemente, el uso más extendido sea en la agricultura, por la existencia de numerosas ventajas derivadas del enriquecimiento en nutrientes, implicaciones socio-económicas, reducción de la dosis de aplicación de abonos y posibilidad de gestionar los efluentes de una forma más efectiva (Candela *et al.*, 2007).

Los tratamientos utilizados para depurar el agua residual varían en función de la región y país en la que nos fijemos, dependiendo del número de usuarios y del volumen de agua a tratar (Doorn *et al.*, 2006). A pesar de los adelantos tecnológicos y los conocimientos sobre el tratamiento de aguas de todo tipo (incluyendo al agua residual), siguen ocurriendo un número elevado de infecciones y brotes infecciosos vinculados a esta matriz, suponiendo así un gran reto para la salud pública (Zhou y Smith, 2001). Gran parte de estas infecciones tienen lugar en los países en desarrollo, donde existe un limitado nivel de saneamiento, unas condiciones socioeconómicas inadecuadas y una conciencia sobre la salud menor a la existente en los países desarrollados (Toze, 1997; Elimelech, 2006). Los riesgos de salud para la población a partir de la exposición al agua residual pueden originarse principalmente por el contacto con patógenos microbianos, tóxicos químicos y metales pesados.

La relevancia del agua residual como vector de brotes infecciosos queda claramente ejemplificada con el brote de cólera que azotó América Latina a principios de los años noventa. El uso de aguas residuales sin tratar para la fertilización de campos de hortalizas ocasionó brotes de cólera en Chile y Perú. La epidemia se abatió sobre Perú en 1991 y se extendió a gran parte de Latinoamérica, afectando a más de un millón de personas y generando cerca de 10.000 víctimas a finales de 1994. Este brote de cólera también alertó sobre el hecho de que la activación de una ruta de transmisión da lugar a un impulso de otras vías alternativas, ya que

el consumo de marisco contaminado y las infecciones secundarias (contacto persona-persona) se convirtieron en el principal problema tras las infecciones iniciales a partir de las hortalizas contaminadas con agua residual (revisado en Tickner, 2005; PAHO, 2001).

Agrupando los conceptos desarrollados en los párrafos previos, podemos observar como la necesidad global de agua potable, el riesgo asociado al agua residual y la creciente reutilización de aguas depuradas generan una situación que conlleva un riesgo para la salud pública, representando así un reto para los sistemas de saneamiento y regulaciones de aguas residuales/tratadas.

1.2.1. Etapas del tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales consiste en una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que tienen como fin eliminar los contaminantes presentes en el agua efluente destinada para el uso humano. El objetivo del tratamiento es producir agua limpia (efluente tratado) o reutilizable en el ambiente y un residuo sólido o fango (también llamado biosólido o lodo) convenientes para su disposición o reutilización. Es muy común llamarlo depuración de aguas residuales para distinguirlo del tratamiento de aguas potables. En la Tabla 1 podemos observar las principales funciones y tipo de proceso físico de cada una de las etapas diferenciadas en el tratamiento de aguas residuales.

Tabla 1. Etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales.

Etapas	Función	Tipo de procesos
Pretratamiento	Eliminación de sólidos	Físico y/o químico
Tratamiento primario	Eliminación de materia en suspensión	Físico
Tratamiento secundario	Eliminación de materia orgánica biodegradable	Biológico
Tratamiento terciario	Eliminación de sales disueltas, nutrientes, patógenos, materia orgánica refractaria, reducción de sólidos y demanda biológica de oxígeno	Físico y/o químico y/o biológico
Tratamiento de biosólidos	Estabilización y reducción del volumen de los biosólidos producidos en el tratamiento del agua	Físico y/o químico

- **Pretratamiento:** Una vez el agua residual entra en la EDAR, ésta se somete a un tratamiento preeliminar, pretendiendo separar del agua residual tanto por operaciones físicas como por operaciones mecánicas, la mayor cantidad de materias que por su naturaleza o por su tamaño crearían problemas en los tratamientos posteriores (obstrucción de tuberías y bombas, depósitos de arenas, rotura de equipos, etc.). Dentro del pretratamiento y aplicados

secuencialmente podemos diferenciar: el desbaste (eliminación de grandes objetos flotantes, como trapos, latas, botellas y palos), desarenado (eliminación de arenas, granos de café, etc.) y desengrasado (eliminación de los sólidos y líquidos no miscibles de menor densidad que el agua) (USEPA, 2004).

- **Tratamiento primario:** Es el segundo paso en el tratamiento del agua residual y permite la separación de sólidos en suspensión de menor tamaño. Después de haber realizado el desbaste, desengrasado y desarenado, el agua residual continúa presentando componentes orgánicos e inorgánicos disueltos junto a sólidos en suspensión. Los sólidos en suspensión consisten en partículas diminutas que podrán ser eliminadas tras la aplicación de tratamientos tales como la sedimentación (asentamiento por gravedad), también llamada decantación primaria, coagulación química o filtración. Aunque, los contaminantes que están disueltos o son excesivamente finos y permanecen suspendidos en el agua residual no son eliminados efectivamente por sedimentación. Cuando el agua residual entra en un tanque de sedimentación se ralentiza, permitiendo que los sólidos en suspensión vayan cayendo gradualmente hacia el fondo del tanque, generando los biosólidos que serán posteriormente tratados.

- **Tratamiento secundario:** Tratamiento biológico que elimina la materia orgánica disuelta en el agua residual. Hasta el 90% de la materia de origen orgánico presente en el agua residual puede ser eliminada mediante el tratamiento secundario. Para ello se recurre convencionalmente a bacterias que dentro de tanques grandes, en agitación y con ayuda de la oxigenación del agua, se encargan de alimentarse de esta materia orgánica disuelta (USEPA, 2004), separándose posteriormente del agua mediante un nuevo proceso de decantación, donde de nuevo se generarán biosólidos. Los tres métodos convencionales más utilizados en los tratamientos secundarios son la biomasa bacteriana en lecho fijo, la biomasa bacteriana suspendida y las lagunas de estabilización (Upadhyay *et al.*, 2007). Si la biomasa bacteriana está sobre superficies inertes tales como roca, escoria, material cerámico o plástico, se habla de lecho fijo, si está suspendida en el agua sin tratar hablamos de biomasa suspendida. En cada una de estas situaciones, la concentración de oxígeno en el agua determina la existencia de bacterias aeróbicas, facultativas o anaeróbicas. Una laguna de estabilización es una estructura simple para embalsar aguas residuales con el objeto de mejorar sus características sanitarias. Las lagunas de estabilización se construyen de poca profundidad (2 – 4 m) y con períodos de retención relativamente grandes (por lo general de varios días). Cuando las aguas residuales son descargadas en lagunas de estabilización se realiza en las mismas, de forma

espontánea, un proceso conocido como autodepuración o estabilización natural, en el que ocurren fenómenos de tipo físico, químico, bioquímico y biológico. La calidad del agua que abandona las lagunas de estabilización se considera equivalente al efluente procedente de un tratamiento secundario convencional. Las lagunas de estabilización eliminan la materia orgánica biodegradable y parte del nitrógeno presente en el agua residual (Larsdotter *et al.*, 2010).

- **Tratamiento terciario:** Tratamiento adicional que se emplea para la eliminación de sustancias en suspensión y disueltas que permanecen tras la aplicación del tratamiento secundario. Se realiza mediante la aplicación de una gran variedad de procesos físicos, químicos o biológicos. Los tratamientos terciarios incluyen la filtración, la eliminación de amonio y otros contaminantes específicos y la desinfección para eliminar patógenos. La eliminación de patógenos (higienización) suele ser el objetivo principal y los procesos que se utilizan se conocen como desinfección. La cloración, la ozonización y la irradiación con ultravioletas (UV) son los mecanismos de desinfección más utilizados con el agua residual (Hijnen *et al.*, 2006).

- **Línea de fangos:** Está formada por el conjunto de procesos utilizados para tratar a los biosólidos producidos en la línea de agua (procedentes del tratamiento primario y secundario). Estos biosólidos son degradados en un digestor anaeróbico (o en otra forma similar), para ser después incinerados, usados como abono o depositados en un vertedero.

1.2.2. Usos ambientales de la reutilización de aguas residuales en España

España es el país europeo con mayor déficit hídrico y donde los recursos hídricos no convencionales, como la desalación o el agua procedente de las EDAR, constituyen una parte importante de la gestión integrada de los recursos hídricos disponibles. Paralelamente, también es uno de los países que más agua reutiliza, aunque todavía en cantidades poco significativas ya que no se llega a reutilizar más del 5% del volumen total de las aguas residuales captadas. Según estudios recientes, el potencial de reutilización en Europa es unas 10 veces superior al nivel actual (Hochstrat *et al.*, 2005).

Recientemente, mediante la realización del Real Decreto 1620/2007 (Anónimo, 2007) se han concretado los potenciales usos admitidos para el agua depurada y se han establecido criterios de calidad. Este Real Decreto desarrolla la legislación pendiente tras la publicación del

Plan Hidrológico Nacional 11/2005 (Anónimo, 2005) a la vez que da cumplimiento a las exigencias del Reglamento de Dominio Público Hidráulico y transpone la Directiva Marco del Agua (Anónimo, 2000) e incorpora el concepto y la definición de ‘agua regenerada’, cuyo uso requerirá una concesión administrativa que se concederá según la posterior utilización del agua. En este Real Decreto podemos distinguir los siguientes usos: urbano, agrícola, industrial, recreativo y ambiental, y en su anexo I se recogen los criterios de calidad diferenciados según los usos, aportando límites de obligado cumplimiento. Los criterios definidos tienen la consideración de mínimos obligatorios exigibles, incluyendo parámetros físico-químicos y sanitarios. Además, para el resto de los parámetros es necesario que las aguas depuradas cumplan con las condiciones necesarias para el vertido de aguas residuales según se recoge en el Real Decreto 1315/1992 (Anónimo, 1992).

1.2.3. Presencia de virus en agua residual

El agua residual cruda representa una de las fuentes más importantes de introducción de patógenos en el medio ambiente, especialmente patógenos como los virus (Tabla 2), ya que éstos muestran una gran estabilidad en condiciones ambientales adversas. Un estudio reciente ha demostrado la presencia de más de 600.000 nuevas secuencias víricas, de las cuales 43.381 se relacionan con virus conocidos mientras que el resto podrían representar nuevos virus (Cantalupo *et al.*, 2011). Aunque las aguas residuales procedentes de zonas urbanas, rurales, hospitales y mataderos son frecuentemente tratadas antes de ser vertidas al medio ambiente, existen multitud de estudios que demuestran la presencia de patógenos víricos en ellas, representando una fuente de contaminación importante (Gantzer *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 2005; van den Berg *et al.*, 2005; Bofill-Mas *et al.*, 2006; Fumian *et al.*, 2010).

Tabla 2. Detección de patógenos víricos humanos en aguas residuales crudas y tratadas.

Virus	Tipo muestra	Procedencia	GC/mL	Positivas
HAdV	Agua residual cruda	España	$10^2 - 10^5$	100%
	Efluente secundario	España	$10^1 - 10^2$	100%
	Agua residual cruda	USA	$10^2 - 10^5$	
	Efluente terciario	USA	$10^1 - 10^2$	
JCPyV	Agua residual cruda	España	$10^3 - 10^4$	100%
	Agua residual cruda	Brasil	$10^2 - 10^5$	96%
	Efluente secundario	Brasil	$10^2 - 10^3$	39%
AstV	Agua residual cruda	Francia	10^6	100%
EV	Agua residual cruda	Francia	10^5	
HEV	Agua residual cruda	España	10^2	
HAV	Agua residual cruda	España	10^1	
NoV	Agua residual	UK	10^4	
	Efluente secundario	Brasil	$10^5 - 10^6$	

Tabla modificada de la revisión realizada por Girones *et al.*, 2010; GC: copias genómicas.

Virus entéricos como los HAdV, RV, NoV, EV, HAV y HEV, y virus excretados por orina como los poliomavirus BK y JC, han sido descritos en agua residual procedente de diferentes áreas geográficas (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Miagostovich *et al.*, 2008; Fumian *et al.*, 2010; Victoria *et al.*, 2010). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los niveles de los indicadores bacterianos clásicos (*E. coli* y enterococos) no se correlacionan correctamente con la presencia de virus, especialmente cuando las concentraciones del indicador bacteriano son bajas (Brownell *et al.*, 2007; Colford *et al.*, 2007; Calgua *et al.*, 2008; Wyn-Jones *et al.*, 2011).

El agua residual tratada y sin tratar termina principalmente contactando con el ser humano a través de fuentes de abastecimiento de agua (aguas potables), aguas para usos recreacionales (playas, piscinas, etc.) o zonas de producción de marisco. Se han descrito brotes infecciosos de origen vírico a partir de alimentos y aguas contaminadas con agua residual en diversas áreas geográficas (revisado en Hedberg y Osterholm, 1993; Brugha *et al.*, 1999; Häfliger *et al.*, 2000; Breitenmoser *et al.*, 2008), hecho que constata el relevante papel que juega el agua residual en cuanto a la introducción de virus entéricos en el medio ambiente.

1.2.4. Métodos de concentración de virus en agua residual

La ausencia de métodos de concentración de partículas víricas que sean fácilmente implementables en laboratorios de rutina, económicos y con elevadas recuperaciones es una de las principales dificultades a la hora de analizar y detectar virus en muestras ambientales. Los pasos básicos para el análisis de virus presentes en muestras de agua son los siguientes: muestreo, concentración, eliminación de inhibidores y detección específica del virus que queramos detectar. La concentración es, con diferencia, el punto más crítico entre los procesos mencionados, debido a que las partículas víricas suelen presentarse en concentraciones bajas y se requiere concentrar y reducir los volúmenes finales hasta pocos mL.

Desde hace más de 70 años se han desarrollado métodos de concentración para detectar partículas víricas en aguas residuales (Gard, 1940). La mayor parte de métodos de recuperación de virus utilizan las propiedades de las partículas víricas como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Además, tienen la capacidad de absorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo. Según los criterios establecidos por Wyn-Jones y Sellwood (2001), un método de concentración

óptimo debería cumplir los siguientes criterios: fácil de realizar en un tiempo relativamente corto, eficiencia de recuperación de partículas víricas elevada, capacidad de concentrar un amplio espectro de virus, permitir obtener un volumen final pequeño, económico, tener la capacidad de procesar un volumen de muestra adecuado a la concentración de partículas víricas presentes, repetible y reproducible. Con el objetivo de lograr los criterios descritos, se han utilizado aproximaciones de diferente tipo, tales como técnicas de absorción-elución (combinadas con floculación), ultrafiltración y ultracentrifugación.

- **Adsorción-elución:** Históricamente, los virus han sido recuperados mediante adsorción y elución en microfiltros (0.1 – 10 μm) combinado con la detección por cultivos celulares tradicionales. Sin embargo, debido a que los virus se propagan lentamente en líneas celulares específicas, frecuentemente se necesitan varias semanas para detectar su presencia mediante ensayos en placa o la observación de efecto citopático, convirtiendo así su detección en un proceso largo y costoso. Obviando el hecho que algunos virus entéricos, como NoV, RV o HAV, son difíciles o imposibles de replicar por cultivo celular. Los virus contenidos en la muestra se ponen en contacto con una matriz en la que serán adsorbidos en unas condiciones específicas de pH y fuerza iónica. Una vez adsorbidos, se descarta el agua en la que estaban suspendidos originariamente, y a continuación son eluidos de la matriz en un pequeño volumen. La elección de la matriz adsorbente, líquido eluyente y condiciones del proceso dependerán de la naturaleza de la muestra y de la experiencia, pero es muy frecuente utilizar soluciones que contienen extracto de carne o leche desnatada a pH elevado, que desplazan los virus de la matriz. También se usan soluciones de glicina/NaOH. Ocasionalmente, la concentración alcanzada no es suficiente para su posterior detección, en cuyo caso se requiere una concentración secundaria. Ésta, se puede realizar mediante coagulación-floculación, en la que el virus es adsorbido a los flóculos, recuperado mediante centrifugación y disueltos en pequeños volúmenes de buffer fosfato neutro. Numerosos protocolos utilizan la filtración a través de membranas electronegativas y electropositivas con una posterior elución con solución de extracto de carne y/o precipitación con polietilenglicol (Wallis y Melnick, 1967; Homma *et al.*, 1972; Gerba *et al.*, 1978; Landry *et al.*, 1978; Smith y Gerba, 1982; Rose, 1984).
- **Ultrafiltración:** Las muestras se hacen pasar a través de filtros con tamaño de poro menor que los virus (0,001 – 0,1 μm), por lo que son retenidos. Actualmente se utilizan

membranas con un tamaño de poro que permite el paso del agua y los solutos de bajo peso molecular, pero excluye virus y macromoléculas que se concentran en la membrana. En estos sistemas en que el agua pasa directamente a través del filtro, los componentes no filtrables ocluyen la superficie del filtro, por lo que sólo son útiles para pequeños volúmenes de muestra, por lo que se han desarrollado modificaciones tales como la filtración con flujo tangencial o la ultrafiltración-vórtex. Las ventajas de la ultrafiltración son que la muestra no requiere preacondicionamiento (p.e. ajustar pH), y por lo tanto, una amplia variedad de virus pueden ser concentrados (Tsai *et al.*, 1993; Grassi *et al.*, 2010).

- **Ultracentrifugación:** Es un método poco selectivo, aunque capaz de concentrar todos los virus aplicando suficiente fuerza de gravedad y tiempo (p.e. 100.000 xg durante una hora). El volumen que puede ser procesado es relativamente pequeño, por lo tanto es una metodología muy útil asociada a muestras de pequeño volumen o como método de concentración secundario (Pina *et al.*, 1998a). El principal problema asociado a esta metodología reside en que es necesario disponer de una ultracentrifuga y debido a su elevado coste se dificulta la utilización en laboratorios de rutina y, por supuesto, en países con bajo desarrollo económico.

1.3. Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de enfermedades infecciosas

La producción y el consumo de mariscos bivalvos a nivel mundial se ha visto incrementada significativamente en los últimos años. Recientemente se ha descrito que tanto la captura de individuos que crecen libres como la producción en zonas de cultivo controladas han aumentado de aproximadamente 10,7 millones de toneladas en 1999 a 14 millones de toneladas en 2006 (Lee *et al.*, 2008b). Al mismo tiempo, el transporte de mercancías por transporte aéreo y marítimo, junto con la implementación de técnicas de preservación, ha permitido que un mayor número de consumidores de diferentes partes del mundo puedan acceder a un producto producido en aguas de mar lejanas. Este desarrollo en la distribución y el comercio representa un nuevo reto a la hora de garantizar unas condiciones microbiológicas adecuadas que garanticen la protección del potencial consumidor, particularmente en relación a la seguridad en el consumo de los moluscos bivalvos respecto virus patógenos. Muchas especies de bivalvos suelen consumirse vivas, crudas o poco cocinadas, originando así que los bivalvos se conviertan en un producto alimenticio de elevado riesgo para salud y provocando la necesidad de generar medidas exhaustivas de control para conseguir niveles aceptables de

contaminantes biológicos o químicos. Por otro lado, la distribución de productos crudos congelados ha extendido considerablemente el periodo de tiempo durante el que lotes de marisco contaminado son consumidos (Lee *et al.*, 2008b).

Los productos extraídos del mar constituyen una proporción muy importante de los recursos alimenticios a escala mundial. La actividad económica relacionada con la explotación de los criaderos naturales de moluscos bivalvos y su cultivo artificial tiene una gran importancia en la Comunidad Europea. En el Estado Español, esta actividad económica de gran trascendencia se ha establecido principalmente en las comunidades autónomas de Galicia y Cataluña, en las que las rías gallegas y Delta del Ebro constituyen un ecosistema muy propicio para su desarrollo, respectivamente. Las especies explotadas comercialmente incluyen la ostra plana (*Ostrea edulis*), ostrón (*Crassostrea gigas*), el mejillón común mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y atlántico (*Mytilus edulis*), varias especies de almeja (*Tapes spp.*, *Mercenaria mercenaria*), el berberecho (*Cerastoderma edule*), la navaja (*Ensis spp.*) y la vieira (*Pecten maximus*) (Lees, 2000). También existe una producción constante en el área del Delta del Ebro, dónde se cultiva principalmente ostrón y mejillón.

Los moluscos bivalvos son animales de carácter sedentario y de régimen alimentario exclusivamente filtrador. Las branquias, que se encuentran cubiertas de mucus y cilios vibrátiles, además de cumplir con la función respiratoria, retienen las partículas en suspensión, entre ellas, bacterias, virus y protistas planctónicos (Di Girolamo *et al.*, 1977). Las materias en solución contenidas en el agua también son absorbidas e incorporadas a su organismo. Además, el aumento de los aportes de aguas residuales al mar, debido al fuerte incremento de la población y a la actividad industrial, han comprometido la calidad sanitaria de las zonas costeras. Esta situación no solo conlleva cambios importantes en las características físico-químicas y biológicas del ecosistema marino, sino que constituye un riesgo potencial para la salud pública derivado del consumo directo de organismos marinos y de las actividades recreativas que se realizan en las aguas costeras contaminadas por aguas residuales. Varios patógenos bacterianos están involucrados en toxi-infecciones alimentarias asociadas con el consumo de mariscos, aunque son los virus la causa más frecuente (Potasman *et al.*, 2002) (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos patógenos asociados al consumo de moluscos bivalvos.

Microorganismo	Periodo incubación	Duración	Origen
<i>Salmonella typhi</i>	1 – 3 semanas	> 4 semanas	Heces humanas Agua residual
<i>Salmonella paratyphi</i>	1 – 10 días	2 – 3 semanas	Heces humanas Agua residual
Otras <i>Salmonella</i>	6 – 72 horas	4 – 7 días	Heces humanas Agua residual Heces de aves
<i>Yersinia enterocolitica</i>	24 – 48 horas	1 – 21 días	Heces y orina Agua residual
<i>Campylobacter</i>	2 – 7 días	3 – 6 días	Heces animales Heces aves
<i>Shigella</i>	24 – 72 horas	5 – 7 días	Heces humanas Agua residual
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 – 48 horas	2 – 14 días	Ambiente marino
<i>Vibrio vulnificus</i>	16 – 24 horas	2 – 3 días	Ambiente marino
<i>Vibrio cholerae</i> (O1 y O139)	1 – 5 días	2 – 5 días	Heces humanas Agua residual
<i>Vibrio cholerae</i> (no-O1/no-O139)	2 – 3 días	> 1 semana	Ambiente marino
Norovirus	1 – 3 días	20 – 72 horas	Heces humanas Agua residual
Hepatitis A virus	10 – 50 días	10 – 30 días ²	Heces humanas Agua residual
Astrovirus ¹	1 – 2 días	48 – 72 horas	Heces humanas Agua residual

¹Se han reportado muy pocas infecciones asociadas a astrovirus. ²Aproximadamente un 10% de los infectados por hepatitis A mantienen los síntomas durante 6 – 9 meses. (datos extraídos de Lee *et al.*, 2008b).

Como se muestra en la Tabla 4, se han descrito en todo el mundo numerosos brotes de HAV y NoV asociados al consumo de bivalvos, el más destacado entre ellos es el ocurrido en Shanghai (China) en 1988 donde se documentaron 300.000 casos de infectados por HAV tras la ingestión de almejas recogidas en una zona que recibía aportes de agua residual (Halliday *et al.*, 1991). El consumo de bivalvos se ha relacionado con el 70% de las hepatitis de tipo A diagnosticadas en Italia, 19% en Alemania, 25% en el Reino Unido o el 11% en Japón (Lees, 2000). Las gastroenteritis a menudo son también una consecuencia directa del consumo de moluscos bivalvos contaminados con NoV. En el Reino Unido, entre 1965 y 1983, el 37% de los brotes infecciosos declarados relacionados con el consumo de bivalvos fueron causados por NoV, el 17% por HAV y en el 43% no se identificó el agente (Lees, 2000). Los datos epidemiológicos recogidos han demostrado estacionalidad en la aparición de infecciones producidas por el consumo de moluscos bivalvos, siendo más predominantes en los meses fríos (Lees, 2000).

Tabla 4. Infecciones víricas atribuidas al consumo de moluscos bivalvos^a.

Virus	Año	País	Afectados	Origen
HAV	1955	Suecia	629	almejas
	1961	USA	84	ostras
	1973	USA	263	ostras
	1978	UK	41	mejillones
	1984	Italia	75	mejillones, almejas
	1988	China	300.000	almejas
	1994	Italia	620	mejillones
	1996	Italia	271	diversas especies
	1999	España	183	berberechos
	2005	USA	39	ostras
	2007	Francia	111	almejas, ostras
	2008	España	29	berberechos
	NoV	1976 – 1977	UK	800
1977		USA	83	almejas
1978		Australia	2.000	ostras
1980 – 1994		USA	126	almejas
1982		USA	1.472	almejas, ostras
1983		USA	2.000	almejas
1991		Canadá	200	ostras
2002		Francia	127	ostras
2002		Italia	200	ostras
2004		Canadá	53	ostras
2005		España	266	ostras, navajas
2007		Suecia	30	ostras

^aDatos recopilados en: Le Guayader *et al.*, 1996; Lipp y Rose, 1997; Wallace *et al.*, 1999; Croci *et al.*, 2000; Lees, 2000; Bosch *et al.*, 2001; Le Guyader *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007; Shieh *et al.*, 2007; AESAN, 2008; Guillois-Bécel *et al.*, 2009; Nenonen *et al.*, 2009; Galmés Truyols *et al.*, 2011.

1.3.1. Legislación y zonas de producción de marisco

Tanto la normativa europea como la americana clasifican las zonas de producción de moluscos bivalvos en función del grado de contaminación fecal estimada a partir de la medición de indicadores bacterianos. Una de las principales diferencias radica en que en la Unión Europea la medición se realiza sobre la carne y el líquido intervalvar de los moluscos, mientras que en los Estados Unidos se hace sobre las aguas de producción.

El actual sistema de clasificación para determinar la calidad de las zonas producción de marisco emplea a *E. coli* como organismo indicador de los niveles de contaminación fecal y se basó originalmente en la legislación francesa. Las negociaciones basadas en el modelo francés dieron lugar a la creación de la Directiva 91/492/CEE del Consejo (Anónimo, 1991), del 15 de julio de 1991, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el

mercado de moluscos bivalvos vivos. Dicha directiva se mantuvo vigente hasta la aparición de las nuevas regulaciones del Parlamento Europeo y del Consejo de 2004 y 2008, relativo a la higiene en alimentos de origen animal destinadas al consumo humano (Anónimo, 2004a, b, c, 2008). En el estado Español, la normativa de control de calidad sanitaria de los moluscos bivalvos se recoge dentro de los Reales Decretos 308/1993 y 571/1999 (Anónimo, 1993; Anónimo, 1999).

Actualmente, el sistema europeo de clasificación para las áreas de producción de marisco se basa exclusivamente en el número de *E. Coli* presentes en la carne del animal. La clasificación de las zonas de cultivo (A – C) se realiza anualmente por agencias propias de cada país estableciendo de esta manera la siguiente clasificación:

- **Zonas clase A:** Áreas de producción donde el cultivo del marisco es adecuado para que los moluscos bivalvos obtenidos puedan ser destinados directamente al consumo humano. Los moluscos bivalvos vivos de estas zonas de producción deben presentar una concentración de *E. coli* menor a 230 MPN por cada 100g de carne del molusco y líquido intervalvar.
- **Zonas clase B:** Los moluscos bivalvos obtenidos aquí podrán ser destinados al consumo humano después de aplicar un proceso de depuración o de su reinstalación en una zona de cultivo clase A. Los moluscos bivalvos vivos en esta zona deben tener un número de *E. coli* igual o menor 4.600 MPN por 100g de carne en el 90% de las muestras (esta última puntualización se recoge dentro de Anónimo, 2006).
- **Zonas clase C:** El producto procedente de estas zonas de cultivo podrá ser destinado al consumo humano únicamente después de haber sido reinstalado en una zona clase A durante un periodo mínimo de 2 meses, o tras una depuración intensiva a fin de cumplir las condiciones mencionadas anteriormente. Los moluscos bivalvos vivos tendrán que contener un número de *E. coli* inferior a 46.000 MPN por 100g de carne.

Debido a la ausencia de metodología estandarizada para la detección de virus y de normativa que regule la calidad virológica, tal y como se ha mencionado, el control sanitario se basa en el recuento de bacterias fecales. Así pues, los moluscos bivalvos destinados al consumo humano inmediato deben cumplir básicamente con niveles establecidos para una zona de categoría A, y no contener *Salmonella* en 25g de carne. Además, deben cumplir con

las características visuales propias de frescura y viabilidad y no contener compuestos tóxicos o nocivos (toxinas, metales pesados y/o pesticidas).

El Comité Europeo de Estandarización está elaborando actualmente protocolos y técnicas estándar para la detección de HAV y NoV en alimentos a través del grupo de trabajo CEN/TC 275/WGG/TAG4.

1.3.2. Estrategias para eliminar la contaminación microbiológica tras la recolección

Debido a que no siempre se consiguen garantizar los niveles microbiológicos pretendidos, ya sea porque la zona de cultivo no cumple con la normativa establecida o porque se haya producido una contaminación puntual en el proceso de producción o de recolecta de los bivalvos. Existen diversas estrategias para reducir la presencia de microorganismos y poder así garantizar un producto competente frente las exigencias del mercado. Los sistemas más ampliamente utilizados se describen a continuación:

- **Temperatura:** los tratamientos por calor o por cocción se utilizan para reducir el nivel de contaminación microbiológica cuando el marisco se comercializa como producto procesado. Se aplican diversos tratamientos entre los cuales se encuentra la pasteurización y la esterilización al enlatar. Los procesos de cocción se establecen bajo la decisión de la Comisión Europea del 30 de octubre de 2003 (Anónimo, 2003), donde se determina que la temperatura interna de la carne de los moluscos bivalvos deben alcanzar 90 °C durante al menos noventa segundos. También se considera la opción de someter al alimento de 3 a 5 minutos en un recipiente cerrado bajo una temperatura de 120 – 160 °C y una presión de 2 – 5 Kg/cm². El conjunto de estos y otros parámetros no mencionados aquí están basados en datos obtenidos de estabilidad para HAV en almejas. Debido a que NoV no puede cultivarse *in vitro*, no se han podido realizar estudios sobre su persistencia e inactivación, aunque estudios realizados con feline calicivirus (FCV), utilizado como microorganismo modelo para NoV, han demostrado que en moluscos bivalvos se inactivan por tratamientos térmicos más fácilmente que HAV (Slomka y Appleton, 1998; Doultree *et al.*, 1999). De todos modos, la cocción ligera habitual que se realiza en hogares y restaurantes no es efectiva para lograr una reducción de la contaminación de origen fecal que sea totalmente aceptable a nivel microbiológico. Se ha detectado la presencia de RV y HAV en

mejillones cocinados al vapor minutos después de que se abrieran las valvas (Abad *et al.*, 1997a).

- **Presión hidrostática:** El procesado mediante una elevada presión hidrostática se utiliza habitualmente en la industria alimentaria con el objetivo de inactivar a los microorganismos no deseados, tales como *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., y *E. coli* O157:H7 (revisado en Corbo *et al.*, 2009), también ha sido propuesto para la inactivación de *Vibrio parahaemolyticus* (Kural *et al.*, 2008; Ma y Su, 2011). Generalmente se utilizan presiones que oscilan entre 300 y 700 MPa, efectivas para inactivar la mayoría de bacterias en su forma vegetativa, aunque las esporas bacterianas pueden resistir a la aplicación de estas presiones. Entre los beneficios de la utilización de este tipo de tratamiento encontramos la rapidez y la uniformidad en la aplicación, así como el mantenimiento de las propiedades organolépticas ya que se trata de un proceso isotérmico. El principal inconveniente reside en el elevado coste económico que representa. Este tipo de tratamiento suele utilizarse comercialmente para la eliminación de *Vibrio* spp. en ostras (López-Caballero *et al.*, 2000; Murchie *et al.*, 2005), además, algunos estudios recientes han demostrado su utilidad frente a ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Collins *et al.*, 2005), HAV y FCV en marisco crudo (Calci *et al.*, 2005; Kingsley *et al.*, 2007; Kingsley *et al.*, 2009; Terio *et al.*, 2010).
- **Depuración:** Este tratamiento se aplica en la mayoría de especies de moluscos bivalvos que se comercializan vivos. Los procesos de depuración se aplicaron por primera vez en la segunda década del s. XX (citado en Lees, 2000), pensado como una manera de aprovechar el proceso natural de purgación de contaminantes tras la filtración de agua de mar limpia. Como se ha mencionado anteriormente, los bivalvos bioacumulan de forma pasiva diferentes partículas sólidas y microorganismos patógenos, y cuando se aplica un tratamiento de depuración con agua de mar con niveles muy bajos de nutrientes, los moluscos se van alimentando del material retenido en su glándula digestiva, disminuyendo así el tamaño y peso de la glándula (Muniain-Mujika *et al.*, 2002). Los diferentes procesos de depuración existentes suelen aplicarse durante una semana, aunque 24 – 48 horas es el periodo aplicado más frecuentemente. Existe una gran variedad de sistemas de depuración, algunos de ellos mantienen el agua estática mientras que en otros se requiere que el agua esté circulando continuamente, reciclándola tras pasar por un proceso de esterilización. Las principales ventajas e

inconvenientes de los tres principales sistemas de esterilización, irradiación con luz UV, cloración y ozonización (Lees, 2000) se describen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de tres sistemas de desinfección de agua.

Condición valorada	Luz ultravioleta	Cloración	Ozonización
Costos de capital	Bajo	Medio	Elevado
Costos operacionales	Muy bajo	Bajo	Elevado
Instalación	Simple	Compleja	Compleja
Mantenimiento	Sencillo	Moderado	Difícil
Costo de mantenimiento	Bajo	Medio	Elevado
Rendimiento	Excelente	Posible recrecimiento	Poco fiable
Claridad de la fuente de agua	Elevada	Baja	Media
Efecto virucida	Bueno	Pobre	Bueno
Riesgos para el personal	Medio	Elevado	Medio
Químicos tóxicos	No	Sí	Sí
Efecto residual	No	Sí	Ligeramente
Efecto sobre el agua	Ausente	Trihalometanos	Toxicidad
Problemas operacionales	Bajo	Medio	Elevado
Contacto (tiempo o distancia)	1 – 5 segundos	30 – 60 mm	10 – 20 mm
Efecto en el marisco	Ausente	Irritante	Oxidante

Basado Lee, 2008b.

En el pasado se habían utilizado también sistemas que incorporaban yodóforos, con la intención de desinfectar el agua de mar mediante un efecto microbicida (incluyendo virus), dejando concentraciones residuales para una desinfección latente. Actualmente los yodóforos han quedado relegados. De entre estos sistemas de depuración, la aplicación de luz UV es la técnica más comúnmente utilizada. El efecto germicida propio de la longitud de onda y los niveles de energía son esenciales para una inactivación efectiva de los microorganismos patógenos. Aunque está bastante aceptado que los actuales sistemas de depuración tienen un poder limitado para eliminar patógenos víricos, existe un consenso general que estipula una dosis de UV de al menos 400 J/m^2 (citado en SARF, 2010).

La cloración es un sistema de depuración aceptado en todo el mundo por su poder biocida y elevada efectividad para eliminar microorganismos, aunque existen algunos contratiempos en su aplicación que continúan siendo tema de estudio y discusión. Debido a que el cloro es un poderoso agente oxidante, reacciona generando productos secundarios como el cloroformo y las cloraminas, productos no deseados que se acumulan en el interior de los tanques de depuración. Estudios previos han comparado la reducción bacteriana entre un sistema de depuración que utiliza agua de mar sin tratar y otro que utiliza agua de mar clorada, observando que la reducción del agua sin tratar es mayor que la tratada y sugiriendo

así que un exceso de cloración podría retrasar el proceso natural de depuración (citado en SARF, 2010). Lee *et al.* (2008b) sugiere que antes de utilizar este sistema de depuración es necesario reducir el cloro libre por debajo de 0,1 mg/L, permitiendo así una depuración eficiente. En la industria francesa se recomienda una dosis de cloro de 3 mg/L con 1 hora de contacto (MPM, 2003), coincidiendo con la dosis recomendada por UK y el manual FAO (Lee *et al.*, 2008b).

La ozonización como sistema de depuración se ha implementado consistentemente en Italia y España, el manual de depuración de la FAO (Lee *et al.*, 2008b) propone unas tasas de ozonización que no excedan los 0,5 mg/L con un tiempo de contacto de 10 minutos. La normativa aplicada en industria francesa productora de marisco (MPM, 2003) recomienda unas dosis de ozono de 0,5 – 1,5 mg/L durante 6 minutos de tiempo de contacto. Debido a que el ozono residual puede tener un impacto letal respecto el marisco que está siendo desinfectando, la mayoría de sistemas de ozonización utilizan generadores externos al tanque donde se depura el marisco, permitiendo una desinfección efectiva y una caída del ozono residual hasta valores aceptables. Croci *et al.* (1992) realizó estudios con moluscos bivalvos dopados con poliovirus y HAV, donde se realizaron depuraciones de 72 horas y se comparó la eliminación de poliovirus con agua de mar sin tratar respecto agua de mar ozonizada (1 mg/L). Los resultados mostraron una caída mayor de la carga viral en las muestras que recibían agua ozonizada, aunque también se observó que la depuración no fue totalmente efectiva (Tabla 6).

Tabla 6. Depuración de mejillones contaminados con poliovirus 1.

Tiempo (h)	Poliovirus 1 (TCID ₅₀ /mL)	
	agua de mar sin tratar	agua de mar ozonizada
0	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}
2	10 ^{3.5}	10 ^{3.0}
24	10 ^{3.0}	10 ^{1.5}
48	10 ^{2.7}	10 ^{1.5}
72	10 ^{2.5}	10 ^{1.5}

Datos extraídos de Croci *et al.* (1992).

Además de los sistemas de depuración aquí descritos, también se utiliza otros tratamientos menos comunes o incluso la combinación de los mencionados anteriormente. La aplicación del sistema de flotación por aire disuelto (DAF) es un tratamiento muy efectivo tanto para la separación de sólidos en suspensión como para grasas y aceites. La separación se consigue introduciendo finas burbujas de aire en la fase líquida. Las burbujas se adhieren a las partículas, y la fuerza ascendente que experimenta el conjunto partícula-burbuja de aire hace

que suban hasta la superficie del líquido. De esta forma, es posible hacer ascender a la superficie partículas cuya densidad es mayor que la del líquido, además de favorecer el ascenso de aquellas de densidad menor al líquido, como es el caso de los aceites en agua (citado en SARF, 2010). Debido a que los microorganismos contaminantes que se encuentran en suspensión tienden a adherirse a las partículas sólidas, éstos acaban acumulándose también en la espuma superficial generada. De manera que, al eliminar la espuma estaremos reduciendo la carga microbiológica total. De forma habitual, los sistemas DAF utilizan bombas de alta presión y el sistema venturi (donde un fluido en movimiento dentro de un conducto cerrado disminuye su presión al aumentar la velocidad después de pasar por una zona de sección menor) para disolver el aire en la columna de agua. Este tipo de depuración ha mostrado ser efectivo para la eliminación de bacterias, aunque no ha mostrado buenos resultados respecto los virus (Boher *et al.*, 1992).

La reinstalación es una de las posibilidades contempladas por la legislación europea, la cual implica la transferencia de los animales recolectados a estuarios limpios para que se produzca una auto-depuración en un ambiente natural. Este proceso puede utilizarse como una alternativa económica y natural frente a la aplicación de cualquiera de los tratamientos planteados anteriormente. La principal ventaja consiste en que el marisco se puede dejar en su nuevo ambiente durante periodos de tiempo más largos que en los tanques de depuración, aunque resulta difícil poder controlar las condiciones del nuevo entorno así como de encontrar de estuarios lo suficientemente limpios como para que la depuración se realice a niveles satisfactorios para los requisitos exigidos por el mercado.

1.3.3. Microorganismos modelo

La detección de microorganismos patógenos transmitidos por la ruta fecal-oral a menudo requiere de una metodología con un elevado coste económico. Por otro lado, no es factible incluir técnicas moleculares para el análisis de todos y cada uno de los microorganismos patógenos de interés. Por estos motivos, es necesario utilizar microorganismos indicadores que podamos asociar a la calidad del agua y de los moluscos bivalvos. Históricamente, se han utilizado los indicadores bacterianos (coliformes fecales, principalmente *E. coli*, y *Salmonella*) para evaluar la contaminación de origen fecal. No obstante, la descripción de brotes infecciosos de etiología vírica en ausencia de las bacterias indicadoras ha puesto en entredicho su utilidad para garantizar la calidad sanitaria de los bivalvos (Christensen *et al.*, 1998). Por este motivo, se han propuesto otros microorganismos

como modelo de virus entéricos humanos. Entre ellos encontramos, los colifagos somáticos, los fagos de RNA F-específicos, los bacteriófagos de *Bacteriodes fragilis*, los enterovirus infecciosos y los adenovirus humanos.

Colifagos somáticos. Inician la infección uniéndose a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospedadores; suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero también pueden hacerlo en medios acuáticos. Los colifagos somáticos incluyen una gran variedad de fagos (que pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*) con diferentes tipos morfológicos. Se detectan en heces humanas y animales (granja, zoológico y salvajes) a concentraciones que oscilan entre $<10^2 - 10^8$ unidades formadoras de placa (UFP)/mL (IAWPRC, 1991), mientras que en aguas residuales se encuentran en valores de $10^5 - 10^6$ UFP/g. Éstos, se propusieron como microorganismos indicadores de contaminación fecal (Kott *et al.*, 1974; IAWPRC, 1991) y se han realizado una gran variedad de estudios sobre su eficiencia. No obstante, el hecho de que determinados colifagos sean capaces de replicarse en *E. coli* sugiere que su capacidad de multiplicarse en el medio ambiente imposibilite su utilización como microorganismos indicadores de la contaminación fecal.

Fagos de RNA F-específicos. Los fagos F-específicos (Havelaar y Hogemoon, 1984; Havelaar, 1993; IAWPRC, 1991; ISO, 2000) son miembros de la familia *Leviviridae* (fagos con genoma de RNA y cadena simple) y *Inoviridae* (fagos DNA de cadena simple). Este grupo de fagos inicia la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F- o sexuales) de las *E. coli* hospedadoras, que producen exclusivamente las bacterias portadoras del plásmido F (de fertilidad). Dado que las fimbrias F se producen únicamente en la fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30 °C, no es probable que los colifagos de RNA F-específicos sean capaces de replicarse en ambientes diferentes del aparato digestivo de los animales de sangre caliente. Los fagos F-específicos son poco frecuentes en heces humanas y de animales ($<10^3$ UFP/g), aunque en agua residuales se han encontrado en rangos de entre $10^3 - 10^4$ UFP/mL. La detección se realiza principalmente sobre el mutante WG49 de *Salmonella cholerasuis* subespecie *cholerasuis* serotipo *Typhimurium* DTCC 700730/NCTC 12484 (Havelaar y Hogeboom, 1984) que contiene un plásmido que codifica para la formación de los pilis sexuales. También se utiliza la cepa mutante HS(pFamp)R de *E. coli*, esta cepa parece recuperar más fagos F-DNA que F-RNA. Se ha demostrado la multiplicación del fago GA (fago F-RNA del serotipo II en agua residual pasteurizada y en agua de mar y río a 20 °C cuando la bacteria huésped había crecido previamente a 37 °C (Havelaar y Hogeboom, 1988). De

modo que su replicación podría estar restringida a ambientes con una aportación fecal directa, además de necesitar una concentración elevada de fago y de bacteria huésped. Estos requisitos hacen que la multiplicación de los fagos RNA F-específicos sean poco probables en ambientes distintos a los sistemas de aguas residuales.

Fagos de *Bacteroides fragilis*. El género bacteriano *Bacteroides* habita en el aparato digestivo humano ($10^9 - 10^{10}$ UFC/g) en cantidades mayores que *E. coli* ($10^6 - 10^8$ UFC/g). Las bacterias del género *Bacteroides* se inactivan rápidamente por la concentración de oxígeno ambiental, pero los bacteriófagos de *Bacteroides* son resistentes a las condiciones desfavorables. Hay dos grupos de fagos de *Bacteroides fragilis* que se utilizan como indicadores para la evaluación de la calidad del agua. Uno es un grupo limitado de fagos que utiliza específicamente como hospedador la cepa HSP40 de *Bacteroides fragilis*. Este grupo de fagos tiene la propiedad única de encontrarse exclusivamente en heces humanas y no en las de otros animales. Al parecer, las concentraciones de estos fagos en aguas residuales son relativamente bajas y están prácticamente ausentes en algunas regiones geográficas (Puig *et al.*, 1999). Los fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 forman parte de la familia *Siphoviridae* y tienen colas flexibles sin capacidad contráctil, DNA bicatenario y cápsides de un diámetro de hasta 60 nm. El segundo grupo de fagos de *Bacteroides* utilizados como son huéspedes de la cepa RYC2056 de *Bacteroides fragilis*. Este grupo abarca una gama sustancialmente más amplia de fagos, los cuales están presentes en las heces del ser humano y de muchos otros animales. La concentración de estos fagos en las aguas residuales es, por lo general, sustancialmente mayor que la de los fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 (Puig *et al.*, 1999). Los requisitos nutricionales y el carácter anaeróbico del huésped hacen que la replicación de estos fagos en el medio ambiente sea poco probable. Un 10% de la población presenta niveles de excreción de hasta 10^8 UFP/g (Tartera y Jofre, 1987), y en aguas residuales se encuentran concentraciones de $<10^0 - 10^3$ UFP/mL. El número de UFP de fagos de *Bacteroides fragilis* detectados en diferentes muestras ambientales (agua, sedimentos, moluscos bivalvos) es superior al de enterovirus, tanto en valores numéricos como en porcentaje de muestras positivas, y se correlaciona adecuadamente en muestras de agua residual y agua marina (Tartera *et al.*, 1988; Jofre *et al.*, 1989; Lucena *et al.*, 1994; Pina *et al.*, 1998b). El principal inconveniente respecto otros microorganismos modelos propuestos consiste en que la detección es baja, lo que supone la necesidad de concentrar grandes volúmenes de agua para que su detección sea posible (Lucena *et al.*, 1994).

Enterovirus infecciosos. Los EV se han utilizado como parámetro de estudio de la contaminación vírica en el ambiente debido a que mayoritariamente pueden aislarse y cuantificarse mediante cultivo celular (Rao *et al.*, 1986). Su distribución en el ambiente también se ha estudiado por técnicas basadas en la detección del ácido nucleico, aunque diversos estudios han evidenciado la carencia de correlación con importantes patógenos como HAV (Puig *et al.*, 1994; Pina *et al.*, 1998b). Algunos autores sugieren la utilización de los poliovirus en la monitorización de la contaminación vírica en el ambiente, aunque su prevalencia en el ambiente ha ido disminuyendo durante los últimos años (Pina *et al.*, 1998b). En cualquier caso, la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) describió a los virus entéricos como el índice vírico más significativo, seguro y efectivo en el ambiente (Karaganis *et al.*, 1983). En la directiva europea respecto los ambientes acuáticos los enterovirus son el único grupo de virus que ha sido contemplado en la normativa de aguas de baños, aunque no ha sido incluido en las últimas revisiones.

Adenovirus humanos. Como se ha ido remarcando a lo largo de los diferentes apartados aquí discutidos, los virus se encuentran potencialmente en todos los ambientes acuáticos naturales, llegando a concentraciones de $10^7 - 10^8$ partículas víricas por mL, valores que son superiores a los detectados para bacterias (Pina *et al.*, 1998b). La presencia de HAdV se ha descrito en aguas de río y superficiales (Pina *et al.*, 1998b; Albinana-Gimenez *et al.*, 2006; Bofill-Mas *et al.*, 2011), agua de mar (Pina *et al.*, 1998b; Calgua *et al.*, 2008; Wyn-Jones *et al.*, 2011), agua de piscinas (Papapetropoulou y Vantarakis, 1998; van Heerden *et al.*, 2005), agua subterránea (Kukkula *et al.*, 1997; Ogorzaly *et al.*, 2010) y agua potable (van Heerden *et al.*, 2005; Albinana-Gimenez *et al.*, 2006; Albinana-Gimenez *et al.*, 2009). Además, está presente en cerca del 100% de las muestras de agua residual (revisado en Girones *et al.*, 2010) y se detecta frecuentemente en moluscos bivalvos, incluyendo las muestras que cumplen con la actual legislación respecto la calidad microbiológica (Formiga-Cruz *et al.*, 2002; Rigotto *et al.*, 2010). Diversos estudios realizados sugieren la aplicación de HAdV como nuevos indicadores de la contaminación fecal (Puig *et al.*, 1994; Pina *et al.*, 1998b) y recientemente la USEPA los ha incluido dentro del listado de contaminantes potencialmente peligrosos, en base a su elevada prevalencia en agua residual, su capacidad de producir enfermedades y su resistencia a tratamiento de depuración de aguas, especialmente irradiación por UV. Todos los estudios realizados refuerzan la idea de utilizar los HAdV como indicador de la contaminación vírica de origen humano.

1.4. Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos

1.4.1. Antecedentes

La evaluación de riesgos microbiológicos (ERM) es un nuevo instrumento para el análisis de la seguridad de los suministros de alimentos y de agua. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) desempeñan una función central en la elaboración y normalización de la ERM a nivel internacional, a fin de informar acerca de la gestión de riesgos en los alimentos tanto en el ámbito nacional como internacional (FAO/OMS, 2003). La Comisión Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Aplicación del Análisis de Riesgos para las Normas Alimentarias en 1995 fue el primero en este ámbito. Éste perfilaba la terminología básica y los principios de la evaluación de riesgo y concluyó que el análisis de riesgo asociado con los peligros microbiológicos presenta un extraordinario reto. El análisis de riesgos es hoy considerado una parte integral de los procesos de decisión y elaboración por parte de la Comisión del Codex Alimentarius (CCA). La CCA ha adoptado las definiciones de los conceptos del análisis de riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos y la declaración de principios respecto a la función de la evaluación de riesgos en materia de inocuidad de los alimentos. En 1999 se adoptaron los principios y directrices para la evaluación de riesgos microbiológicos (CCA, 1999), elaborados por el Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH), que actualmente está trabajando para establecer los principios y directrices de la gestión de riesgos microbiológicos.

Desde 1980, cuando se realizaron los primeros estudios del tema, se ha utilizado la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (ECRM) para cuantificar la seguridad microbiológica en agua de bebida (Haas, 1983; Gerba y Haas 1988; Regli *et al.*, 1991; Rose *et al.*, 1991; Teunis *et al.*, 1994; Gibson *et al.*, 1999; Payment *et al.*, 2000). Estos estudios demostraron que la evaluación del riesgo, producto de la contaminación vírica también, podía ser analizada bajo el paradigma de la ERM. Existen varias razones por las que la ERM está emergiendo también dentro del ámbito de la calidad y seguridad microbiología de los alimentos. En primer lugar, los adelantos informáticos están permitiendo desarrollar herramientas potentes para realizar los análisis de riesgos necesarios y, en segundo lugar, la producción y distribución de alimentos ha alcanzado un nivel de complejidad que hace extremadamente difícil determinar de manera intuitiva los puntos críticos de control para garantizar niveles aceptables de carga microbiológica.

Tratando de definir el término de manera amplia, podemos considerar que los análisis de riesgos son la ciencia del riesgo y de su evaluación y probabilidad. Aunque, el concepto del que hablamos es mucho más complejo que esto, ya que comprende los siguientes elementos interconectados (Figura 3): evaluación de riesgos (evaluación científica de los efectos adversos conocidos o potenciales en la salud), gestión de riesgos (evaluación, selección y aplicación de alternativas de carácter normativo) y comunicación de riesgos (intercambio de información entre todas las partes interesadas). Aunque la separación funcional entre estos tres componentes es importante, hay un reconocimiento cada vez mayor de la necesidad de interacción entre ellos (FAO/OMS, 2003).

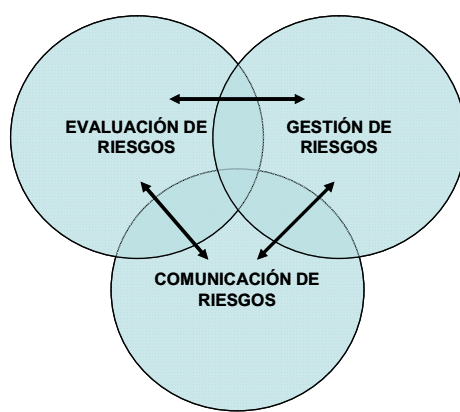


Figura 3. Interacción de los componentes básicos de los análisis de riesgos

1.4.2. Evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos

La ECRM nos proporciona un marco de trabajo complementario a la epidemiología para identificar el riesgo potencial y definir la ruta de acción sobre un patógeno particular desde la fuente al receptor. ECRM traduce la presencia ambiental de los patógenos de interés a una probabilidad de infección (riesgo microbiológico) a través del paradigma utilizado para los análisis de riesgos químicos (Haas *et al.*, 1999), no obstante, la utilidad de ECRM depende de la calidad, veracidad y uso apropiado de la información disponible sobre la frecuencia, persistencia y modelos de dosis-repuesta en humanos del microorganismo patógeno objeto del estudio en el ambiente.

Las técnicas utilizadas en los análisis cuantitativos de riesgos se desarrollaron originalmente para la evaluación del riesgo asociado a la exposición de agentes químicos (NAS, 1983). Cuando empezó a utilizarse la ECRM, el marco conceptual de los análisis de riesgos

químicos fue absorbido y directamente aplicado para evaluar el riesgo microbiológico. En el documento de la Comisión del Codex Alimentarius CAC/GL-30 (CCA, 1999) se definió la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos como un proceso con una base científica formado por cuatro componentes (Figura 4): Identificación de peligros, evaluación de la exposición, caracterización de peligros y caracterización de riesgos.

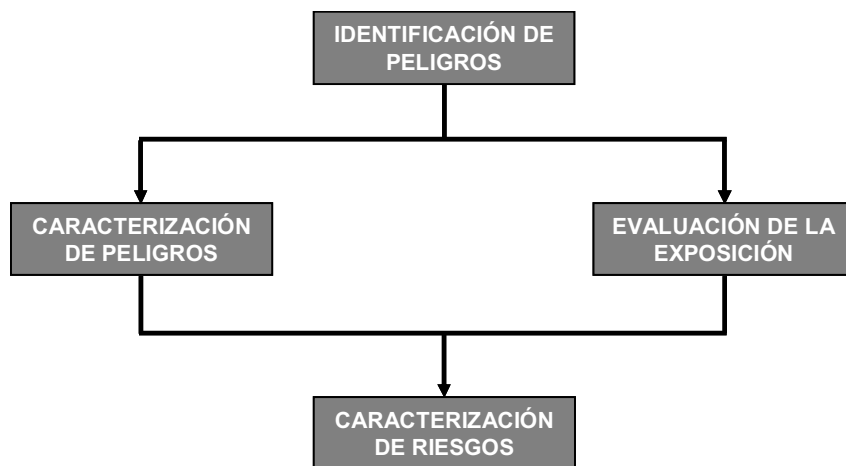


Figura 4. Componentes de una evaluación de riesgos microbiológicos

- **Identificación de peligros:** En esta fase se debe describir la variedad de patógenos que debemos considerar en nuestro análisis de riesgos. Identificando todas las características del microorganismo y recopilando toda la información existente.
- **Evaluación de la exposición:** Se debe valorar la magnitud de la exposición, el número de microorganismos consumidos, para cada evento de riesgo identificado.
- **Caracterización de peligros:** En este punto de la evaluación de riesgos se debe estimar la respuesta física (infección/enfermedad) de la población estudiada frente a la exposición del microorganismo. Se realizará mediante modelos de dosis-respuesta.
- **Caracterización de riesgos:** Este apartado engloba los resultados y estudios obtenidos en las tres anteriores etapas. Llegados a este punto se calculará la probabilidad de infección y enfermedad de la población expuesta al microorganismo patógeno estudiado.

El objetivo de una evaluación de riesgos consiste principalmente en estimar el nivel de infección y/o enfermedad provocado por un patógeno concreto en una población determinada, pero también se puede limitar a la evaluación de una o varias etapas de un sistema de producción o elaboración de alimentos. Cuando se solicita una evaluación de riesgos, el gestor de riesgos debe ser específico con respecto al problema que tiene que afrontar y las cuestiones que se han de abordar en la evaluación de riesgos e indicar las medidas que considera oportunas o de las que dispone para la reducción de la enfermedad.

1.4.3. Virus en alimentos

En el ámbito de la alimentación la ERM se ha centrado principalmente en patógenos bacterianos, debido a que los métodos disponibles para cuantificar virus infecciosos (y protozoos) en alimentos son generalmente más complejos o no se dispone de ellos de manera rutinaria. Debido a la limitación de información en este aspecto, en una reunión llevada a cabo por expertos del tema concluyeron que la ECRM sigue siendo un tema de estudio prematuro (citado en EFSA, 2011). Hasta el momento, se han publicado pocos trabajos basados en ECRM en alimentos y virus y los publicados se centran principalmente en NoV, HAV o virus entéricos, más ampliamente entendido, en moluscos bivalvos y productos cultivados (Petterson y Ashbolt, 2001; Petterson *et al.*, 2001; Stine *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2006; Bouwknecht *et al.*, 2009; Mokhtari y Jaykus, 2009; Pinto *et al.*, 2009; Munoz *et al.*, 2010).

1.5. Virus de la hepatitis A

1.5.1. Historia

La hepatitis viral es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Las primeras descripciones de epidemias de ictericia se encuentran en la literatura china y en los trabajos de Hipócrates, que datan del s. V a. de C. La naturaleza infecciosa de la enfermedad también se reconoció en el s. VIII, cuando el Papa Zacarías aludía el carácter aparentemente transmisible de la ictericia y la necesidad de mantener apartados a los enfermos.

Durante los s. XVII y XVIII fueron frecuentes las epidemias en Europa entre la población civil y militar. En el s. XIX se especuló con que la posible causa de la ictericia era la obstrucción biliar con un tapón de moco, por lo que se la llamó “ictericia catarral”. A principios del s. XX

algunos científicos empezaron a sospechar que el agente infeccioso responsable de la enfermedad podría ser un virus. Durante esta época aparecieron evidencias de una segunda forma de hepatitis transmitida aparentemente a través del suero humano: la “hepatitis sérica”. El agente etiológico se denominó virus de la hepatitis B (HBV). Ésta enfermedad era claramente diferente de la hepatitis infecciosa, llamada hepatitis A, y su agente etiológico se denominó virus de la hepatitis A (Melnick, 1995; Sánchez-Tápias, 1995; Hollinger *et al.*, 2001). Las dos enfermedades se diferenciaban claramente en el periodo de incubación (2 – 4 semanas en la hepatitis A frente a 1 – 3 meses en la hepatitis B) y en la vía de transmisión (fecal-oral en la hepatitis A y transmisión parenteral/sexual en la hepatitis B), (Hunter *et al.*, 1997).

El virus de la hepatitis A se consiguió propagar en primates no humanos en 1967. Estos estudios proporcionaron los primeros datos sobre alteraciones que la infección producía en el hígado (Deinhardt *et al.*, 1967).

En 1973 se consiguió visualizar por microscopía inmunoelectrónica partículas víricas de 27nm a partir de heces de pacientes, que reaccionaban con un anticuerpo específico procedente de suero de una persona convaleciente (Feinstone *et al.*, 1973). Esta partícula se identificó como el virus de la hepatitis A. Numerosos intentos para cultivar el virus sobre líneas celulares fracasaron. Únicamente los modelos animales permitían obtener virus purificados para poder iniciar estudios genéticos y realizar pruebas de estabilidad frente a diferentes agentes físico-químicos. Al mismo tiempo, se comenzaron a desarrollar ensayos que permitían diagnosticar la enfermedad y que hicieron posible iniciar estudios seroepidemiológicos.

En 1979 se consiguió la multiplicación *in vitro* de HAV sobre células derivadas de hígado o de riñón de mono (Provost y Hilleman, 1979). En los últimos 30 años se ha avanzado de forma espectacular en el conocimiento de la hepatitis A y su agente etiológico. Se ha conseguido clonar y secuenciar el genoma de HAV (Ticehurst *et al.*, 1983; Linemeyer *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987b; Paul *et al.*, 1987; Lemon *et al.*, 1991; Lemon *et al.*, 1992), se ha estudiado su estructura antigénica (Lemon *et al.*, 1991), el mecanismo de replicación viral (Agnès *et al.*, 1994; Bishop y Anderson, 1997a y b), las mutaciones que permiten la adaptación al cultivo *in vitro* (Cohen *et al.*, 1987a; Emerson *et al.*, 1993; Graff *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995), y se han realizado estudios epidemiológicos (Jansen *et al.*, 1990; Papaevangelou, 1992; Robertson *et al.*, 1991 y 1992; Melnick, 1995). La posibilidad de obtener grandes cantidades de virus en líneas celulares ha permitido la elaboración de vacunas basadas en virus inactivados y se ha evaluado su utilización para prevenir la enfermedad (Koff, 1998; Rosenthal, 1998).

1.5.2. Características moleculares

El virus de la hepatitis A está clasificado dentro de la familia *Picornaviridae* con un género propio, el género *Hepatovirus*. El genoma está constituido por una molécula de RNA monocatenaria lineal de unas 7,5 Kb, de polaridad positiva. El extremo 5' está unido covalentemente a una proteína VPg, y el extremo 3' está poliadenilado. En la organización genómica de HAV se diferencian tres regiones (Figura 5):

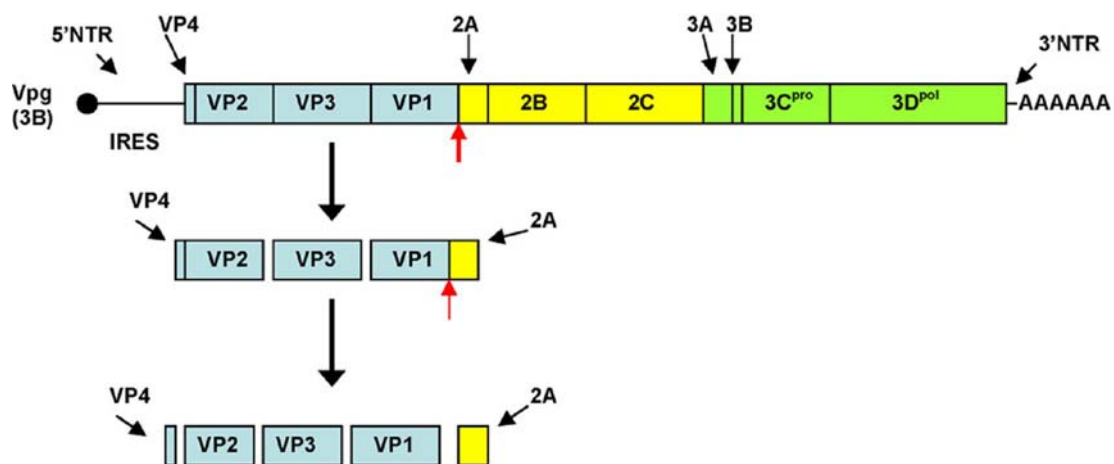


Figura 5. Organización genómica de HAV. El genoma está compuesto por una cadena de RNA de polaridad positiva que contiene una pauta de lectura abierta que codifica para una poliproteína potencialmente procesable por la proteasa viral 3C^{pro}. El lugar de anclaje de la proteasa en VP1/2A está indicado con una flecha roja. Las proteínas estructurales (P1) están indicadas en azul, las proteínas no estructurales (P2 y P3) están indicadas en amarillo y verde, respectivamente (Cristina y Costa-Mattioli, 2007)

- i. Región no codificante del extremo 5', que comprende aproximadamente el 10% del genoma. Es la región más conservada del genoma, con más de un 92% de identidad entre las diferentes cepas (Hollinger *et al.*, 2001). Contiene el punto de unión al ribosoma (IRES).
- ii. Contiene una única pauta de lectura abierta (ORF) que codifica las proteínas víricas: en la región P1 están codificadas las proteínas de la cápside, y en la región P2 y P3 las proteínas no estructurales. EL RNA genómico codifica una poliproteína de 2.227 aa (253 kDa) que es procesada para dar lugar a las proteínas de la cápside (VP4, VP3, VP2 y VP1) y a las proteínas no estructurales (2A, 2B, 2C; 3A, 3B= VPg, 3C= proteasa, 3D= RNA polimerasa).

- iii. Región no codificante del extremo 3', altamente estructurada y notablemente variable entre cepas.

Se postula que, a pesar de la variación genética, existen limitaciones estructurales en las proteínas de cápside de HAV que le permiten mantener su estructura antigénica sin modificaciones, presentando un único serotipo. Sin embargo, se han encontrado variantes virales con modificaciones vinculadas a sitios antigénicos, ya sea como parte de la mezcla de variantes de una población heterogénea o como secuencia predominante de un aislamiento clínico.

1.5.3. Características físico-químicas y estabilidad

Los viriones son partículas de 27 – 32 nm de diámetro con simetría icosaédrica, sin envuelta lipídica y sin estructuras superficiales (Feinstone *et al.*, 1973). Morfológicamente no se diferencia de los demás picornavirus. Las partículas presentan una densidad de flotación de 1,21 – 1,34 g/cm³ en cloruro de cesio, y un coeficiente de sedimentación de 150 – 160S en soluciones neutras de sacarosa. A partir de suspensiones fecales o en cultivos infectados se han podido detectar partículas no infecciosas que podrían corresponder a proviriones inmaduros con o sin RNA (Nüesch *et al.*, 1989; Bishop y Anderson, 1997a; Polish *et al.*, 1999).

La capacidad de resistencia de HAV frente a diferentes agentes químicos y en condiciones ambientales se describe en la Tabla 7. Es necesario destacar la gran estabilidad de la partícula vírica en el ambiente.

Tabla 7. Estabilidad de HAV en diferentes condiciones.

Agente	Condiciones	Estabilidad
Temperatura	a 4 °C	semanas-meses
	De -20 a -70 °C	años
	60 °C	1 h
	autoclavado	20 min a 121 °C
pH	A pH 3	3 h a 25 °C
Solventes	Éter, cloroformo, triclorotrifluoroetano	---
Cloro	10 – 15 ppm	30 min
	3 – 10 mg/L hipoclorito sódico	5 – 15 min
Otros agentes	3% formalina	5 min a 25 °C
	30 mg/L yodo	5 min
	Radiación ultravioleta	197 μW/cm ² 4 min
Condiciones ambientales	Aguas naturales y residuales, suelos, bivalvos y alimentos	días-meses
	Desecación	a <20 °C durante años
	Superficies	días-meses

Datos extraídos de Peterson *et al.*, 1983; Hollinger *et al.*, 2001.

1.5.4. Diversidad genética

Los primeros estudios indicaron que la secuencia de nucleótidos de HAV estaba muy conservada entre cepas aisladas de diferentes áreas geográficas. Sin embargo, la comparación de la secuencia de nucleótidos de la región VP1/2A de aislados de origen humano y animal ha conducido a la identificación de más de un centenar de cepas que se han clasificado en siete genotipos (I – VII) que difieren en un 15% – 25%, y en subgenotipos que se diferencian en un 7,5% (Robertson *et al.*, 1992). En estudios más recientes, Costa-Mattioli *et al.* (2002), han establecido relaciones filogenéticas utilizando la secuencia completa de VP1 (900 nucleótidos). Las conclusiones del trabajo determinan que HAV se debe clasificar en 6 genotipos diferentes, 3 aislados a partir de humanos (I – III) y 3 aislados a partir de primates (IV – VI).

La distribución geográfica de los diferentes genotipos de HAV detectados a escala mundial se describen en la Figura 6. El Genotipo I es el más prevalente en el mundo, y el subgenotipo IA es más común que el IB. Ambos subgenotipos son frecuentemente localizables en Norteamérica, Sudamérica, Europa, China y Japón (Robertson *et al.*, 1992; Costa-Mattioli *et al.*, 2001a, b).

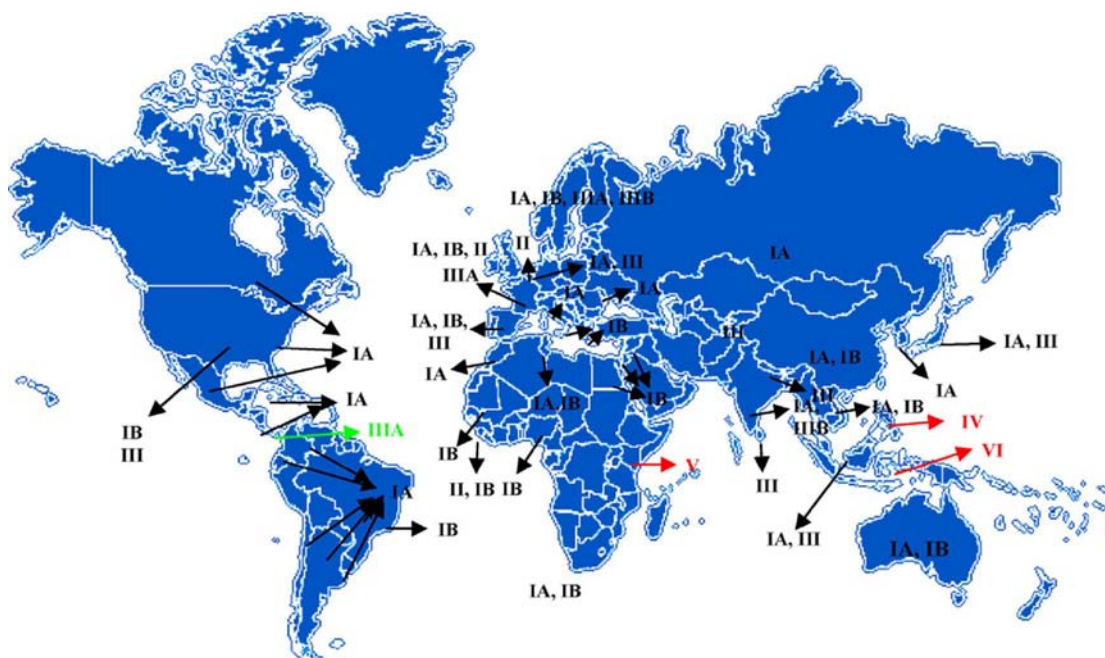


Figura 6. Distribución geográfica de los genotipos de HAV. Los genotipos aislados a partir de humanos están representados en negro y los genotipos aislados a partir de monos están representados en rojo. El genotipo IIIA aislado en primates autóctonos de Panamá está representado en verde (Cristina y Costa-Mattioli, 2007)

5.5. Diversidad serotípica

A pesar de la existencia de diferentes genotipos, existe únicamente un serotipo del HAV causante de la infección en humanos, y no se han descrito diferencias en el transcurso clínico de la enfermedad por las diferentes cepas.

1.5.6. Replicación del virus

Los cambios genéticos por recombinación homóloga y no homóloga son un fenómeno habitual en los virus RNA, permitiéndose así la generación de partículas víricas defectivas y de híbridos (Lai, 1992; Nagy *et al.*, 1997).

Una vez que el HAV ha entrado en contacto con la célula diana mediante un receptor de membrana específico, el RNA es traducido a la poliproteína P1 – P2 – P3. Las proteínas estructurales, VP1, VP2, VP3 y VP4, provienen todas del precursor P1. Así mismo, las proteínas no estructurales, incluyendo la proteínasa (3C) y polimerasa (3D) vírica, son liberadas a partir de los dominios P2 y P3 de la poliproteína, representando la mayoría de componentes del complejo replicativo (RC).

Cuando el RC está formado, el RNA vírico es utilizado como molde para la replicación, la cual tiene lugar en dirección opuesta a la traducción (Gamarnik y Andino, 1998). Además de las proteínas víricas, es necesaria la formación de los elementos de replicación en cis (CRE). Los componentes del virus y del huésped han sido estudiados mediante sistemas de traducción y replicación *in vitro* (Molla *et al.*, 1991).

Tras la traducción de las proteínas víricas, RC y del CRE, y de la replicación del genoma de HAV, tiene lugar la encapsidación, maduración y liberación de las partículas víricas a través de la membrana celular sin provocar un efecto citopático acusado.

1.5.7. Epidemiología

- La transmisión tiene lugar persona a persona a través de la vía fecal-oral, tanto de un modo directo como indirecto.
- Las vías de transmisión parenteral y sexual no son demasiado frecuentes.

- No hay ninguna evidencia que nos confirme una transmisión a través de la saliva o de un modo vertical.
- Existen brotes epidémicos asociados a agua o alimentos contaminada en áreas con condiciones sanitarias deficientes.
- La mayor tasa de incidencia de la enfermedad se detecta en niños jóvenes.
- Se ha observado una endemidad cíclica tras la aplicación de la vacunación.
- Se siguen manteniendo casos aislados de transmisión en poblaciones con una elevada distribución de la vacuna.

1.5.8. Zonas endémicas y no endémicas

El nivel de endemidad de HAV para una población determinada se define en función de los resultados obtenidos mediante estudios de seroprevalencia que estiman la proporción de cada grupo de edad que ha adquirido inmunidad frente a HAV, ya sea debido a una infección o inmunización, como queda demostrado por la presencia de anticuerpos IgG anti-HAV en suero (WHO, 2000). La hepatitis A es una enfermedad endémica (Figura 7). Existen áreas de alta endemidad: en el centro y sur de América, Medio Oriente, Asia y zonas del Pacífico occidental. En estas zonas, el 80% de los niños menores de 10 años, han padecido la enfermedad. Se estima que por un déficit en la notificación, la cantidad de casos reales es cinco veces superior a los declarados (Jacobsen y Wiersma, 2010).

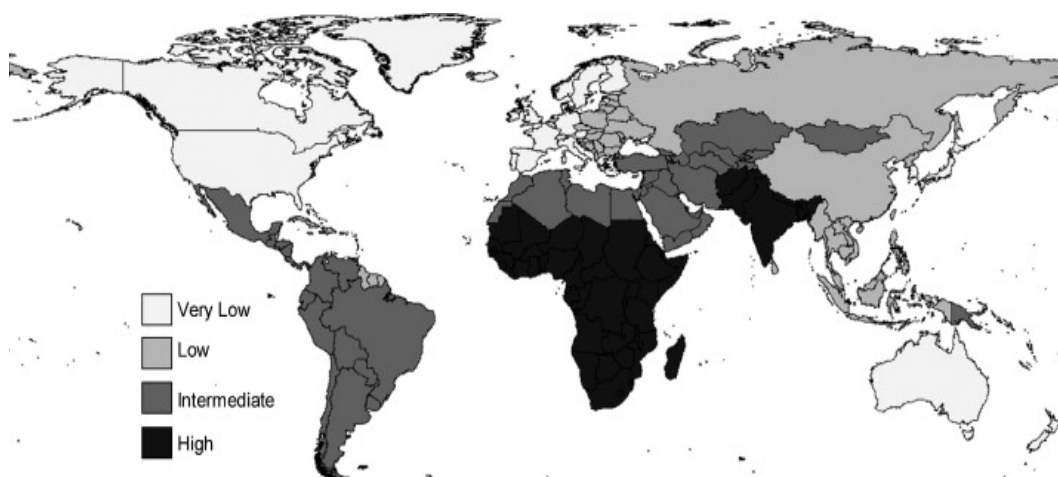


Figura 7. Distribución geográfica de la prevalencia estimada de HAV en el año 2005. Very Low: prevalencia muy baja; Low: prevalencia baja; Intermediate: prevalencia intermedia; High: prevalencia alta (extraído de Jacobsen y Wiersma, 2010)

Cuanto más baja es la propagación del virus, mas alta la probabilidad de contraer la infección a edad avanzada. En Sudamérica (de endemidad moderada, aunque con distinta incidencia según las zonas geográficas) son afectados niños, adolescentes y adultos jóvenes. No es una enfermedad mortal, pero hay una incidencia de casos fulminantes que oscila entre un 0,1 y 1% (hasta un 3% en mayores de 50 años), con alta mortalidad o necesidad de transplante hepático.

El virus de la hepatitis A presenta patrones de aparición cíclica, que oscilan con incidencias altas o bajas. Éstas están condicionadas por la acumulación de personas susceptibles y las condiciones socioeconómicas y medioambientales.

1.5.9. Seroprevalencia

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial, que puede presentarse en forma de casos esporádicos o bien en brotes epidémicos. La tasa de incidencia está estrechamente correlacionada con indicadores socioeconómicos así como con ella acceso a agua de consumo segura, en función del aumento del nivel económico y de la disponibilidad de agua, la incidencia de HAV decrece (Jacobsen y Koopman, 2004; 2005).

Según la prevalencia registrada se pueden diferenciar cuatro modelos epidemiológicos (endemidad alta, intermedia, baja y muy baja) correlacionados con la presencia de IgG anti-HAV de una región. La incidencia más alta de infección por HAV en el mundo se encuentra en países con un nivel sanitario poco desarrollado, dónde podemos observar una exposición universal durante la infancia y una seroprevalencia superior al 90%. En países en vías de desarrollo aparece el segundo modelo epidemiológico, endemidad intermedia. La incidencia en la población infantil es más baja, seroprevalencia del 20% – 30%, lo que produce un aumento en los adultos jóvenes expuestos a la infección con manifestaciones clínicas (Domínguez *et al.*, 1995; Melnick, 1995; Jacobsen y Wiersma, 2010). En países desarrollados aparece el modelo de endemidad baja. En estas zonas la enfermedad ocurre principalmente en adolescentes, adultos pertenecientes a grupos de riesgo y personas que han viajado a países de endemidad media o alta. Ocasionalmente aparecen brotes asociados al consumo de agua o alimentos contaminados (WHO, 2002). La prevalencia de anticuerpos es baja en la población infantil (<10%) y moderada en la población adulta (30% – 70%) (Dominguez *et al.*, 1995; Melnick, 1995). El cuarto modelo es exclusivo de países con un nivel socioeconómico muy elevado. En estas regiones las infecciones por HAV están desapareciendo. La

seroprevalencia en adultos jóvenes es inferior al 10% y en la población de edad más avanzada se sitúa entre el 30 y 60% (Dominguez *et al.*, 1995).

1.5.10. Profilaxis

Las buenas prácticas de higiene y la restricción de actividades de las personas enfermas que trabajan en la industria alimentaria son fundamentales. Los viajeros a áreas endémicas deben ser aconsejados para evitar la comida poco cocinada, especialmente vegetales y mariscos. Aunque ya no son tan utilizadas, las inmunoglobulinas proporcionan protección contra la hepatitis A a través de la transferencia pasiva de anticuerpos (inmunización pasiva). Se utiliza la preparación intramuscular cuyas únicas indicaciones son: inmunoprofilaxis previa a la exposición en viajeros a áreas endémicas (idealmente dos semanas antes del viaje), para personas que han ingerido alimentos manipulados por un paciente con hepatitis A aguda o para contactos sexuales de pacientes con hepatitis A. Los niveles séricos de anticuerpos neutralizantes persisten durante aproximadamente 18 semanas. Cuando se utiliza para profilaxis previa a la exposición se administra una dosis de 0.02 mL/Kg intramuscular, confirmando protección durante 3 meses. Cuando se administra dentro de las dos semanas posteriores a la exposición a hepatitis A, a las dosis señaladas, la eficacia protectora es del 85%. La eficacia es mayor cuando la inmunoglobulina es administrada temprano en el período de incubación. Cuando es administrada más tardíamente, sólo atenúa los síntomas de la hepatitis aguda. No se recomienda su utilización en personas que son contactos casuales de los pacientes (colegio o trabajo).

En Febrero de 1995 se licenció en los Estados Unidos una vacuna de virus inactivado (Havrix), para uso en personas de más de dos años de edad (CDCP, 1995). La vacuna no está aprobada para uso en niños menores de dos años por la preocupación de que los niños que pueden haber adquirido anticuerpos de la madre podrían tener una respuesta menor a la vacuna (Fiore *et al.*, 2003). Se recomienda también para viajeros a áreas endémicas y otros grupos de riesgo. Cada mL de vacuna para adultos contiene 1.440 Unidades ELISA de antígeno viral. La dosis recomendada para adultos es de 1 mL intramuscular en el deltoides, y un refuerzo de 1 mL 6 a 12 meses más tarde (Craig *et al.*, 2004). Los niveles de protección se detectan en adultos en un 80 a 98% dos semanas después de la primera dosis y 96% después de un mes (WHO, 2000). Existen otras presentaciones comerciales de vacuna inactivada de hepatitis A que se encuentran disponibles en el mercado, con eficacia equivalente. Las vacunas son altamente inmunogénicas en personas adultas. Tras la segunda dosis, prácticamente todas

las personas tienen niveles protectores de anticuerpos. Sin embargo algunos estudios muestran una menor concentración de anticuerpos en pacientes con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Entre los varones HIV positivos, los que respondieron a la vacuna tenían un mayor recuento de linfocitos CD4 comparado a los que no respondieron. Los estimados de la presencia de anticuerpos provenientes de estudios de cinética de anticuerpos sugieren que los niveles protectores deberían durar por lo menos 20 años (Wiens *et al.*, 1996). La política de inmunización tiene que ser individualizada tomando en cuenta la prevalencia de la infección en la población del sujeto. Independientemente de la endemidad, los siguientes grupos deberían ser vacunados:

- Pacientes con enfermedades hepáticas crónicas.
- Manipuladores de alimentos.
- Trabajadores de centros de cuidado infantiles o pacientes institucionalizados (ancianos, pacientes con retraso mental).

La medición de anticuerpos anti-HAV previa a la vacunación podría ser una medida rentable en zonas de endemidad alta o intermedia, considerando que el costo de la prueba es menor que el de las dos dosis de vacuna

En Mayo del 2001, la FDA aprobó una vacuna combinada para hepatitis A y B (Twinrix). Los componentes antigénicos de dicha vacuna han sido utilizados como vacunas separadas durante muchos años como vacunas de hepatitis A y B respectivamente, y su eficacia como producto combinado es comparable a los productos individuales.

1.6. Virus de la Hepatitis E

1.6.1. Historia

Desde mediados de la década de los 50, se han descrito numerosas epidemias de hepatitis víricas, principalmente en Asia, que se habían atribuido a HAV ya que la enfermedad que causa se desarrolla como una hepatitis aguda clínicamente indistinguible de la causada por HEV (Emerson y Purcell, 2001). El virus de la hepatitis E se diferenció de HAV cuando en 1980 se realizaron unos estudios serológicos que demostraban que dos brotes de hepatitis agudas en la India (Delhi y Kashemira) estaban causados por un agente etiológico diferente a

HAV (Viswanathan, 1957; Khuroo, 1980; Wong *et al.*, 1980). Se definió como una nueva forma de hepatitis no-A no-B de transmisión entérica. Ésta nueva forma hepatitis vírica presentaba algunas características diferenciales respecto la causada por HAV, como son una mayor tasa de individuos adultos afectados y una elevada tasa de mortalidad en mujeres embarazadas.

El agente causal de la HEV fue descrito por primera vez por Balayan y colaboradores en el 1983. Balayan desarrolló una hepatitis aguda tras ingerir, voluntariamente, un extracto de heces de un animal infectado de hepatitis no-A no-B. Se generaron anticuerpos que reaccionaron con las partículas víricas excretadas por el enfermo durante la fase aguda de su infección. Posteriormente, Balayan consiguió infectar monos con el virus, que también excretaron el virus en sus heces (Balayan *et al.*, 1983).

Inicialmente, HEV se clasificó dentro de la familia *Caliciviridae* ya que comparte características morfológicas, físico-químicas y estructurales con los otros miembros (Bradley y Balagan, 1988). El año 1990 se clonó y se caracterizó HEV a partir de bilis de macacos *cynomolgus* infectados experimentalmente con heces de enfermos de un brote epidémico en Birmania (Reyes *et al.*, 1990). Tam *et al.* (1991) secuenciaron el genoma completo de esta cepa de Birmania a partir de una muestra de heces contaminada experimentalmente. Una segunda cepa fue identificada durante un brote en Méjico, la secuencia presentaba una similitud del 76% con la cepa birmana (Huang *et al.*, 1992). Las dos cepas descritas representan los 2 primeros genotipos identificados de HEV.

A partir de mediados de los años 90 se han acumulado evidencias de la presencia de HEV en poblaciones de regiones consideradas no endémicas (Bader *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1992; Pina *et al.*, 2000). En el año 1998, por su escasa relación filogenética con el resto de miembros de la familia *Caliciviridae* (Koonin *et al.*, 1992; Berke y Matson, 2000), así como por las diferencias en el tipo de enzimas replicativos utilizados por HEV (Koonin y Dolja, 1993), han sido excluidos de esta familia y clasificados en el género "*HEV-like viruses*" (Pringle, 1998). Actualmente HEV pertenece a la familia *Hepeviridae* y es el único miembro del género *Hepevirus*.

En los últimos años se ha estudiado la presencia de HEV en diferentes especies animales, y además de en cerdos domésticos de diferentes áreas geográficas del mundo (Huang *et al.*, 2002; de Deus *et al.*, 2007; Rutjes *et al.*, 2009; Sakano *et al.*, 2009), la presencia del RNA de HEV se ha identificado en mangostas procedentes de Okinawa (Japón), en las que

también se encontró serología positiva (Nakamura *et al.*, 2006), en el 4% de los jabalíes analizados en Holanda (Rutjes *et al.*, 2009), en el 1,1% de los de Japón (Sakano *et al.*, 2009), y en el 19,6% de los de España (de Deus *et al.*, 2008). Del mismo modo, en Asia se han secuenciado genomas de HEV a partir de muestras de ciervo (Takahashi *et al.*, 2004). En el año 2001 Haqshenas y colaboradores identificaron y caracterizaron genéticamente un nuevo virus relacionado con HEV de humanos a partir de muestras de bilis de gallinas que padecían el síndrome de hepatomegalia-esplenomegalia, síndrome emergente en gallinas de Norte América del que se desconocían hasta entonces las causas (Haqshenas *et al.*, 2001).

Además, y de modo esporádico, se ha reportado el aislamiento del RNA del virus en roedores del valle de Katmandú, en Nepal (He *et al.*, 2006), en caballos en Egipto, donde se halló una prevalencia de RNA del 4% (Saad *et al.*, 2007), y en China (Zhang *et al.*, 2008). Si bien estos datos deben tomarse con precaución ya que intentos posteriores tratando de infectar experimentalmente a ratas o ratones con HEV mostraron resultados contradictorios (Karetnyi *et al.*, 1993; Maneerat *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2008). No ha sido posible profundizar más en este aspecto hasta que Johne *et al.* (2010a) identificó, en heces de una rata capturada en los sistemas de alcantarillado sanitario de Hamburgo (Alemania), dos nuevas secuencias relacionadas con HEV, mediante la utilización de cebadores degenerados diseñados sobre el ORF1 de HEV. Tras la secuenciación completa del genoma de esta nueva HEV, se ha comprobado que las secuencias obtenidas distan significativamente respecto los genotipos conocidos hasta la fecha (Johne *et al.*, 2010b).

1.6.2. Características moleculares

El genoma de HEV está formado por una única cadena de RNA de orientación positiva. La longitud varía entre 7,2 y 7,5 Kb. La molécula de RNA está poliadenilada en el extremo 3' carboxiterminal y presenta una cabeza en el extremo 5' aminoterminal con una 7-metilguanósina (Kabrane-Lazizi *et al.*, 1999). El genoma está organizado en 3 pautas de lectura abiertas, diferentes y solapadas entre sí (Figura 8):

- i. ORF1: localizada en el extremo 5', es el ORF de mayor tamaño. Codifica para proteínas enzimáticamente activas implicadas, probablemente, en la replicación viral y el procesamiento proteico. Se han identificado características propias de una metiltransferasa, una cisteína *papain-like*, una RNA helicasa y una RNA polimerasa RNA-dependiente. Al mismo tiempo, contiene 2 dominios (X y Y) de función

- desconocida hasta la fecha y una región hipervariable rica en prolinas. Estas regiones hipervariables se encuentran habitualmente en proteínas estructurales de los virus, facilitándose así la evasión de la respuesta inmune del huésped (Worm *et al.*, 2002).
- ii. ORF2: se localiza próxima al extremo 3' del genoma y codifica para una proteína estructural. Esta región es traducida a un precursor con 3 puntos de glicosilación que posteriormente se procesa y probablemente se glicosila (Worm *et al.*, 2002). Ensayos *in vitro* sugieren que la proteína se transloca a través del retículo endoplasmático y es expresada tanto intracelularmente como en la superficie de la célula (Zafrullah *et al.*, 1999).
 - iii. ORF3: está localizado en el centro del genoma de HEV, se caracteriza por estar solapado en el extremo 5' con el ORF1 y en el extremo 3' con el ORF2. Codifica una proteína de 123aa de función desconocida. Diferentes estudios postulan que desempeña una función de elemento de anclaje de las partículas víricas con el citoesqueleto de las células hepáticas, actuando como elemento importante en el proceso de ensamblaje de las partículas víricas (Zafrullah *et al.*, 1997).

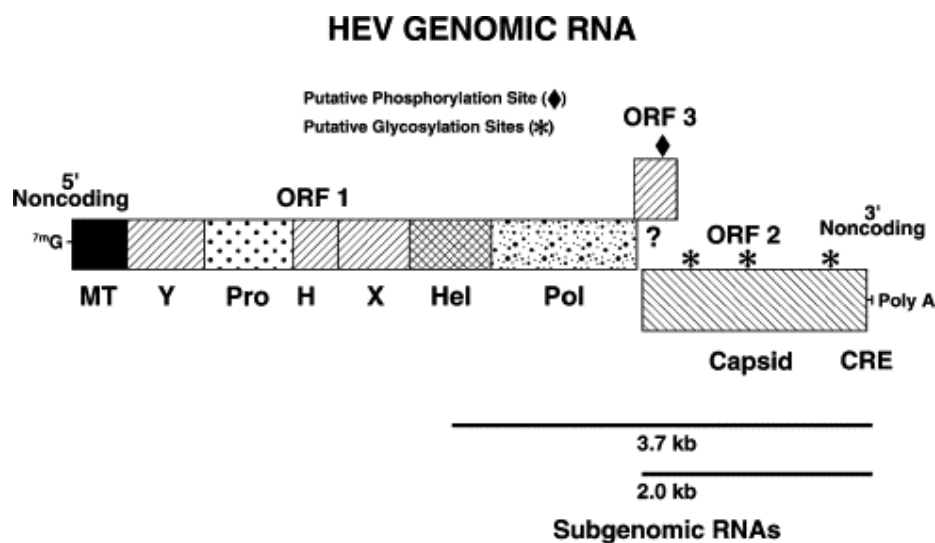


Figura 8. Organización del genoma de HEV en tres ORF o pautas abiertas de lectura. Los dominios identificados en el ORF1 son: un dominio metiltransferasa (MT), un dominio Y (Y), un dominio de proteasa *papain-like* (Pro), una región hipervariable rica en prolinas (H), un dominio X (X), un dominio helicasa (Hel) y un dominio RNA polimerasa RNA-dependiente (Pol). En el ORF2 podemos observar 3 puntos potenciales de glicosilación (*) y en ORF3 se ha identificado un punto potencial de fosforilación (◆) (Purcell y Emerson, 2008)

1.6.3. Características físico-químicas y estabilidad

El virión de HEV presenta una estructura icosaédrica de 27 – 34 nm de diámetro. Forma partículas víricas sin envuelta lipídica con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 183S. Se han detectado partículas de virus que sedimentan a 165S, pero se piensa que son defectivas. La densidad en gradiente de tartrato de potasio y glicerol es de 1,29 g/mL (Purcell y Emerson, 2001).

En condiciones de laboratorio HEV es bastante lábil. Se puede observar la desintegración del virus durante la centrifugación para la obtención de los gradientes de CsCl, ya que es extremadamente sensible a las altas concentraciones salinas utilizadas (Tam *et al.*, 1997). Es necesario el mantenimiento de temperaturas tan bajas como sea posible, aunque se degrada fácilmente en procesos de congelación y descongelación (Yarborough, 1999). También se ha descrito cierta sensibilidad a enzimas proteolíticas (Bradley, 1992; Bradley, 1994; Ticehurst, 1999). Los desinfectantes yodados y el autoclave destruyen los virus (Ticehurst, 1999).

Se ha observado que los viriones se mantienen inalterables después de la exposición a trifluorotricloroetano (Purcell y Emerson, 2001). El tipo de transmisión que le caracteriza (fecal-oral) sugiere que también es relativamente estable en pH ácidos y básicos medios (Harrison, 1999; Purcell y Emerson, 2001), la presencia de los virus en agua residual indica que es capaz de sobrevivir en el medio ambiente (Harrison, 1999). En experimentos en los que se ha dopado agua residual con una concentración conocida de HEV y en los que se ha mantenido la temperatura en 20 °C, se ha observado una T_{90} de 20 días y una T_{99} de 39 días usando RT-PCR (Pina *et al.*, 1998a). En estudios recientes se ha evaluado que una cocción de 56 °C durante 1 hora no es suficiente para inactivar el virus presente en determinados alimentos (Feagins *et al.*, 2007).

1.6.4. Diversidad genética

Si no consideramos la región hipervariable contenida en el ORF1, el genoma de HEV es relativamente estable (Arankalle *et al.*, 1999). La gran mayoría de las variaciones que podemos observar a nivel del RNA representan substituciones que no provocan cambios en la secuencia de aa (Yarborough *et al.*, 1991; Worm *et al.*, 2002).

Se ha observado que la similitud nucleotídica de las secuencias aisladas durante un brote epidémico es elevada, aunque podemos encontrar mutaciones puntuales entre las cepas presentes. Debido a que la deriva genética no es un factor importante en la evolución de HEV, podemos confirmar que las diferencias no representan más que poblaciones concretas del virus (Aggarwal *et al.*, 1999; Arankalle *et al.*, 1999). También se han observado diferencias geográficas donde las diferentes secuencias aisladas presentan, habitualmente, más variaciones entre ellas que entre las secuencias de cepas de una misma zona. Estas diferencias representan sustituciones silenciosas, únicamente las localizadas en la región hipervariable del ORF1 presentan una diversidad aminoacídica importante (Worm *et al.*, 2002).

La clasificación por genotipos más aceptada está basada en estudios de Worm *et al.* (2002) y se define a un genotipo como un conjunto de virus con una divergencia nucleotídica inferior al 20% en la región ORF2. En función de este criterio, las diferentes cepas de HEV humanas se clasifican en 4 grandes genotipos. El genotipo 1 (cepas africanas y asiáticas) presenta una diversidad muy baja. El genotipo 2 está formado por la cepa Mejicana y algunos aislados de Nigeria. EL genotipo 3 lo forman las cepas norteamericanas, europeas, japonesas y argentinas. El genotipo 4 está formado por cepas chinas y japonesas (Figura 9). Además de los 4 genotipos mencionados, el genotipo aislado en 2001 que infecta a aves (Haqshenas *et al.*, 2001) se ha clasificado posteriormente como representante del genotipo 5.

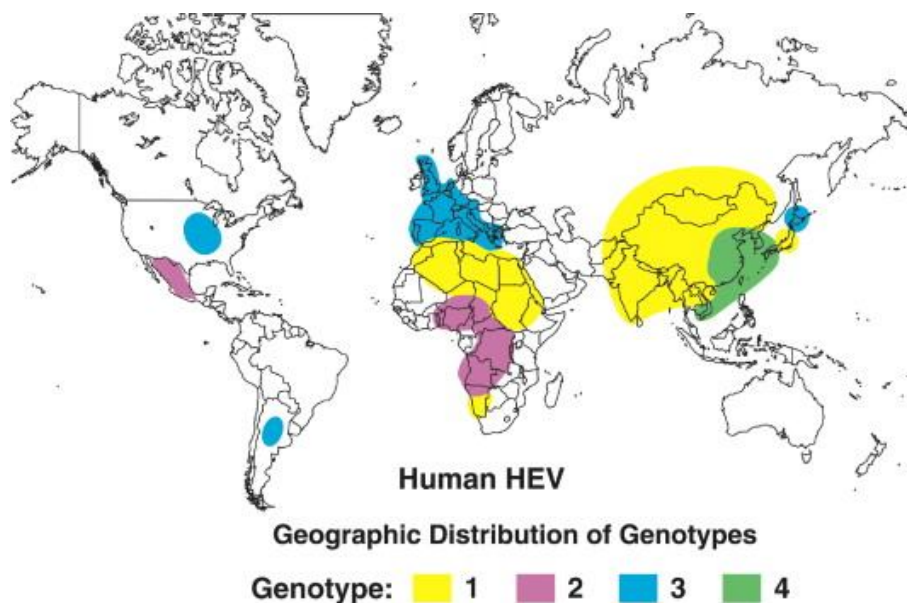


Figura 9. Distribución geográfica de cada uno de los genotipos de HEV que infecta a humanos (Purcell y Emerson, 2008)

Las cepas de los virus de HEV de origen animal descritas a partir de los años 90 confirman la hipótesis de una posible zoonosis responsable de los casos esporádicos de hepatitis E en humanos en regiones no endémicas. Se ha observado que las secuencias de las cepas de origen porcino aislados en una determinada región son muy similares a las secuencias aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes humanos con hepatitis agudas (Meng *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999; Pina *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001). Hasta la fecha, se han identificado cepas de HEV de origen porcino pertenecientes a los genotipos 3 y 4.

1.6.5. Diversidad serotípica

Las diferencias entre cepas de HEV se limitan a la secuencia de nucleótidos. Las secuencias aminoacídicas de las cepas de los diferentes genotipos están altamente conservadas, apoyando la teoría más generalizada de la existencia de un único serotipo (Tsarev *et al.*, 1999). Únicamente se observan ciertas diferencias serológicas al expresar antígenos del ORF3 (Yarborough *et al.*, 1991).

Las partículas víricas de un genotipo determinado reaccionan con los anticuerpos generados durante la infección producida por cualquiera de los otros genotipos descritos (Yarborough, 1999). Experimentos cruzados con diversas cepas de HEV en primates han mostrado protección cruzada a la infección (Bradley *et al.*, 1987; Worm y Wirnsberger, 2004).

1.6.6. Replicación del virus

Debido a que la replicación de HEV en cultivo celular es poco eficiente y debido a que este patógeno no está relacionado con ningún otro virus bien caracterizado, se conoce muy poco sobre su estrategia de replicación. Los mecanismos de adhesión y entrada son desconocidos, aunque se asume que el virus se une a receptores de los hepatocitos y de células del tracto biliar y del intestino.

A pesar de lo poco que se conoce, la propuesta de modelo de replicación más aceptada está basada en motivos conservados de dominios no estructurales y analogías entre HEV y otros virus con genomas formados por RNA de cadena positiva (Reyes *et al.*, 1993). Los hepatocitos son células diana por excelencia para HEV, pero estudios con ratas inoculadas experimentalmente con una cepa de HEV de origen humano han permitido identificar otras posibles dianas, como los monocitos de sangre periférica, el bazo, los nódulos linfáticos y las

células del intestino delgado (Maneerat *et al.*, 1996).

Recientemente se ha desarrollado un sistema de cultivo celular de HEV a partir de una suspensión fecal con una elevada carga vírica (10^7 GC/mL). El experimento descrito se ha realizado sobre dos tipos de células (PLC y PRF/5) y se ha utilizado una cepa del genotipo 3 (JE03 – 1760F), (Tanaka *et al.*, 2007).

1.6.7. Epidemiología

Las características epidemiológicas de la infección por HEV son las descritas a continuación (Mast y Krawczynski, 1996; Worm *et al.*, 2002):

- Transmisión fecal-oral.
- Brotes epidémicos asociados a agua contaminada en áreas con condiciones sanitarias deficientes.
- Mayor tasa de afectados entre jóvenes adultos de entre 15 y 40 años.
- Mayor tasa de mortalidad en mujeres embarazadas (especialmente durante el 3º trimestre).
- Baja seroprevalencia (IgG anti-HEV) en zonas con brotes y casos esporádicos de hepatitis E.
- Baja tasa de transmisión por contacto persona-persona.
- Ausencia de secuelas o cronicidad.

1.6.8. Zonas endémicas y no endémicas

El virus de la hepatitis E causa grandes epidemias, principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América Central (Kumar *et al.*, 2007) (Figura 10). Es el responsable de más del 50% de las hepatitis agudas virales que tienen lugar en países en desarrollo, considerados como endémicos para HEV (Yarborough, 1999). En estas regiones provoca casos esporádicos de hepatitis y brotes epidémicos. Los brotes suelen asociarse con el consumo de agua contaminada fecalmente. (Schlauder y Mushahwar, 2001). La mayoría de los brotes tienen lugar en zonas rurales y son pocos los individuos que se ven afectados, pero en otras ocasiones, los brotes se convierten en verdaderas epidemias.

La enfermedad tiene lugar principalmente en regiones o situaciones donde la contaminación fecal de las fuentes de suministro de agua es algo habitual. También es típico detectar brotes tras desastres naturales o desplazamientos masivos de refugiados. Además de los brotes epidémicos, HEV es también responsable de hepatitis esporádicas, incluso en zonas que no se consideran propiamente endémicas (Worm *et al.*, 2002).

Las regiones industrializadas son las consideradas habitualmente como regiones no endémicas y donde HEV causa únicamente casos esporádicos. Hasta fechas muy recientes, estos casos aislados se atribuían a cepas importadas de regiones endémicas (Balyan, 1997; Aggarwal y Krawczynski, 2000). Con la detección de cepas de HEV en países desarrollados a partir de muestras clínicas de pacientes sin historial de viajes a zonas de riesgo y a partir de muestras ambientales, se ha planteado la posibilidad de la existencia de cepas autóctonas propias de regiones donde la prevalencia de las infecciones por HEV podría ser superior a la considerada tradicionalmente (Pina *et al.*, 1998a; Jameel, 1999).

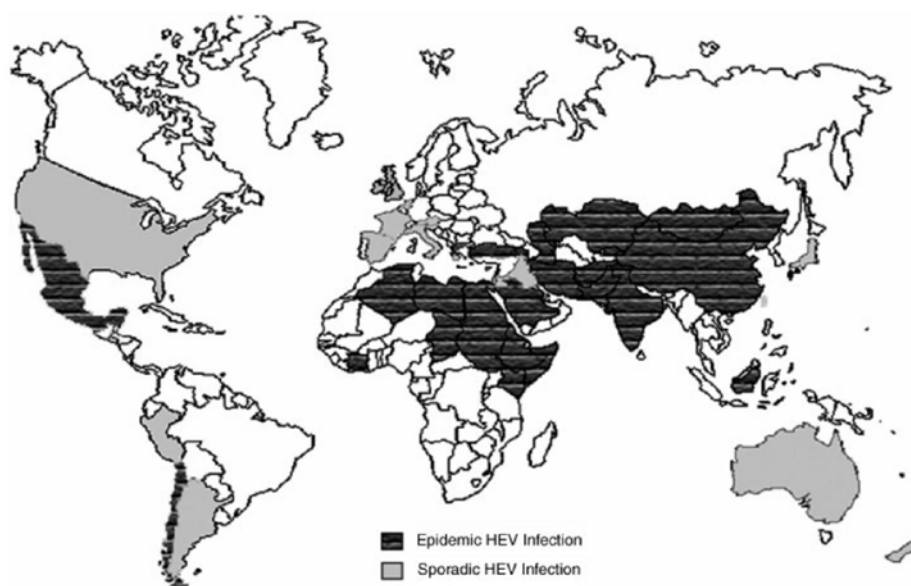


Figura 10. Distribución geográfica de HEV. Podemos observar las zonas donde se localizan epidemias y casos esporádicos (Kumar *et al.*, 2007)

1.6.9. Seroprevalencia

Podemos encontrar anticuerpos contra HEV en casi todas las regiones del planeta. África y Asia son regiones consideradas endémicas, los valores de seroprevalencia entre individuos sanos son más elevados que los correspondientes a individuos sanos de las regiones industrializadas. En general se observa que los valores de seroprevalencia en las zonas

endémicas están entre un 3% y un 26%, valores inferiores a lo esperado hipotéticamente (Purcell y Emerson, 2001). En menores de 10 años la presencia de IgG anti-HEV es poco usual, mientras que los niveles aumentan hasta un 10% – 40% entre adultos mayores de 25 años (Arankalle *et al.*, 1995). Un patrón diferente se ha descrito recientemente en Egipto y la India, donde los niveles de IgG anti-HEV en niños menores de 5 años son superiores al 60% (Aggarwal *et al.*, 1997; Fix, 2001).

En países industrializados de Europa y de Norteamérica, los valores de IgG anti-HEV oscilan entre un 1 y un 5% (Paul *et al.*, 1994). En España, la seroprevalencia detectada en un estudio con 76 individuos sanos fue del 5,5% (Buti *et al.*, 1995), mientras que en donantes de sangre es de un 2,8% (Mateos *et al.*, 1999). En Cataluña, se ha observado una seroprevalencia del 7,3% en un estudio donde se han analizado muestras de 1.280 personas (Buti *et al.*, 2006).

1.6.10. Profilaxis

Hervir el agua antes de beberla durante las epidemias de hepatitis E ha demostrado reducir la transmisión de la enfermedad. Los viajeros a zonas endémicas, y especialmente las mujeres gestantes en el último trimestre, deben evitar ingerir comida no cocinada y beber agua potencialmente contaminada. Las preparaciones de inmunoglobulinas no son protectoras, aún cuando provienen de sueros de personas de áreas endémicas (Wald *et al.*, 1995).

En Nepal, se está trabajando en un ensayo en fase II con una vacuna recombinante para HEV generada mediante la expresión del ORF2 en baculovirus. Se ha demostrado que la vacuna es segura y muy eficaz, no obstante, el ensayo incluye únicamente individuos adultos del género masculino, de manera que no se puede garantizar que sea eficaz para mujeres y niños (Shrestha *et al.*, 2007). Recientemente, Zhu *et al.* (2010) ha presentado un trabajo donde se incluyen más de 110.000 personas, describiendo un ensayo en fase III de otra vacuna recombinante expresada en *E. coli*. El trabajo presenta una efectividad de más del 99%, aunque tampoco incluye niños ni mujeres embarazadas. Aunque los ensayos actuales son prometedores, actualmente no se cuenta con una vacuna para HEV disponible comercialmente.

1.7. Norovirus humanos

1.7.1. Historia

En 1929, Zahorsky describió la presencia de una enfermedad caracterizada por una diarrea autolimitada acompañada por náuseas, vómitos y dolor abdominal, típica durante los meses de invierno, por lo que se la nombró como la enfermedad de vómitos invernales (Zahorsky, 1929). No obstante, no fue hasta el 1972 cuando Kapikian *et al.* descubrieron la etiología de este síndrome tan ampliamente reportado. Mediante inmuno-microscopía electrónica examinaron las heces de voluntarios inoculados con filtrados fecales procedentes de un grupo de estudiantes de una escuela de primaria en Norwalk (Ohio, Estados Unidos) que habían padecido un brote de gastroenteritis en 1968 (Adler y Zickl, 1969; Kapikian *et al.*, 1972). Observaron unas partículas víricas pequeñas y de aspecto redondeado, a las que denominaron virus Norwalk, que actualmente está considerado como el prototipo del género Norovirus. Uno de los avances más importantes se constituyó en 1990 mediante la clonación del genoma del virus Norwalk (Xi *et al.*, 1990), ya que permitió aplicar técnicas de RT-PCR y de secuenciación para el estudio de estos virus, reconociendo así la magnitud de la enfermedad producida por NoV.

1.7.2. Características moleculares

El género norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae* junto con los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus*, recientemente se ha propuesto la inclusión del género *Nebovirus* (Patel *et al.*, 2009). Su genoma está constituido por una única molécula de RNA de cadena simple y sentido positivo, de un tamaño aproximado de 7,5 kb, que contiene tres pautas abiertas de lectura (ORF1 – ORF3) que codifican los genes no estructurales y estructurales. En el extremo terminal 5' podemos observar una proteína vírica unida covalentemente (VPg), mientras que en el extremo 3' podemos encontrar una cola poliadenilada (polyA). El ORF1 es traducido en una poliproteína que será digerida por una proteasa vírica (PRO) para dar lugar a seis otras proteínas: p48, nucleósido-trifosfatasa (NTPase), VPg, una RNA polimerasa RNA-dependiente (POL) y la propia proteasa vírica. Dichas proteínas no estructurales intervienen en los procesos de copia del RNA de polaridad positiva (+) a un RNA de polaridad negativa (-) que será utilizado como cadena molde para generar un RNA subgenómico (+) de unas 2,8 kb. Éste RNA subgenómico será traducido para producir la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) y unas pocas moléculas de la proteína secundaria de la cápside (VP2), que finalmente se

autoensamblarán generando las partículas víricas (Figura 11).

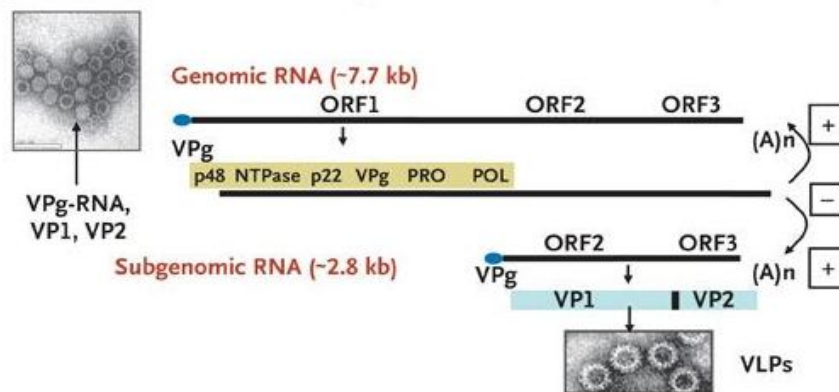


Figura 11. Organización genómica de norovirus. Podemos observar la disposición de las pautas abiertas de lectura (ORF1-3), proteínas no estructurales (p48, NTPase, p22, VPg, PRO y POL), proteínas estructurales (VP1 y VP2), RNA (+) y (-), y RNA subgenómico (+), así como dos ilustraciones de partículas víricas observadas con el microscopía electrónica de transmisión. Las partículas con el interior oscuro carecen del genoma (partículas defectivas), la coloración oscura es debida a la penetración de la tinción negativa (extraído de Glass *et al.*, 2009)

1.7.3. Características físico-químicas y estabilidad

Los norovirus son virus pequeños, con un diámetro aproximado de 38 nm, no envueltos e icosaédricos. La cápside contiene 90 dímeros de VP1, formando una cubierta de la cuál salen 90 capsómeros a modo de protuberancias de forma arqueada. Dichos capsómeros se encuentran dispuestos de tal manera que forman 32 cavidades en la superficie de la partícula viral. La autoordenación de la proteína VP1 en pseudo-partículas virales (VLP) es un proceso eficiente que no requiere ni del RNA ni de la proteína menor VP2. La estructura atómica de NoV se ha determinado mediante cristalografía con rayos X, definiéndose dos dominios principales en VP1, la cubierta (S) y la protuberancia (P). El dominio S forma la parte interna de la cápside que envuelve al genoma de RNA y el dominio P forma las protuberancias de estructura arqueada que surgen de la cubierta y que contienen los dímeros de VP1. El dominio S está relativamente bien conservado, mientras que el dominio P, unido al S, se corresponde a la fracción C-terminal de la VP1 y es de naturaleza más variable. El dominio P se encuentra dividido en el subdominio P1 y el subdominio P2, éste último se corresponde a la región VP1 con mayor variabilidad secuencial y confiere especificidad antigénica y de unión a receptores (Tan *et al.*, 2003; Lochridge *et al.*, 2005) (Figura 12).

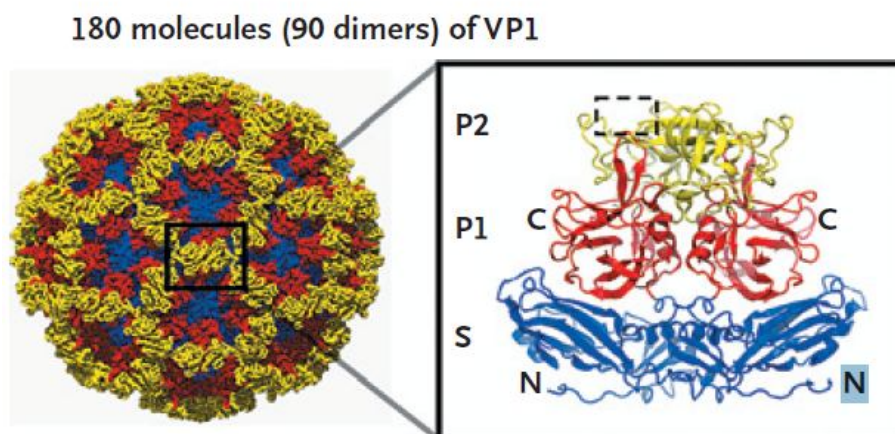


Figura 12. Estructura de la cápside vírica de norovirus. La figura muestra la estructura icosaédrica constituida por 180 moléculas (90 dímeros) de la proteína estructural VP1. El código de colores representa los dominios S y P (subdominios P1 y P2). El recuadro delimitado por una línea discontinua muestra un lugar de unión receptores (extraído de Glass *et al.*, 2009)

Los NoV son estables dentro de un amplio rango de temperaturas, sobreviven a la congelación, la refrigeración y al calentamiento hasta 60 °C durante 30 minutos. Se pueden encontrar en una gran variedad de superficies, que si no se desinfectan adecuadamente constituyen un reservorio importante durante los brotes, especialmente si hablamos de entornos cerrados cómo los hospitales, geriátricos o cruceros. La infectividad de NoV se mantiene tras estar 3 horas en pH 2,7 o tratándolo con éter al 20%, ambos experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Además, resiste el tratamiento con hipoclorito sódico entre 3,75 – 6,25 g/L (cloro libre residual 0,5 – 1,0 mg/L) (Dolin *et al.*, 1972; Barker *et al.*, 2004; Duizer *et al.*, 2004a).

1.7.4. Diversidad genética

El género NoV presenta una elevada variabilidad genética que se explica por mutaciones puntuales y por recombinación entre diferentes fragmentos homólogos de RNA que, por coinfección, hayan entrado en una misma célula. La clonación del genoma de NoV, además de la ya mencionada aplicación de las técnicas de PCR, permitió expresar *in vitro* proteínas víricas en sistemas de expresión en procariotas y eucariotas. Basándose en estas técnicas, se han clasificado los NoV en cinco genogrupos con 29 genotipos o *clusters*, definidos por tener al menos un 80% de identidad de los aa sobre la secuencia total de la cápside (Ando *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006) (Figura 13). Las cepas que infectan a los seres humanos

pertenecen a los genogrupos I, II y IV, mientras que a los genogrupos III y V pertenecen a cepas que infectan animales, ganado bovino y ratones, respectivamente. Las cepas dentro de un genotipo se pueden subdividir en variantes según las secuencias y los análisis filogenéticos (Zheng *et al.*, 2006).

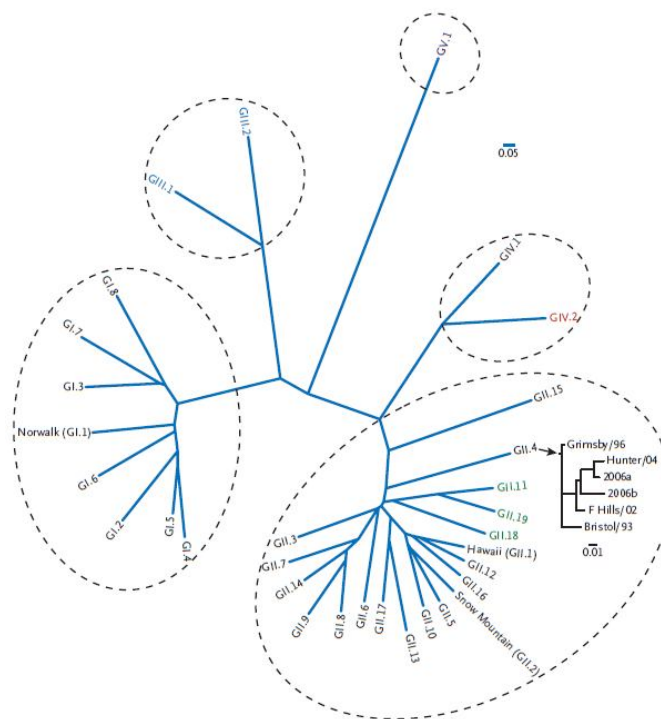


Figura 13. Clasificación de norovirus en 5 genogrupos (GI – GV) y 32 genotipos. El árbol filogenético se basa en la secuencia de aminoácidos completa de VP1 (Glass *et al.*, 2009)

1.7.5. Replicación del virus

En primer lugar, el virión debe interactuar con la célula huésped mediante receptores específicos. Se postula que la partícula vírica penetra y seguidamente el RNA es liberado al citoplasma. Estas primeras interacciones no se conocen en detalle, pero se sabe que el reconocimiento del receptor es esencial para que se produzca el ciclo vital de NoV. La traducción inicial del genoma introducido está mediado por interacciones entre la proteína VPg ligada al genoma con los mecanismos de traducción de la célula. Una vez transcrito el ORF1 para producir la poliproteína no-estructural, la proteasa vírica la escindirá en varios puntos de restricción y se convertirá en distintos precursores y productos. Se inicia la síntesis de una hebra RNA complementaria (-) a partir de la estructura del RNA genómico empezando por el extremo 3' de la hebra de RNA con sentido positivo y con implicación de proteínas celulares (Gutierrez-Escolano *et al.*, 2003). Este RNA de sentido negativo servirá a su vez como molde

para transcribir más RNA genómico y subgenómico de sentido positivo que a su vez servirá para codificar la síntesis de las proteínas estructurales VP1 y VP2.

1.7.6. Epidemiología

La vía de transmisión más importante es a través del contacto fecal-oral y a través de los vómitos, ya sea por contacto directo o mediante aerosoles. Un número muy bajo de partículas (10 – 100) son suficientes para que una persona susceptible pueda infectarse (Parashar *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2002; Marks *et al.*, 2003). La susceptibilidad a la enfermedad es universal y se da en personas de cualquier edad. La mayoría de individuos se han infectado con NoV alguna vez antes de llegar a la edad adulta. Estudios que se han llevado a cabo en países desarrollados indican que la presencia de anticuerpos, tanto frente al genogrupo I como al genogrupo II, aumenta gradualmente con la edad, aunque actualmente es superior para el genogrupo II (Green *et al.*, 2002).

1.7.7. Sintomatología clínica

El período de incubación más habitual es de 24 a 48 horas y la transmisión es máxima durante este periodo. Los individuos infectados tienen una probabilidad elevada de transmitir la infección a sus contactos domiciliarios o muy cercanos, por lo que en brotes de exposición única son frecuentes los casos secundarios. La enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%) (Kaplan *et al.*, 1982b). Los vómitos son muy frecuentes en los niños mayores de 1 año, mientras que en los lactantes se suele desarrollar sólo diarrea (Kaplan *et al.*, 1982a). Estos síntomas pueden persistir en pacientes hospitalizados y en niños menores de 11 años, entre 4 y 6 días. Se han descrito casos graves asociados a enterocolitis necrosante (Turcios-Ruiz *et al.*, 2008) y fallecimientos de pacientes de edad avanzada en brotes en residencias de ancianos (Chadwick *et al.*, 2000). La gravedad de la enfermedad, comparada con la diarrea por rotavirus, parece ser ligeramente menor en estudios basados en pacientes extrahospitalarios, mientras que, en niños hospitalizados, posee una gravedad similar (Sakai *et al.*, 2001). Se ha descrito la persistencia de infección con síntomas durante más de 1 año en pacientes pediátricos oncológicos (Simon *et al.*, 2006) y en adultos inmunodeprimidos (Nilsson *et al.*, 2003).

1.7.8. Inmunidad

Estudios realizados con voluntarios demostraron que los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección, aunque de corta duración (entre 6 y 14 semanas) (Parrino *et al.*, 1977; Jonson *et al.*, 1990). Contrariamente a lo esperado, estos estudios también demostraron que los individuos con títulos más elevados de anticuerpos séricos o de coproanticuerpos tenían más probabilidad de infectarse con el virus que las personas con concentraciones bajas de anticuerpos. Este hecho se explica porque las personas sin anticuerpos frente a una cepa determinada de NoV no son genéticamente susceptibles a ella. También se observó que individuos que fueron sintomáticos podían reinfectarse cuando se les volvía a inocular NoV 27 – 42 meses más tarde (Parrino *et al.*, 1977). A pesar de estos resultados, estos mismos estudios con voluntarios y otros trabajos sugieren que se desarrolla, al menos, una protección parcial frente a infecciones posteriores por NoV, como es el caso de algún estudio de cohortes en comunidades (Rockx *et al.*, 2002). Hay personas que son resistentes a la infección cuando se exponen por primera vez al virus, pero al volverse a exponer uno o dos años más tarde, desarrollan manifestaciones clínicas. Otros, en cambio, no las desarrollan nunca, hecho que sugiere la existencia de una resistencia al virus determinada genéticamente. Hay estudios que han mostrado una asociación entre el fenotipo sanguíneo ABO y el riesgo de desarrollar infección sintomática: los voluntarios con el grupo O desarrollan infección con mayor frecuencia al estar expuestos, mientras que los que tienen el grupo B se infectan menos y desarrollan la enfermedad con menor frecuencia (Rockx *et al.*, 2005).

1.8. Adenovirus humanos

1.8.1. Historia

Los primeros adenovirus humanos fueron aislados por Rowe *et al.* (1953) a partir de las glándulas adenoides. En estos tejidos se observaban cambios degenerativos resultantes de la replicación de un agente no identificado que se denominó “*adenoid degeneration agent*”. En 1954, Hillerman y Werner consiguieron aislar un agente infeccioso a partir de secreciones respiratorias, que inducía cambios citopáticos sobre líneas celulares de origen humano. Los adenovirus fueron descritos como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas (Hilleman y Werner, 1954), infecciones gastrointestinales, urinarias y oculares. También

suponen un problema como patógenos oportunistas en individuos inmunodeprimidos. Estudios epidemiológicos confirmaron que los adenovirus provocan una pequeña proporción de las enfermedades respiratorias en la población general y un 5% – 10% en niños. El grupo “adenovirus” fue propuesto en 1956 por Enders *et al.*, y posteriormente aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Wildy, 1971).

1.8.2. Características moleculares

Los adenovirus constituyen una familia de virus DNA (familia *Adenoviridae*) que infectan al hombre y a un amplio rango de especies animales. El genoma está constituido por una molécula de DNA bicatenario lineal de 36 – 38 Kb (Figura 14), que codifica al menos 10 polipéptidos estructurales diferentes y 35 proteínas no estructurales (Pettersson, 1984). Presenta una proteína de 55 KDa unida covalentemente al extremo 5' de cada una de las cadenas (Rekosh *et al.*, 1977), y repeticiones invertidas redundantes de 103 – 165 pb en los extremos (Shinagawa *et al.*, 1987). Los dos extremos de la molécula pueden funcionar como origen de replicación y las dos cadenas del DNA son transcritas.

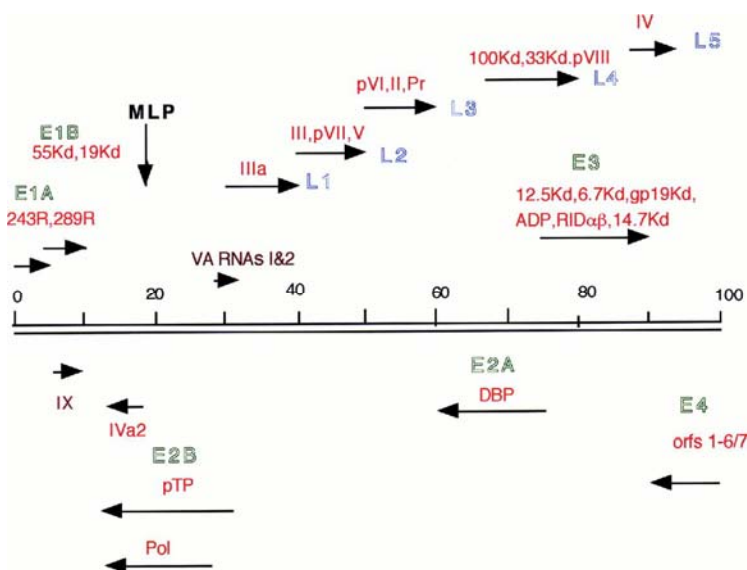


Figura 14. Mapa de transcripción del genoma de adenovirus. Los mRNA tempranos están representados en color verde, los mRNA tardíos están representados en color azul. Las flechas indican la dirección de transcripción. La localización génica de los VA RNAs está identificada en color marrón. MLP, genes tardíos mayoritarios (extraído de Russell, 2000)

1.8.3. Características físico-químicas y estabilidad

Las partículas víricas presentan una cápside desnuda de simetría icosaédrica con un diámetro entre 70 y 90 nm, con un peso molecular de 175 – 185 KDa y una densidad de flotación de 1,33 – 1,34 g/cm³ en cloruro de cesio (Li, 1988). El virión contiene un 13% de DNA y un 87% de proteína (Green *et al.*, 1963). La partícula completa está formada por al menos 10 polipéptidos estructurales diferentes. La cápside está constituida por 252 capsómeros, y de la que surgen proyecciones filamentosas con propiedades hemoaglutinantes. Los 240 hexones que forman las 20 caras triangulares del icosaedro, están dispuestos simétricamente de forma que cada uno queda rodeado por otros 6 capsómeros. Los 12 vértices del virión contienen un capsómero con una proyección en forma de antena (fibra), y que está rodeado por otros 5 capsómeros formando un pentón (Figura 15).

La partícula vírica es resistente a pH ácido, a la bilis y enzimas proteolíticos, lo que permite la multiplicación en el intestino humano. Asimismo, la ausencia de membranas o estructuras lipídicas hacen que sean resistentes a disolventes orgánicos (Green *et al.*, 1963).

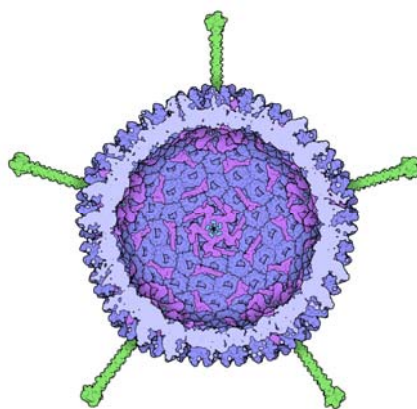


Figura 15. Esquema de la estructura de adenovirus, compuesta por una compleja cápside proteica que rodea un genoma de DNA y un core protéico, en los vértices podemos observar las proyecciones filamentosas (espículas) con propiedades hemoaglutinantes (Imagen obtenida de PDB, 2012)

1.8.4. Diversidad genética

Se ha podido observar una variabilidad genética que oscila entre un 48% – 99% de homología dentro de cada serotipo y un 4% – 20% entre diferentes serotipos. El método

utilizado comúnmente para identificar diferencias genómicas entre adenovirus se basa en el análisis mediante enzimas de restricción. Según este análisis se han podido definir más de 200 tipos genómicos que se diferencian en el patrón de restricción (Li, 1988). La secuenciación del DNA de representantes de diferentes serotipos ha demostrado delecciones e inserciones, y mutaciones puntuales (transiciones, transversiones) silenciosas.

1.8.5. Diversidad serotípica

Existen 52 serotipos adenovirus inmunitariamente distintos (7 especies: Adenovirus humano A a G) que pueden causar infecciones en seres humanos desde enfermedad respiratoria (mayormente especies HAdV-B y C) y conjuntivitis (HAdV-B y D) a gastroenteritis (HAdV-F serotipos 40 y 41). La forma más común es una enfermedad respiratoria; sin embargo, también pueden causar otras enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, y sarpullidos, dependiendo del serotipo de adenovirus que cause la infección. La familia contiene los siguientes géneros:

- Género *Aviadenovirus*; especie tipo: *Adenovirus A aviar*.
- Género *Atadenovirus*; especie tipo: *Adenovirus D ovino*.
- Género *Mastadenovirus*; especie tipo: *Adenovirus C humano*.
- Género *Siadenovirus*; especie tipo: *Adenovirus de la rana*.

1.8.6. Replicación del virus

La infección se inicia con la unión de las fibras al receptor de la superficie de células permisivas, y la internalización posiblemente por endocitosis. Una vez en el endosoma, una bomba proteica dependiente de ATP hace que disminuya el pH, con lo que se altera la carga neta de la capsida vírica. La interacción de la capsida vírica con la membrana lipídica produce la ruptura del endosoma, permitiendo el transporte del virión hasta el núcleo celular. La capsida remanente se pierde durante la liberación del core dentro del núcleo. La replicación del DNA, la transcripción y la maduración de los adenovirus tiene lugar en el núcleo celular (Sharp y Wadell, 1995). Durante el ciclo lítico los genes víricos se expresan en tres fases (Li, 1988):

- i. Fase temprana, que ocurre antes de la replicación del DNA vírico. Los genes tempranos (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4) codifican proteínas esenciales involucradas en la regulación de la transcripción viral, replicación del DNA y responsables de la transformación celular. El procesamiento post-transcripcional de los mRNA es complejo. Los mRNA maduros migran al citoplasma donde son traducidos a proteína.
- ii. Fase intermedia, durante la cual se expresan las proteínas estructurales pIX y pIVa2 que intervienen en la estabilización de la estructura de la cápside.
- iii. Fase tardía, caracterizada por la inhibición de la replicación y expresión de proteínas celulares, y la expresión de los genes víricos que codifican las proteínas estructurales (L1, L2, L3, L4 y L5). El procesamiento de los transcritos es complejo, y los mRNA maduros se traducen en el citoplasma. Los polipéptidos estructurales son transportados hasta el núcleo donde se inicia el ensamblaje de las partículas víricas. Treinta horas después de la infección pueden haberse producido 10^5 partículas por célula que forman cuerpos de inclusión cristalinos en el núcleo. La proporción de partículas infectivas varía entre 1/10 y 1/1.000 según los serotipos. Estas son liberadas de la célula por mecanismos desconocidos.

1.8.7. Epidemiología

Las infecciones por HAdV están muy extendidas a escala mundial. Entre 1967 y 1976 el 13% de los 135.702 aislados víricos asociados a enfermedades respiratorias en todo el mundo se identificaron como adenovirus (Schmitz *et al.*, 1983), ocupando el segundo lugar después del virus de la gripe que representó un 28% de los casos descritos.

Aproximadamente el 60% de las infecciones por HAdV se producen en niños menores de 4 años. El 47% – 55% de las infecciones son asintomáticas. Estudios seroepidemiológicos sugieren que la incidencia real de las infecciones por HAdV podría ser el doble que las estimaciones hechas a partir de los aislados víricos (Sharp y Wadell, 1995).

La transmisión de los HAdV puede ocurrir en forma de casos esporádicos o en brotes epidémicos. La vía de transmisión depende en gran medida del serotipo y de la enfermedad asociada, pudiendo transmitirse a través de secreciones orgánicas, transmisión aérea (p.e.

aerosoles generados por tos o estornudos), transmisión hídrica (p.e. brotes de conjuntivitis asociados a piscinas), transmisión fecal-oral (Hunter, 1997).

La elevada prevalencia y estabilidad de los HAdV, así como su origen humano, sugieren que éstos pueden ser utilizados como indicadores de la presencia de virus humanos en el ambiente (Pina *et al.*, 1998b; Puig *et al.*, 1994).

1.8.8. Oncogenicidad

Los diferentes serotipos se han dividido en tres grupos en función de su capacidad oncogénica observada en animales de experimentación (se desconoce la capacidad oncogénica del adenovirus humano G) :

- Altamente oncogénicos: especie A, producen tumores en la mayoría de animales infectados en un plazo de 4 meses.
- Débilmente oncogénicos: especie B, producen tumores en algunos animales en un plazo de 4 – 18 meses.
- No oncogénicos: especie C, D, E y F.

Todos los HAdV tienen la capacidad de transformar células de ratón *in vitro*. Las células transformadas están libres de virus infecciosos pero sintetizan proteínas víricas que pueden detectarse mediante ensayos inmunológicos (Li, 1988).

1.9. Poliomavirus

1.9.1. Historia

El género *poliomavirus* solía ser uno de los dos géneros dentro de la familia ahora obsoleta *Papovaviridae* (el otro género, el virus del papiloma, ahora se clasifica en su propia familia, *Papillomaviridae*). Actualmente, los poliomavirus son el único género dentro de la familia *Polyomaviridae*, y su nombre hace referencia a la habilidad de producir múltiples (poli) tumores (oma). El poliomavirus murino (MPyV), la especie tipo del género, fue el primer poliomavirus descubierto, y se aisló en el año 1953 por Ludwig Gross durante investigaciones acerca de la transmisión de la leucemia en ratones (Gross, 1953). MPyV es responsable de un

espectro variado de tumores al inocularse en crías de ratón. El virus de simio 40 (SV40) se identificó en los años 60 en cultivos de células de riñón de monos Rhesus que estaban siendo empleados para producir vacunas contra la polio (Sweet y Hilleman, 1960). Tanto la vacuna oral de Sabin (virus atenuado) como la vacuna inyectable de Salk (virus inactivados) estuvieron afectadas; la técnica para inactivar el virus de la polio de la vacuna Salk, por medio del formaldehído, fue inútil para matar al SV40. Millones de personas fueron inoculadas con las vacunas contaminadas antes de que se identificaran la presencia de SV40 y de que éstas se retiraran del mercado (revisado en Shah *et al.*, 2004).

Inicialmente, únicamente se habían identificado y caracterizado dos poliomavirus humanos; JCPyV y BKPyV. Ambos virus fueron aislados por primera vez en el año 1971 y deben su nombre a las iniciales de los pacientes donde fueron aislaron. BK fue identificado en la orina de un paciente al que hacía poco tiempo que se le había transplantado un riñón (Gardner *et al.*, 1971) mientras que JC se aisló en el tejido cerebral de un paciente con Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (PML), una enfermedad neurodegenerativa (Padgett *et al.*, 1971). Hasta los años 80, cuando empezó la epidemia de SIDA, JCPyV y la PML se consideraban ítems de poco interés y con poca incidencia. Pero todo cambió cuando se observó que aproximadamente un 4% de los enfermos de SIDA padecen la PML (Berger *et al.*, 1987). Recientemente, se han descrito diversos poliomavirus que aun no están clasificados: el poliomavirus de chimpancé (Johne *et al.*, 2005), los poliomavirus de cuervo y pinzán (Johne *et al.*, 2006), el poliomavirus de oca (Guerin *et al.*, 2000), el poliomavirus de mono ardilla (Verschoor *et al.*, 2008).

Actualmente, se han identificado 8 poliomavirus humanos: los ya mencionados BKPyV y JCPyV, el poliomavirus KI (Allander *et al.*, 2007) y el poliomavirus WU (Gaynor *et al.*, 2007), ambos aislados a partir del tracto respiratorio, aunque sus características patogénicas no están bien definidas aun (Norja *et al.*, 2007; Babakir-Mina *et al.*, 2011), el poliomavirus de células Merkel (MCPyV) (Feng *et al.*, 2008), del que hablaremos más adelante, y los recientemente descritos poliomavirus humanos 6 y 7 (Schmitt *et al.*, 2011) y el poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa (van der Meijden *et al.*, 2012).

1.9.2. Características moleculares

La familia *Polyomaviridae*, constituida únicamente por el género *poliomavirus*, se

caracteriza por poseer un genoma formado por una molécula de DNA de doble cadena de unas 5,3 Kb, superenrollado, circular y unido covalentemente. La replicación tiene lugar en el núcleo celular. EL DNA se encuentra asociado a 4 histonas celulares (H2A, H2B, H3 y H4) formando un minicromosoma.

Cada una de las cadenas de DNA codifica para aproximadamente el 50% de la información genética. El genoma de poliomavirus se encuentra subdividido en una región temprana que codifica para los antígenos tumorales T y t (AgT y Agt) y una región tardía que codifica para la proteínas estructurales que dan lugar a la cápside. También existe una región reguladora (RR), frecuentemente nombrada como región del control transcripcioal (TCR), con un tamaño de 400 pb donde podemos encontrar promotores de la transcripción y el único origen de replicación (ORI) del virus. El nucleótido 1 del genoma de los poliomavirus es el nucleótido central del palíndromo que forma parte del ORI. La transcripción se origina de manera bidireccional a partir de la RR y en cadenas diferentes (Figura 16).

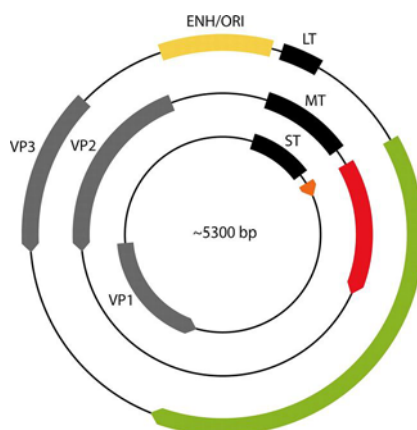


Figura 16. Esquema de la organización genómica de poliomavirus. La transcripción temprana de los antígenos T tiene lugar en la dirección en que giran las agujas del reloj, mientras que la transcripción de las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) ocurre en sentido contrario. La replicación y la transcripción están controladas por el enhancer/potenciador (ENH) y el origen de replicación (ORI). Las secuencias codificantes para los antígenos T están en diferente color tratando de remarcar las direcciones de las pautas de lectura (extraído de Fluck y Schaffhausen, 2009)

La región codificante de VP1 se encuentra solapada con la región C-terminal común a VP2 y VP3. La secuencia completa de VP3 se encuentra incluida en el extremo C-terminal de VP2 y presenta 115 aa adicionales en el extremo N-terminal. Los mRNA que codifican para estas proteínas se originan por splicing alternativo a partir de un único pre-mRNA. La

traducción de VP1 tiene lugar mediante la utilización de una pauta de lectura diferente a la de VP2 y VP3. Las tres proteínas constituyen la región tardía del genoma, expresándose durante y después de la replicación.

Los antígenos tumorales T y t conforman la región temprana y son producidos al inicio del ciclo lítico, son proteínas no estructurales y se incorporan a los viriones adultos maduros. Su función es vital en la replicación y transformación. Después de la infección, los antígenos T y t son fácilmente detectables en el núcleo de las células, donde una vez acumulados, provocan la activación de la región del genoma que codifica para las proteínas estructurales. Ambos antígenos comparten el extremo N-terminal. Los RNA mensajeros que codifican para estas proteínas son el resultado de un splicing alternativo de un único pre-mRNA. El poliomavirus murino presenta, además de lo mencionado, un antígeno tumoral T medio (AgTm). Los poliomavirus humanos y SV40 presentan una sexta proteína; la agnoproteína (LP1), formada por 60 – 70 aa y con tendencia a acumularse en la región perinuclear durante la fase avanzada de la infección. Se sugiere que la función de la agnoproteína consiste en regular negativamente la transcripción y replicación viral, tanto la basal como la inducida por el AgT. También está involucrada en la formación de la cápside (Sabath y Major, 2002).

1.9.3. Características físico-químicas y estabilidad

Los poliomavirus presentan virus sin envuelta lipídica con un diámetro aproximado de 42 – 45 nm (Figura 17). La cápside vírica está formada por tres proteínas: VP1, VP2 y VP3. El 70% de la masa total del virión (44 KDa) se corresponde con VP1 (360 copias). La cápside está constituida por un número de VP2 y VP3 que oscila entre 30 y 60 moléculas. Las cápsides están formadas por un total de 72 capsómeros pentaméricos y presentan una simetría icosaédrica, 60 capsómeros se coordinan hexagonalmente mientras que los 12 restante lo hacen pentagonalmente. Los viriones presentan una densidad de flotación de 1,34 g/mL en gradiente de cloruro de cesio, mientras que las cápsidas vacías presentan una densidad de flotación algo menor, concretamente 1,29 g/mL. El coeficiente de sedimentación en gradiente de sucrosa es de 240S. La partícula vírica está constituida por un 88% de proteína y un 12% de DNA (Cole, 1996).



Figura 17. Estructura cristalográfica del aspecto que ofrecen las partículas víricas de poliomavirus. En este caso podemos observar un poliomavirus murino (imagen obtenida de VIPERdb, 2012)

La ausencia de envuelta lipídica comporta que las partículas víricas sean resistentes al éter, a los ácidos y al tratamiento por calor, son capaces de sobrevivir durante una hora en agua a 50 °C, aunque en presencia de $MgCl_2$ 1M se vuelven vulnerables frente a las mismas condiciones (Virus Taxonomy, 7th report ICTV). La elevada estabilidad y amplia distribución de JCPyV en el ambiente, son detectados en aproximadamente el 95% de las muestras de agua residual, sugieren su utilidad como indicador de contaminación fecal y potencial herramienta para trazar el origen de dicha contaminación (Puig *et al.*, 1994; Pina *et al.*, 1998b; Bofill-Mas *et al.*, 2000). La presencia de estos virus en muestras ambientales ha sido ampliamente reportada durante la última década, mostrando concentraciones de $10^5 - 10^8$ GC/L en agua residual cruda, $10^0 - 10^3$ GC/L en agua de río y $10^3 - 10^5$ GC/100g de biosólidos (revisado en Girones *et al.*, 2010).

1.9.4. Replicación del virus

El espectro de huéspedes de cada una de las especies de poliomavirus es bastante restringido y cuando infectan a huéspedes de otras especies producen infecciones no productivas. En huéspedes permisivos causan infecciones líticas mientras que en huéspedes no permisivos producen un bloqueo de la replicación que conlleva a una infección abortiva o a un proceso oncogénico.

SV40 y MPyV infectan a una amplia variedad de células de mamíferos en cultivo, aunque en muchos de los tipos celulares utilizados la infección causada es no productiva. En el caso de JCPyV el espectro de huéspedes y el tipo de células a infectar es más limitado (Cole y

Conzen, 2001). La infección comienza con la unión de los virus a la célula huésped, aunque estos mecanismos de unión no se conocen completamente. Se piensa que VP1 y el ácido siálico juegan un papel importante y, en el caso de SV40, el antígeno MHC de clase I parece estar también implicado (Norkin, 1999). Los poliomavirus entran en el citoplasma por procesos de pinocitosis ayudados por una interacción previa de VP2 y VP3 con la superficie celular. Los virus parecen ser transportados desde el citoplasma hasta el núcleo utilizando el citoesqueleto y entran al núcleo por fusión de membranas o mediante los poros nucleares. Una vez en el núcleo, los virus se desencapsidan en un proceso en el que intervienen VP2 y VP3 (Cole y Conzen, 2001).

La transcripción temprana del genoma vírico tiene lugar en el núcleo, dando lugar a AgT y Agt y conduciendo así a la célula huésped a la fase S del ciclo celular, donde la maquinaria de replicación se pone al servicio del virus. El AgT se une al RR, inhibiendo la transcripción de la región temprana y activando simultáneamente la transcripción de la región tardía. El mecanismo mediante el cual el AgT inhibe la transcripción temprana no se conoce con detalle.

Una vez que ha comenzado la transcripción de la región tardía, se producen dos moléculas de mRNA, una se traducirá generando VP1 y la otra dará lugar a VP2 y VP3 y, en función de la especie de poliomavirus, la agnoproteína también se traducirá. Las proteínas se transportan al núcleo donde tendrá lugar el ensamblaje de la cápside. La liberación de las partículas víricas tiene lugar mediante lisis de las células huésped o mediante vesículas citoplasmáticas (Cole y Conzen, 2001). El ciclo replicativo de poliomavirus dura aproximadamente 36 – 44 horas.

1.9.5. Oncogenicidad

Los antígenos tumorales reciben este nombre al ser antígenos dominantes en animales portadores de tumores que han sido inducidos víricamente (Black *et al.*, 1963). El AgT es una fosfoproteína nuclear de 700 aa y el Agt tiene 172 – 174 aa.

Estos antígenos son proteínas multifuncionales. Algunas de las funciones que presentan residen en dominios funcionales discretos y otras requieren de la interacción entre diferentes dominios y/o la acción independiente de dos o más dominios (Brodsky y Pipas, 1998). El AgT (Figura 18) se une a proteínas de la familia retinoblastoma (pRb) inactivándolas y

degradándolas. Para poder realizar esta función requiere del motivo LXCXE y un dominio J. La unión a pRb provoca el desplazamiento físico y la liberación del factor de transcripción E2F, estimulando así la transcripción de genes involucrados con la entrada celular en fase de síntesis de DNA (fase S). La respuesta celular a dicho fenómeno suele provocar la activación de p53 y en última estancia la muerte celular por apoptosis, aunque la unión del AgT a p53 inactiva su función y provoca un aumento en la longevidad de la célula huésped, asegurándose así de una generación elevada de partículas víricas descendientes. El AgT se une a secuencias específicas del ORI del DNA vírico y recluta la maquinaria sintética de la célula huésped mediante la unión del complejo DNA polimerasa α /primasa y la proteína de replicación A (RPA). Además, el Agt presenta actividad helicasa. En cultivo celular el AgT es imprescindible para poder realizar infecciones productivas. Asimismo, aunque no es absolutamente esencial, contribuye a la infección y transcripción. Si se bloquea la infección productiva pero continua habiendo expresión del AgT, tendrán lugar fenómenos de transformación celular. Este fenómeno tiene lugar normalmente en huéspedes no permisivos o huéspedes permisivos que han sufrido mutaciones en el ORI. El AgT comparte muchas funciones con las proteínas E1A y E1B de los adenovirus (Rao *et al.*, 1992).

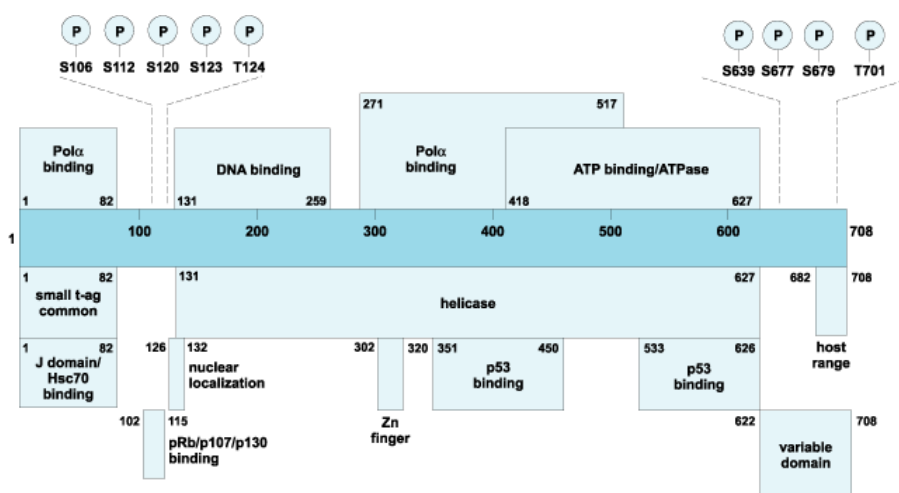


Figura 18. Dominios funcionales de AgT en SV40. Los números representan los residuos aminoacídicos. Se han resaltado algunas regiones de interés: “small t-ag common” es la región de codificación del AgT y común para ambos antígenos, AgT y Agt; “pRb/p107/p130 binding” es la región necesaria para la unión de la proteína de retinoblastoma supresora de tumores y las proteínas p107 y p130 relacionadas con pRb; “p53 binding” es la región que requerida para la unión la proteína supresora de tumores p53; “variable domain” es la región que contiene las diferencias de aa entre cepas víricas. Los círculos que contienen una P indican posiciones de fosforilación (Stewart *et al.*, 1996)

Más recientemente, se ha descubierto en SV40 y MPyV un nuevo antígeno tumoral al que, por su pequeño tamaño, se le ha denominado antígeno T tiny, ya que comparte los primeros 131 aa del AgT. El papel que juega tiny se desconoce hasta el momento.

1.9.6. Vías de transmisión de poliomavirus humanos

Aunque las vías de transmisión de los poliomavirus humanos son todavía desconocidas, la mayoría de los investigadores coinciden en que la entrada podría tener lugar a través del tracto respiratorio o alimentario (Sundsford *et al.*, 1994). Se sabe que JCPyV y BKPyV infectan de manera persistente el tracto urinario y, en el caso de JCPyV, también el cerebro. BKPyV fue aislado a partir de cultivo de tejido procedente de las amígdalas de pacientes con enfermedades respiratorias (Goudsmit *et al.*, 1982) y de la orina de niños con amigdalitis aguda (Goudsmit *et al.*, 1981). Sundsford *et al.* (1994) aislaron DNA de BKPyV en muestras del tracto nasofaríngeo de niños que presentaban problemas respiratorios agudos, aunque no fue posible aislar ninguno de los dos virus a partir de muestras de saliva procedente de individuos adultos inmunosuprimidos o inmunocompetentes, hecho que sugirió al tracto alimentario con vía de entrada de los poliomavirus al organismo. JCPyV ha sido detectado en amígdalas y linfocitos obtenidos a partir de amígdalas (Monaco *et al.*, 1998a; Monaco *et al.*, 1998b), así como en tejido del tracto gastrointestinal (Ricciardiello *et al.*, 2000).

Debido a que se desconoce el lugar donde se produce la infección primaria, resulta difícil conocer la vía de entrada de los poliomavirus al organismo. Se ha especulado una posible transmisión transplacental de ambos virus, justificando así la reactivación que tiene lugar durante el embarazo (Coleman *et al.*, 1980). No obstante, ya que el recién nacido se encuentra en íntimo contacto con la madre tras el parto, es difícil discernir entre la transmisión transplacental y otras vías de transmisión. Esta potencial ruta de transmisión a edades tempranas no se corresponde con la edad de seroconversión descrita, aunque se ha especulado también que la seroconversión podría deberse a una reactivación por los cambios hormonales característicos de la pubertad, en lugar de por una infección primaria.

1.9.7. Poliomavirus de células de Merkel

El carcinoma de células de Merkel (MCC) fue descrito por Toker en el 1972 como un carcinoma trabecular de la piel (Toker, 1972), es una malignidad cutánea agresiva que afecta predominantemente a los caucásicos, de género masculino en edad adulta, y en pacientes

inmunosuprimidos, además de los pacientes trasplantados y con HIV, es propenso a la recurrencia local y a la metástasis en nódulos linfoides regionales. El riesgo de MCC se incrementa en pacientes con otros tipos de malignidades y su incidencia está incrementando de manera preocupante (Andea *et al.*, 2008; Becker, 2010), relacionándose con determinados factores ambientales, mayor población inmunosuprimida y con el avance en el inmunodiagnóstico que también puede contribuir con un mayor número de MCC diagnosticados (Pulitzer *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010).

MCPyV fue descrito por primera vez en junio de 2008 (Feng *et al.*, 2008) y se identificó su genoma en múltiples MCC. Un 80% de MCC ha mostrado la presencia del genoma de MCPyV en comparación con 8% en tejidos de controles normales y 16% de otros tumores de piel (Tolstov *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009). Se ha descrito en secreciones respiratorias, sugiriendo que puede ser transmitido a través de la ruta respiratoria (Bialasiewicz *et al.*, 2009; Goh *et al.*, 2009). No obstante, la mayoría de MCPyV aislados en tumores de MCC poseen dos mutaciones que dificultan su transmisión, los virus suelen estar integrados en el genoma de la célula huésped en un formato monoclonal y el AgT sufre modificaciones que imposibilitan que éste favorezca que la célula huésped entre en la fase S, necesaria para la propagación del virus (Shuda *et al.*, 2008). Las principales evidencias que relacionan a MCPyV como la causa de los tumores de MCC que están infectados con el virus provienen de estudios donde se utiliza partículas víricas con oncoproteínas inhibidas, la baja presencia de estas proteínas virales causa la muerte celular de tumores de MCC positivos para MCPyV, mientras que no se observa ningún efecto en las células de los tumores negativos para MCPyV (Houben *et al.*, 2010). Acontecimiento indicativo que MCPyV es necesario para el mantenimiento de las células tumorales positivas para el virus.

1.9.8. Epidemiología

Resulta un hecho más que destacable dentro del marco conceptual de la epidemiología de los poliomavirus humanos que numerosos estudios seroepidemiológicos hayan presentado resultados evidenciando que 60% – 80% de la población adulta de diferentes áreas geográficas del mundo poseen anticuerpos frente a JCPyV y BKPyV o ambos simultáneamente. A pesar de las dificultades existentes a la hora de comparar estudios de esta índole, se ha constatado una elevada similitud en cuanto a la seroprevalencia presentada por zonas distantes dentro del mismo continente, así como la existencia de los máximos porcentajes de positivos en grupos heterogéneos que rondan los 50 y 60 años de edad.

Reforzando la idea presentada, Brown *et al.* (1975) documentaron que existe seropositividad frente a estos virus incluso en muestras poblacionales remotas que han sido expuestas a enfermedades víricas convencionales de transmisión aérea. Aunque la presencia de anticuerpos frente a los poliomavirus humanos se incrementa bruscamente durante la infancia, el momento de adquisición de éstos no ha sido examinado comparativamente en un estudio específicamente diseñado con tal fin. No obstante, parece que la infección por BKPyV se adquiere durante una edad temprana próxima a las 4 años y que la infección por JCPyV entre los 10 – 14 años. Un trabajo reciente realizado en Italia ha descrito la seroprevalencia de MCPyV en una población de estudio formada por cerca de 1.000 individuos, observando un 45% de positivos en niños menores de 10 años y llegando hasta un 60% en la población comprendida entre 10 – 20 años de edad (Viscidi *et al.*, 2011).

1.10. Otros virus presentes en la contaminación ambiental

1.10.1. Enterovirus

Los enterovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae* (“pico” pequeño; “rna” por ácido ribonucleico) y está integrada por 10 géneros y 28 especies. En estudios serológicos se han identificado 66 serotipos de enterovirus humanos en base a test de neutralización de anticuerpos (Oberste *et al.*, 1999). Atendiendo a su patogénesis en humanos y animales, los enterovirus fueron originalmente clasificados en cuatro grupos: Poliovirus, Coxsackie A virus, Coxsackie B virus y Echovirus, pero se observó rápidamente la existencia de solapamientos en las propiedades biológicas de los diferentes grupos. Los Enterovirus afectan a millones de personas en todo el mundo cada año, encontrándose frecuentemente en las secreciones respiratorias (saliva, esputo o moco nasal) y deposiciones de personas infectadas. Históricamente, la poliomielitis era la enfermedad más significativa causada por un enterovirus. Son virus RNA monocatenarios sin envuelta lipídica y estructura icosaédrica, los viriones son muy resistentes a los cambios de pH, aunque son sensibles al cloro y a la radiación ultravioleta (Racaniello, 2001). Son un grupo de agentes virales que habitan en el intestino de individuos sanos y son responsables de importantes y frecuentes enfermedades humanas con manifestaciones clínicas muy variadas, aunque la mayoría de infecciones son asintomáticas. Los síntomas varían desde parálisis, meningitis, cardiopatías o simples constipados acompañados de fiebre. El agua residual puede contener enterovirus a concentraciones de hasta 10^8 GC/L (Schvoerer *et al.*, 2001), mientras que la vacunación

mediante virus inactivados (poliovirus 1, 2 y 3) ha reducido drásticamente la presencia de poliovirus en el ambiente de regiones donde se ha aplicado la vacuna con éxito. *Coxsackievirus B* es frecuentemente identificado en muestras ambientales, especialmente B3, B4 y B5 (Hughes *et al.*, 1992), mientras que los Echovirus se identifican con menos frecuencia (Morris y Sharp, 1984), aunque algunos estudios siguen describiendo su presencia (Lee y Kim, 2002; Borchardt *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2008).

1.10.2. Astrovirus

La familia *Astroviridae* se estableció con un solo género, *Astrovirus*, que incluye astrovirus humanos y animales (Matsui y Greenberg, 2001; Monroe, 1993). En la actualidad la familia se divide en dos géneros según su origen y estructura genómica: *Mamastrovirus* que afectan a mamíferos incluyendo al hombre y *Avastrovirus* aislados de especies aviares. Bajo microscopía electrónica tienen aspecto de estrella de 5 o 6 puntas; son virus icosaédricos, sin envoltura y tienen un genoma compuesto por RNA de una sola hebra con polaridad positiva. Se han asociado a casos esporádicos y pequeños brotes de diarrea principalmente en niños, aunque los adultos también pueden verse afectados (Glass *et al.*, 1996). Estudios donde se analiza la presencia de astrovirus en agua residual cruda de origen urbano describen concentraciones que oscilan entre $10^3 - 10^5$ GC/mL (Le Cann *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2008) y muestran una resistencia en agua de bebida similar a la de los rotavirus y adenovirus, aunque son más sensibles a elevadas temperaturas (Abad *et al.*, 1997b).

1.10.3. Rotavirus

La primera descripción de rotavirus (del latín *rota*: rueda) se realizó a través del microscopio electrónico en el 1973, observándose su apariencia característica parecida a una rueda (Bishop *et al.*, 1973). Los rotavirus son virus no envueltos, icosaédricos y en su cápside se observan 3 capas proteicas concéntricas (capa Externa, Media e Interna) (Kapikian *et al.*, 2001). El genoma está compuesto de 11 segmentos de RNA de doble-hebra, que codifican por seis proteínas estructurales (VP1 – VP6) y seis no estructurales (NSP1 – NSP6). Los virus son estables en el medio ambiente y pueden llegar a medir 76,5 nm de diámetro. Se clasifican dentro de la familia *Reoviridae*. Según las propiedades antigénicas de la proteína de cápside interna VP6, se diferencian siete serogrupos (A – G) y dos subgrupos (I y II) (Estes y Cohen, 1989). De estos serogrupos se consideran patógenos para el hombre los A, B y C.

El grupo A (RVA) es el rotavirus humano más común y el más esparcido, causando el 90% de las infecciones y considerándose así el principal agente etiológico de gastroenteritis viral en niños. Es responsable de un número de muertes significativas en países en desarrollo, donde anualmente mueren 600.000 niños (Parashar *et al.*, 2006). Entre los países desarrollados, RVA es una causa de morbilidad con un elevado coste socio-económico (Charles *et al.*, 2006; Parashar *et al.*, 2006). Viriones de RVA son excretados en concentraciones extremadamente elevadas (superiores a 10^{10} partículas víricas por gramo) en las heces de niños infectados que padecen gastroenteritis aguda, y pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo (Carter, 2005; Bosch *et al.*, 2008). Las características de los viriones, incluyendo una elevada estabilidad en ambientes acuáticos y resistencia a tratamientos de aguas, facilita su transmisión a través de agua contaminada (Ansari *et al.*, 1991; Espinosa *et al.*, 2008). Un estudio realizado recientemente en Río de Janeiro describe la presencia de RVA en agua residual cruda entre $10^4 - 10^7$ GC/L, mientras que en agua residual tratada las concentraciones oscilan entre $10^3 - 10^5$ GC/L (Fumian *et al.*, 2011).

En el 2006, dos vacunas contra rotavirus mostraron ser seguras y efectivas en los niños: Rotarix[®] desarrollada por los laboratorios GlaxoSmithKline y creada a base de virus vivos atenuados y RotaTeq[®], desarrollada por los laboratorios Merck y creada con virus recombinantes humanos y bovinos. Ambas se administran vía oral y contienen virus vivos atenuados. En 2010, Rotarix[®] dejó de comercializarse en Estados Unidos y España debido a que se hallaron restos de DNA de un virus denominado circovirus porcino tipo 1 (PCV1), aunque hasta la fecha no se ha demostrado ningún efecto adverso en humanos o cerdos asociado a la presencia de PCV1. Baylis *et al.*, 2011, acaban de publicar un trabajo donde se sugiere que, a pesar que PCV1 se encuentra encapsidado dentro de la vacuna Rotarix[®], no ha demostrado capacidad de producir infección *in vitro*.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos se describen a continuación:

- 1) Evaluar la evolución de la prevalencia de infecciones por HAV y HEV en la población a través del análisis de las aguas residuales, considerando las mejoras en los sistemas de saneamiento y la implementación de nuevos programas de vacunación anti-HAV.
- 2) Evaluar la prevalencia y diversidad de las cepas de HEV que infectan a la población humana y su reservorio animal.
- 3) Identificar HEV en muestras clínicas (suero) para estudiar la incidencia y características de las hepatitis E agudas en la población.
- 4) Estudiar la presencia de nuevos poliomavirus (KIPyV, WUPyV y MCPyV) en muestras de agua residual y río para determinar sus patrones de excreción y diseminación.
- 5) Evaluar la eficiencia de eliminación de patógenos virales e indicadores microbiológicos de contaminación fecal en plantas de tratamiento de agua residual.
- 6) Definir nuevos indicadores microbiológicos de contaminación fecal para la mejora del control de calidad del agua regenerada.
- 7) Desarrollar un nuevo protocolo para la concentración de partículas víricas en agua residual que sea eficiente y de reducido coste, con el objetivo de que pueda ser implementado en laboratorios de rutina y en países con bajo desarrollo económico.
- 8) Determinar los niveles de contaminación de origen vírico en moluscos bivalvos introducidos en la cadena alimentaria a nivel de mercado.
- 9) Valorar la eficiencia de eliminación de virus humanos en plantas depuradoras de moluscos bivalvos.
- 10) Mejorar los controles microbiológicos de contaminación fecal en moluscos bivalvos.
- 11) Desarrollar un modelo matemático que nos permita evaluar el riesgo de infección y enfermedad por NoV asociado al consumo de moluscos bivalvos.

The main objectives are described below:

- 1) To evaluate the evolution of the prevalence of HAV and HEV in the population through the analysis of sewage, considering the sanitation improvements and the implementation of new programs for anti-HAV vaccination.
- 2) To evaluate the prevalence and diversity of HEV strains that infects the human population and its animal reservoir.
- 3) To identify HEV in clinical samples (serum) to study the incidence and characteristics of acute hepatitis E in the population.
- 4) To study the presence of new polyomaviruses (KIPyV, WUPyV and MCPyV) in sewage and river samples to determine their excretion patterns and dissemination.
- 5) To evaluate the removal efficiency of viral pathogens and microbial indicators of faecal contamination in sewage treatment plants.
- 6) To define new microbiological indicators of faecal contamination to improve the quality control of reclaimed water.
- 7) To develop a new efficient and low cost protocol for the concentration of viral particles from sewage, with the goal of potentially implement it in routine laboratories and countries with poor economic development.
- 8) To determine the levels of viral contamination in bivalve molluscan introduced into the food chain at the market level.
- 9) To evaluate the efficiency in human virus removal in bivalve molluscan depuration plants.
- 10) To improve microbiological controls of faecal contamination in bivalve molluscan shellfish.
- 11) To develop a mathematical model that allows us to assess the risk of NoV infection and disease associated with consumption of bivalve molluscan.

3. PUBLICACIONES

Esta Tesis Doctoral está basada en las siguientes publicaciones (orden cronológico):

1. **Clemente-Casares P, Rodriguez-Manzano J, Girones R.** Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *J Water Health*. 2009; 7(4):664-73.
2. **Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R.** Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health*. 2010; 8(2):346-54.
3. **Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Carratala A, Girones R.** Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology*. 2010; 7:141.
4. **Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R.** Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol*. 2012; In press.
5. **Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R.** New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. Sometido a *J Virol Methods*. 2012.
6. **Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Calgua B, Carratala A, Maluquer de Motes C, Rusiñol M, Moresco V, Ramos AP, Martínez-Marca F, Calvo M, Barardi CRM, Bofill-Mas S, Girones R.** Failure to remove viral contamination in molluscan shellfish applying current depuration treatments. Sometido a *Int J Food Microbiol*. 2012.
7. **Rodriguez-Manzano J, Bouwknecht M, van den Berg HH, Teunis PF, de Roda Husman AM.** Quantitative risk assessment for human norovirus infection due to oyster consumption. Manuscrito preparado para su sumisión a *Risk Anal*. 2012.



Informe sobre la participación del doctorando en los artículos presentados.

Clemente-Casares P, Rodriguez-Manzano J, Girones R (2009). Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *Journal of Water and Health*. 7(4):664-73.

El doctorando ha llevado a cabo una gran parte de trabajo experimental en todas las etapas del estudio. Ha realizado la concentración de virus en las muestras procesadas, la detección de partículas víricas, clonación, secuenciación de una parte de los clones obtenidos y ha participado en el análisis de los datos y en la escritura del artículo.

Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R (2010). Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *Journal of Water and Health*. 8(2):346-54.

El doctorando ha llevado a cabo la mayor parte del trabajo experimental; tratamiento y análisis de las muestras de suero y muestras ambientales para HEV y HAV por técnicas moleculares, así como el análisis de las secuencias obtenidas. El doctorando ha participado activamente en la discusión de los resultados y ha escrito el manuscrito bajo la supervisión de la directora de Tesis.

Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Carratala A, Girones R (2010). Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology Journal*. 7:141.

El doctorando participó activamente en el diseño del estudio y ha realizado una parte importante del trabajo experimental; tratamiento de las muestras de agua residual y agua de río, y la detección y análisis de los poliomavirus estudiados. Los demás coautores han contribuido a la cuantificación de otros indicadores virales y a la optimización de las técnicas de concentración de virus en agua. Bajo la supervisión de la directora de tesis el doctorando ha contribuido de forma decisiva en el análisis y discusión de los resultados a la hora de redactar el manuscrito.

Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusñol M, Girones R (2012). Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Science and Technology*. In press.

El doctorando ha llevado a cabo el tratamiento de muestras para los análisis víricos, analizando los principales virus patógenos. Los autores de las otras instituciones han analizado la presencia de bacterias y parásitos. El doctorando ha trabajado en la interpretación de resultados correspondiente y ha coordinado junto con el resto de grupos de investigación la toma de muestra y diseño del estudio aquí presentado, discutiendo los resultados y elaborando el manuscrito junto a la directora de Tesis.

Calgua B, Rodríguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R (2012). New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. Sometido a *J Virol Methods*.

Los dos primeros autores han contribuido de forma equivalente en este estudio y así se ha hecho constar en el artículo enviado para su publicación. El doctorando ha participado en el diseño y desarrollo de los nuevos métodos de concentración de partículas víricas en agua residual propuestos. Ha realizado la evaluación estadística de los datos con la colaboración de un bioestadístico y ha participado activamente en las tareas experimentales. Los otros coautores han contribuido con la preparación de suspensiones virales, recogida de muestras en otras áreas geográficas y análisis de algunos indicadores virales. El doctorando ha contribuido activamente en el análisis e interpretación de los resultados, así como en la elaboración del manuscrito.

Rodríguez-Manzano J, Hundesa A, Calgua B, Carratala A, Maluquer de Motes C, Rusiñol M, Moresco V, Ramos AP, Martínez-Marca F, Calvo M, Barardi CRM, Bofill-Mas S, Girones R (2012). Failure to remove viral contamination in molluscan shellfish applying current depuration treatments. Sometido a *International Journal of Food Microbiology*.

Este es un estudio realizado durante mucho tiempo y en el que han participado empresas depuradoras de moluscos bivalvos y un veterinario con responsabilidades en el control de la calidad de estos productos que son coautores del estudio. El doctorado realizó la gran parte del trabajo experimental, tratamiento de las muestras de moluscos bivalvos y realizando los correspondientes análisis. Los otros autores de la UB, colaboraron con el doctorando en la optimización y comparación de métodos de recuperación de virus en moluscos bivalvos y en el análisis de virus en algunas de las muestras analizadas. El doctorando ha participado en el diseño de los experimentos incluidos en el trabajo y ha redactado el manuscrito bajo la supervisión de la directora de Tesis.

Rodríguez-Manzano J, Bouwknecht M, van den Berg HH, Teunis PF, de Roda Husman AM (2012). Quantitative risk assessment for human norovirus infection due to oyster consumption. Manuscrito preparado para su sumisión a *Risk Analysis*.

El doctorando ha diseñado la modelización matemática e interpretación de los resultados durante la estancia realizada en 2008 en el Instituto Nacional de Salud Pública y Ambiental (RIVM), Holanda. Ha contribuido de forma decisiva en la redacción del manuscrito bajo la supervisión de la Dra. Ana Maria de Roda Husman.

Ninguno de los coautores de los artículos ha utilizado los datos descritos en estos artículos para la elaboración de su Tesis Doctoral.

Prof. Rosina Gironés Llop
Barcelona, a 20 de marzo de 2012



Informe sobre el factor de impacto de los artículos presentados en la Tesis Doctoral.

Las publicaciones que forman parte de la Tesis Doctoral presentada por Jesús Rodríguez Manzano han sido publicadas o se han sometido para su publicación en revistas científicas relevantes en la línea de investigación en que ha participado, perteneciendo tanto al ámbito básico como aplicado.

Los artículos ***“Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain”*** y ***“Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples”*** fueron publicados en ***Journal of Water and Health*** en los años 2009 y 2010, en que esta revista presentó índices de impacto de **1,469** y **1,625**, respectivamente. El artículo ***“Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants”*** fue publicado en ***Virology Journal*** en el año 2010, en que esta revista presentó un índice de impacto de **2,550**. El artículo ***“Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water”*** ha sido aceptado en la revista ***Water Science and Technology***, que en 2010 presentó un índice de impacto de **1,056**. El artículo ***“New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR”*** se ha sometido a ***Journal of Virological Methods***, que en 2011 mostró un índice de impacto de **2,262**. El artículo ***“Failure to remove viral contamination in molluscan shellfish applying current depuration treatments”*** se ha sometido en ***International Journal of Food Microbiology***, que en el año 2011 presentó un índice de impacto de **3,143**. El último de los artículos ***“Quantitative risk assessment for human norovirus infection due to oyster consumption”*** está preparado para su sumisión a ***Risk Analysis***, que en el año 2010 mostró un índice de impacto de **2,096**.

Firmado:

Prof. Rosina Gironés Llop

Barcelona, Marzo de 2012

4. RESULTADOS

Capítulo I

Infecciones por virus patógenos en la población, análisis de la prevalencia y diseminación ambiental

RESUMEN ESTUDIO 1:**Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples**

Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R

Journal of Water and Health. 2010; 8(2):346-54

INTRODUCCIÓN

Europa y Norteamérica se consideran regiones no endémicas para HEV debido a que las tasas de seropositividad descritas oscilan entre 1% – 5% y la mayoría de las infecciones identificadas se asocian con casos importados. No obstante, en los últimos años se está registrando un incremento de casos esporádicos de hepatitis agudas asociados a este patógeno. Al mismo tiempo, España se considera una región de baja endemicidad para HAV y diversos estudios publicados recientemente confirman la progresiva reducción de la prevalencia de anti-HAV, aproximándose a valores de países caracterizados como de endemicidad baja. Desde octubre de 1999 en la Comunidad Autónoma de Cataluña se administra la vacuna combinada frente a los virus de la hepatitis A y B (Twinrix®) a los niños de 12 años de edad, con una cobertura de vacunación del 90%. Por otro lado, en la Comunidad Autónoma de Valencia (limitando al norte con Cataluña) la vacuna contra HAV se administra únicamente entre grupos de riesgos, principalmente manipuladores de alimentos. Hasta la fecha, no hay una vacuna contra HEV comercialmente disponible para humanos.

El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar la evolución de los patrones de excreción de HAV y HEV en la población ubicada en el noreste de España mediante el análisis de los virus excretados en agua residual urbana, con la intención de evaluar el potencial impacto correspondiente a las mejoras en los sistemas de saneamiento y a la implementación de programas de vacunación para HAV. Al mismo tiempo, se evaluó la presencia de HEV en muestras de suero procedentes de pacientes con hepatitis agudas con el objetivo de confirmar y caracterizar la infección de cepas autóctonas de este patógeno en la población de estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparando con estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, la proporción de muestras de agua residual cruda positivas para HEV descritas en Cataluña ha caído de un 43% (1994 – 2002) hasta establecerse en un 30% (2006 – 2008), mostrando una concentración media de 10^1 GC/mL. Cuatro muestras de suero de un total de 19 (obtenidas en pacientes con hepatitis agudas) fueron positivas para el RNA de HEV. Los resultados demuestran que HEV está circulando en la población del área estudiada y que el agua residual sigue representando una potencial fuente de contaminación para este patógeno. Respecto HAV, en el periodo 1994 – 2002 se reportó un 57% de muestras de agua residual positivas procedentes de Cataluña, mientras que los muestreos del periodo 2007 – 2008 evidencian únicamente un 3% de muestras positivas. También se cuantificó la presencia de HAV, observando valores medios de 10^2 GC/mL de agua residual cruda. No se han observado diferencias en la prevalencia de HEV y HAV en el agua residual de ambas comunidades autónomas durante el periodo 2006 – 2008, demostrándose que la reducción no está restringida a una zona concreta y que por lo tanto no se vincula estrictamente con un programa de vacunación específico. El nivel de contaminación fecal de los puntos de muestreo fue evaluado mediante la determinación de la concentración de HAdV cuantificados por qPCR. Como se esperaba, HAdV fue detectado en el 100% de las muestras de agua residual analizadas y la concentración registrada fue mayor a 10^3 GC/mL, valores frecuentemente observados en agua residual cruda de origen urbano, corroborando un nivel adecuado de contaminación fecal y descartando este motivo como el responsable de la disminución de HAV. Simultáneamente, se realizaron análisis de aguas residuales procedentes del norte de Egipto, zona endémica para HAV, presentando una elevada proporción de muestras positivas. Los datos obtenidos sugieren que las mejoras realizadas en saneamiento, la implementación de plantas depuradoras y el desarrollo de nuevos tratamientos de agua residual es un factor determinante para la reducción de enfermedades transmitidas oro-fecalmente en una población determinada.

Todas las secuencias víricas identificadas en agua residual para HEV mostraron genotipo 3, excepto una muestra que se identificó como genotipo 1. Las secuencias identificadas entre las muestras de suero mostraron el mismo resultado, una única muestra positiva identificada como genotipo 1 y correspondiente con un paciente que había viajado recientemente a India. La variabilidad de secuencias de HEV detectadas en agua residual muestra una gran diversidad entre las secuencias del genotipo 3 que simultáneamente circulan

en la población estudiada. La detección esporádica de HEV genotipo 1, considerada típica de zonas endémicas y sin reservorio animal asociado, nos indica que las infecciones de HEV se han establecido en la población humana de Europa y que una pequeña proporción de este genotipo también circula en países industrializados.

CONCLUSIONES

La reciente disponibilidad de una vacuna eficiente para prevenir infecciones por HAV, la implementación de programas de vacunación de amplia distribución y las constantes mejoras en las condiciones sanitarias prometen una reducción en la circulación de virus en la población y en los niveles de excreción de HAV en el agua residual. La drástica reducción observada en la presencia de HAV en agua residual procedente del este de España puede justificarse con las mejoras generales en los sistemas de saneamiento. No obstante, estas mejoras parecen no haber tenido un efecto equivalente en la circulación del genotipo 3 de HEV en la misma zona de estudio. La continua circulación de este genotipo puede verse establecida por la presencia de reservorios animales, ya que las infecciones en cerdos representan una fuente externa de HEV en la población humana. Los resultados obtenidos sugieren que HEV ha reemplazado a HAV como la hepatitis vírica potencialmente transmitida a través de agua y alimentos más frecuentemente detectada en el este de España.

Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples

Jesus Rodriguez-Manzano, Marize Miagostovich, Ayalkibet Hundesa, Pilar Clemente-Casares, Anna Carratala, Maria Buti, Rosend Jordi and Rosina Girones

ABSTRACT

The aim of the study was to analyse the evolution of the prevalence of HAV and HEV in the population of eastern Spain by analysing the viruses excreted in urban sewage. Raw urban sewage samples were collected and analysed during several years using RT-PCR techniques and sequencing analysis. Two limiting regions were analysed, one of them having implemented HAV vaccination programs. Acute symptomatic HEV cases were also examined. Results were compared with those from previous studies in the area using identical methodology. The percentage of positive HAV samples in urban sewage fell from 57.4% to 3.1% in 5–10 years in the two studied areas in Spain. Around 30% of the urban sewage samples were positive for HEV in the absence of agricultural sources of contamination. HEV RNA was also detected in four clinical cases of acute hepatitis. The dramatic reduction in the presence of HAV in raw urban sewage observed in eastern Spain could be most likely related to the general improvement in sanitation. However, these improvements would not have an equivalent effect on the circulation of HEV and this observation could be explained by the presence of animal reservoirs for HEV, which act as external sources of infections.

Key words | acute hepatitis, HAV, HEV, sanitation, vaccination, wastewater

Jesus Rodriguez-Manzano
Ayalkibet Hundesa
Anna Carratala
Pilar Clemente-Casares*
Rosina Girones (corresponding author)
 Department of Microbiology, Faculty of Biology,
 University of Barcelona,
 Avd. Diagonal 645,
 08028 Barcelona,
 Spain
 Tel.: 34-93-4021483
 Fax: 34-93-4039047
 E-mail: rgirones@ub.edu
 *Present address
 CRIB, University of Castilla-La Mancha,
 Avda Almansa 14,
 02006 Albacete,
 Spain

Marize Miagostovich
 Department of Virology,
 Institute Oswaldo Cruz, Fiocruz,
 Avda Brasil 4365,
 21045-900, Rio de Janeiro,
 Brazil

Maria Buti
Rosend Jordi
 Hospital General Universitario Valle Hebrón
 and Ciber-Ehd,
 Paseo de la Vall d'Hebron, 119-129,
 08035 Barcelona,
 Spain

ABBREVIATIONS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	HBsAg	Hepatitis B surface antigen
DNA	Deoxyribonucleic acid	HCV	Hepatitis C virus
EIA	Enzyme immunoassay	HEV	Hepatitis E virus
EMEM	Eagle's minimum essential medium	IgG	Immunoglobulin G
FDA	Food and Drug Administration	IgM	Immunoglobulin M
GC	Genomic copies	NAs	Nucleic acids
HAdV	Human adenovirus	NCBI	National Center for Biotechnology
HAV	Hepatitis A virus	NE	Northeast
HBeAg	Hepatitis B e-antigen	NJ	Neighbour joining

ORF2	Open Reading Frame 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
QPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
VP1/2A	Viral Protein 1/2A

INTRODUCTION

Hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) are small, non-enveloped viruses that contain positive sense, single-stranded RNA genomes of 7.5 and 7.2 kb, respectively (Purcell & Emerson 2008). HAV has its own genus (*Hepatovirus*) within the family *Picornaviridae* whereas HEV is the sole member of the genus *Hepevirus* and family *Hepeviridae* (Emerson *et al.* 2005; Nainan *et al.* 2006). Both viruses cause acute, self-limited infections that may vary in severity from asymptomatic to fulminant (Purcell & Emerson 2008). The most common route of transmission is generally faecal-oral (Orrù *et al.* 2004) and it causes large-scale epidemics.

Hepatitis A affects humans worldwide. HAV infection is endemic to developing countries where most individuals are exposed to this virus during childhood (Jacobsen & Koopman 2004). Hepatitis E is the major cause of waterborne outbreaks and sporadic cases of acute hepatitis in many developing countries where sanitation is suboptimal and where HEV is considered endemic (Clemente-Casares *et al.* 2003; Emerson & Purcell 2004). Typically, the disease caused is self-limited but it sometimes has severe complications, particularly in pregnant women, who register a high mortality rate (20%) (Balayan 1997).

Traditionally, North America and Europe have been considered non-endemic regions for HEV as they have seroprevalence rates of 1 to 5% and most HEV infections are thought to be imported (Paul *et al.* 1994). However, in the last few years several HEV strains associated with sporadic acute hepatitis and genetically distinct from the endemic ones have been isolated from human serum samples in North America and in some European countries (Clemente-Casares *et al.* 2009; Legrand-Abravanel *et al.* 2009). A recent study conducted in the same area, Catalonia

(NE Spain), showed a seroprevalence of about 7.3% (Buti *et al.* 2006). There is also evidence that some animals, particularly swine, are infected by HEV genotypes 3 and 4. Both genotypes have been recovered from swine principally in the same regions that these genotypes were recovered from humans (Meng *et al.* 1997; Purcell & Emerson 2008). With few exceptions, genotypes 3 and 4 appear not to produce disease in swine (Martín *et al.* 2007). In certain regions, including Spain, swine and human HEV strains are not genetically distinguishable (Clemente-Casares *et al.* 2009), thereby supporting the notion that swine are a reservoir and that HEV infection is acquired by handling these animals or eating raw pork products.

Spain is considered an area of low endemicity for HAV infection (Bell 2002) and is characterized by diminishing HAV seroprevalence in the population (Jacobsen & Koopman 2004), while it is a non-endemic area for HEV (Yarborough 1999). Previous studies in Spain show that even in the absence of significant numbers of clinical cases of acute hepatitis A and E, HAV and HEV are present in more than 50 and 40%, respectively, of urban sewage samples analysed, thereby indicating a high level of subclinical infection in the population (Pina *et al.* 2001; Clemente-Casares *et al.* 2003).

In 2001, the FDA approved a new combination vaccine against HAV and the hepatitis B virus. The vaccine, called Twinrix, contains the approved vaccine Havrix[®] (Hepatitis A Vaccine, Inactivated) (US Food and Drug Administration 2001). Twinrix has been distributed in a pilot program in Catalonia for pre-adolescents since 1999. In Valencia, a region immediately south of Catalonia, HAV vaccines are distributed only among groups at risk as a result of handling food. No HEV vaccine is currently available for humans.

By 2006, 235,170 and 11,826 doses of vaccines against HAV had been distributed in Catalonia (covering around 90% of pre-adolescents) and Valencia (in the professional food handler group), respectively (Departament de Salut, Generalitat de Catalunya 2008; Direcció general de salut pública, conselleria de sanitat, Generalitat Valenciana 2008).

This study analyses changes in the excretion patterns of HAV and HEV in eastern Spain by testing the presence of these viruses in urban sewage over several years in order to evaluate the potential impact of improvements in sanitation

and vaccination programs for HAV. Serum samples from acute hepatitis patients were also analysed to confirm the presence of HEV strains in the population.

METHODS

Sewage samples

Sampling areas were selected on the basis of the vaccination programs applied for HAV. Samples were collected in Barcelona and Valencia, the largest cities in Catalonia and Valencia respectively, both in Spain. A total of 91 urban sewage samples were collected in Barcelona (50 samples) and Valencia (41 samples) from 2000 to 2008. Samples were collected at the entry of two treatment plants in Catalonia receiving sewage from a population of about 1.8 million (Barcelona) and three plants from the area of Valencia, with a total population of about 800,000 inhabitants. Each sample was harvested in a sterile 500-ml polyethylene container and kept at 4°C for less than 8 h until the virus particles were concentrated.

Clinical samples

From 2004 to 2007, 19 serum samples were collected from patients with symptomatic acute hepatitis attending the Hospital General Valle Hebron (Barcelona, Spain). All patients had elevated aminotransferase levels (>10 times the upper normal limit) and IgG anti-HEV antibodies. Clinical serum samples were also analysed for other viral infections. Hepatitis B surface antigen and antibody to HCV (anti-HCV) were detected by commercial enzyme immunoassays (Vitros HBsAg and Vitros anti-HCV; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). IgM anti-HBc and IgM anti-HAV were detected by enzyme immunoassays (Liaison HBsAg/anti-HBe, Liaison HBc IgM and Liaison HAV IgM, respectively; Diasorin, Vercelli, Italy). IgG anti-HEV was the routine assay in use for HEV infections and was determined by EIA (Bioelisa HEV IgG; Biokit, Barcelona, Spain). Serum samples were stored at -80°C until use for detecting genomic sequences. Other causes of acute hepatitis such as autoimmune hepatitis or biliary stones were excluded.

Viruses

The positive controls used for the analysis of HAV consisted on dilutions of the supernatant of FRhK-4 cell cultures infected with pHM-175 strain. As positive controls for HEV analysis, 10% faecal suspensions obtained from rhesus monkeys experimentally infected with a strain isolated from a sewage sample collected in Barcelona (Pina *et al.* 1998) were used. HAdV2, isolated from a clinical sample and used as positive control for the determinations of human adenoviruses, was grown on A549 cells propagated in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 1% glutamine, 50 µg of gentamicin per ml, and 5% (growth medium) or 2% (maintenance medium) of heat-inactivated FBS. Viral suspensions were stored at -80°C until use.

Concentration of viruses from urban sewage

The method used to recover virus particles from sewage samples was chosen on the basis of previous studies (Puig *et al.* 1994; Pina *et al.* 1998). Briefly, 42 ml of sewage was ultracentrifuged at 110,000 × g for 1 h at 4°C to pellet all the viral particles together with any suspended material. The pellet was eluted by mixing it with 3.5 ml of 0.25 N glycine buffer (pH 9.5) on ice for 30 min and, after addition of 3.5 ml of 2X phosphate-buffered saline, the suspended solids were separated by centrifugation at 12,000 × g for 20 min. Finally, viruses were concentrated by ultracentrifugation at 110,000 × g for 1 h at 4°C, resuspended in 100 µl of phosphate-buffered saline and stored at -80°C.

Nucleic acid extraction

The nucleic acids (NAs) from viral concentrates obtained from sewage samples were extracted following a highly sensitive and efficient procedure (Puig *et al.* 1994) described by Boom *et al.* (Boom *et al.* 1990). This procedure is based on the use of guanidinium isothiocyanate and silica particles.

For clinical serum samples, QIAamp RNA Blood Mini Kit® (Qiagen, Valencia, Spain) was used for the viral RNA extraction, following the manufacturer's instructions.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

All samples were analysed with primers designed to amplify a region within the ORF2 of HEV (Erker *et al.* 1999) (semi-nested RT-PCR) and a non-coding region of 5' end of HAV (Pina *et al.* 2001) (nested RT-PCR). The VP1/2A region was used to characterize HAV-positive samples by sequencing (Pina *et al.* 2001). Positive and negative controls extracted in parallel and inhibition controls were added to the PCR assays. The results of the PCRs using OneStep[®] RT-PCR kit from Qiagen, for a typical one-step reaction, and the 50- μ l reaction mixture containing PCR Gold Buffer, 1.2 mM MgCl₂ and 2 U of AmpliTaq[®] Gold (Applied Biosystems, New Jersey, USA), for a second PCR amplification cycle, were analysed by electrophoresis on agarose gels to 3% (w/v), followed by staining with ethidium bromide at 0.5 μ g/ml. The amplicons were viewed using an Image Master[®] VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Analysis of sewage samples by QPCR

HAV- and HEV-positive samples by nested PCR were quantified by real-time PCR (Jothikumar *et al.* 2005b, 2006). Five microlitres of the extracted RNA, corresponding to 2.1 ml sewage, was analysed. Five microlitres of ten-fold dilutions (from 5×10^0 to 5×10^7 GC/5 μ l) of a plasmid suspension were used as standard. Amplification reactions were performed with the QuantiTect[™] Probe RT-PCR kit reagents (Qiagen).

Human adenoviruses (HAdVs) were determined in each location. The viral load of HAdV was used to discard negative HAV and HEV results caused by the absence of human faecal contamination, which could influence the results of the study (Bofill-Mas *et al.* 2006).

QPCR amplification reactions for HAdV were carried out using TaqMan[®] Universal PCR Master Mix reagents (Applied Biosystems), as previously described (Jothikumar *et al.* 2005a; Bofill-Mas *et al.* 2006). The HAdV 41 used in the construction of the standards was kindly donated by Dr Annika Allard at the University of Umeå, Sweden. Ten microlitres of the NA extractions were analysed, corresponding to 4.2 ml of sewage sample. Dilutions from 10^{-1} to 10^7 CG/10 μ l of the standard were analysed in triplicate.

In all PCR assays, standard precautions were taken by using separate areas for the diverse steps of the protocols. Negative controls, inhibition controls and positive controls were added in each assay. Positive results were confirmed by sequencing analysis of the amplified DNA. The QPCRs were conducted in a thermocycler Stratagene[®] MX3000P (Stratagene, La Jolla, USA). All the samples and their respective dilutions were analysed in duplicate.

Sequencing and analysis of viral genomes

Amplicons obtained with the nested PCR were purified using a QIAquick[®] purification kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Both strands of the purified DNA amplicons were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1[®] (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Products were checked using an ABI PRISM 377 analyser (Applied Biosystems) by the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona. The sequences were compared with the nucleotide sequences present in the GenBank using the BLAST program of the NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and aligned using the Clustal X 1.8 program. Phylogenetic tree reconstructions were performed with Mega 3.1 (www.megasoftware.net). Evolutionary distances were determined by the Kimura two-parameter equation, and the tree was constructed by using the neighbour-joining (NJ) algorithm. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this study are FJ010829-FJ010840 (HAV in sewage), FJ010841-FJ010844 (HEV in serum samples) and FJ010845-FJ010858 and EU729700 (HEV in sewage).

RESULTS AND DISCUSSION

This study was designed as a comparative analysis for the evaluation of changes in excretion patterns of acute hepatitis viruses in eastern Spain. Previous studies conducted in our laboratory between 1994 and 2002 analysed environmental and clinical samples using the same protocols as in this study and reported a frequent presence of HAV and HEV in urban sewage (Pina *et al.* 2001;

Clemente-Casares *et al.* 2003). The recent availability of an efficient vaccine against HAV infections, the implementation of vaccination programs for a high proportion of the susceptible population and a general improvement in sanitary conditions are expected to decrease the circulation of the virus in the population and the levels of excretion of HAV in the urban sewage generated.

Presence and concentration of HAV and HEV

Average viral concentrations in wastewater, as determined by the QPCR assays, were 1.6×10^2 GC/ml for HAV and 3.2×10^1 GC/ml for HEV. The results on the prevalence of positive HAV and HEV samples using RT-PCR assays were equivalent in the two regions in NE Spain (Table 1).

HEV was detected in clinical serum samples using nested RT-PCR. Four of the 19 analysed serum samples analysed were positive for HEV RNA, with one sample also being positive for IgM anti-HAV and one positive for anti-HCV antibodies without HCV RNA. These results confirm that HEV circulates in the population and that it causes sporadic clinical cases of acute hepatitis.

In 2001, Pina *et al.* (Pina *et al.* 2001), using the same methodology as in the present study, analysed HAV strains excreted in sewage in the area of Barcelona and also the HAV strains responsible for acute hepatitis A clinical infections in Barcelona. These authors found that 57.4% (31/54) of the sewage samples collected from 1994 to 2000 were positive for HAV and identified clinical HAV infections. In addition, the distribution of HAV was found to be equivalent to the strains detected in urban sewage. That

study is considered a reference for the evaluation of changes in the epidemiological pattern of HAV in the study area.

The results obtained in this study show a marked reduction in the prevalence of HAV in the study area, thereby suggesting that the higher risk of this population to acquire HAV infection is at present through personal or food-borne transmission from other areas with a higher level of endemicity.

General immunization in adolescents has a protective effect on the population; however, the pattern of HAV excretion in urban sewage did not differ significantly between the two regions in Spain, one of which has a general vaccination program while the other does not. However, what is unquestionable is that vaccination is the only measure that guarantees individual protection against HAV infections in susceptible populations.

Improvements in sanitation would include not only improvements in water treatment but also improvements in hygienic and preventive practices that will better protect the environment, water and food from contamination, reducing the overall exposure and the number of infections and excreted viruses in the population. HAV is known to be a very stable virus (Siegl *et al.* 1984). The samples analysed in this study were raw urban sewage samples presenting standard concentrations of human adenoviruses and without any treatment (Bofill-Mas *et al.* 2006). The observed differences in the presence of HAV in the samples would be then related with higher probability to the reduction in the prevalence and excretion of hepatitis A viruses in the population than to significant changes in the stability of the viruses or in the level of faecal contamination in the sewage.

Table 1 | Presence of hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) in urban wastewater

Country/Area	Year	HAV	HEV
		Nested PCR	Semi-nested PCR
Spain/Barcelona	1994–2002	31/54* (57.4%)	20/46* (43.5%)
Spain/Barcelona	2000–2004	5/18 (27.8%)	7/18 (38.9%)
Spain/Barcelona	2006–2008	1/32 (3.1%)	9/32 (28.1%)
Spain/Valencia	2007–2008	1/41 (2.4%)	13/41 (31.7%)

The results for nested and semi-nested assays are represented as positive samples/samples analysed (percentage of positives samples).

*The results shown were obtained from previous studies Pina *et al.* (2001) and Clemente-Casares *et al.* (2003), respectively.

Concentration of HAdV in wastewater samples

The level of human faecal contamination of the sampling sites was evaluated by determining the concentration of HAdV using QPCR. As expected, HAdV was detected in 100% of the analysed samples and the main value of concentration was 1.5×10^5 GC/ml of water tested. These values are frequently observed in urban sewage and are used as a marker of faecal contamination in contaminated water (Bofill-Mas *et al.* 2006).

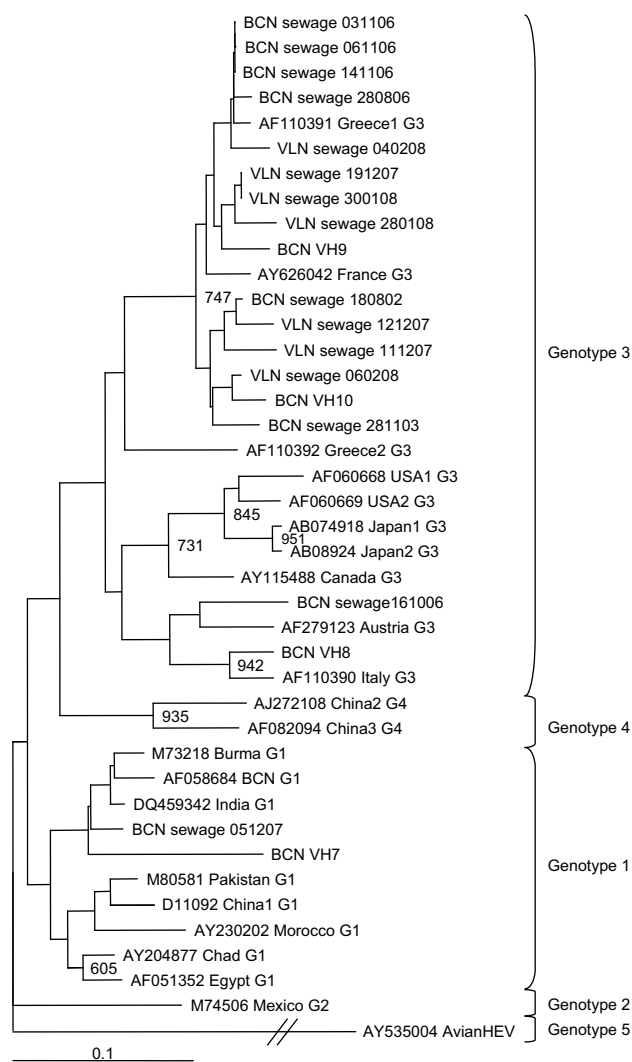


Figure 1 | Dendrogram constructed by alignment of the 101 nucleotide sequences within the ORF2 region of HEV based on the neighbour-joining method. An avian HEV strain is included as outgroup. GenBank accession number and genotype (G) are reported. BCN (Barcelona) and VLN (Valencia) are the strains obtained in this study. Strains obtained from human sera are indicated as BCN VH.

Genetic characterization of the HAV and HEV strains

The sequences of HAV and HEV detected were compared with sequences described in previous studies in the same area and sequences available in databases. Five out of seven positive HAV sequences detected by amplification of the VP1/2A region (290 bp) were genotyped. The strains detected in Spain belonged to genotype IA and IB. Only two urban sewage samples were positive for HAV among the samples collected in Spain between 2006 and 2008,

one from Barcelona, genotype IB, and one from Valencia, genotype IA.

Fifteen out of 29 positive samples for HEV were genotyped and the HEV strains detected were analysed by comparing the 101 bp sequence amplified in the ORF2 region. As expected, most of the HEV strains detected in samples from Barcelona and Valencia corresponded to genotype 3. However, in one sample from Barcelona, a genotype 1 HEV strain was identified. Three of the HEV strains identified from serum samples belonged to genotype 3, and one to genotype 1, the latter case corresponding to a person that had travelled to India during the previous month. Phylogenetic relationships between HEV strains isolated in Barcelona and Valencia were established by comparing the representative strains (Figure 1).

CONCLUSIONS

A previous study on HEV in the area around Barcelona (Clemente-Casares *et al.* 2003) showed a prevalence of positive samples of 43.5% (20/46) in urban sewage samples collected during 1994–2002. In the last years the prevalence appeared to be established at around 30% in the two study areas of Spain, with average concentrations of 3.2×10^1 GC/ml. These results demonstrate that HEV is circulating in the human population of this area and that urban sewage may be a source of contamination by this pathogen. Moreover, the information available on the high prevalence of HEV infections in swine (Meng *et al.* 1999; Pina *et al.* 2000) strongly suggests that HEV strains of swine origin transmitted through direct or indirect contact with infected pigs or through contaminated swine products or manure contribute to the circulation of HEV genotype 3 in the population.

The results of the present study show no detectable differences in the level of excretion of HAV in Barcelona, a place where all pre-adolescents have been vaccinated against HAV since 1999, compared to Valencia, where only risk groups are vaccinated. This observation strongly suggests that the reduction in HAV circulation does not occur in a single area of Spain, nor is this decrease related to a specific vaccination program. For HAV, 27.8% of sewage samples collected from 2000 to 2004 were positive.

This period could be considered a transition period and the results could be attributed to the ongoing improvements in sanitation. From the samples collected since 2006, HAV was detected in only one sample (3.1%) from Barcelona and in one sample (2.4%) from Valencia. Meanwhile, during this study, HAV was analysed in faecally contaminated water samples collected in north Egypt, an endemic area for this virus (Fix *et al.* 2006), which was present in a very high proportion of analysed samples (authors' unpublished results). Implementation of wastewater treatments and sewage treatment plants is a determinant factor in reducing faecally transmitted diseases in a population. From 1992 to 2008, the region of Catalonia experienced a significant increase in the number of sewage treatment plants (from 91 to 343) and in the total volume of wastewater depurated (from 991,892 to 2,786,871 m³/day).

The results obtained on the prevalence of HEV showed a more stable excretion pattern in the population of NE Spain, with percentages of 28.1, 38.9 and 31.7% of positive urban sewage samples over the years studied after 2000 (Table 1). The concentration of HEV in positive urban sewage samples was lower than that of HAV, being 10¹ CG/ml and 10² CG/ml, respectively. The observed concentration of HAdV was much higher, which registered more than 10⁵ CG/ml in all the samples analysed from Spain. This finding demonstrates the presence of faecal contamination in the samples studied and supports the applicability of human adenoviruses as indicators of human faecal contamination.

The studies of the amplified viral sequences showed the variability of HAV and HEV strains present in sewage. Although the sizes of the sequences were small, previous comparative studies have shown that the sequences analysed can be used for typification studies. In addition, the phylogenetic trees produced in this study show equivalent topographies to those obtained when longer sequences were analysed (Pina *et al.* 2001; Clemente-Casares *et al.* 2003; Bofill-Mas *et al.* 2006). All the viral sequences obtained differed from the positive controls used in the experiments, thereby demonstrating the absence of cross contamination in the study. All the HEV strains identified were classified as genotype 3, except one sample which was in genotype 1. Furthermore, the genotyping of the viruses identified in clinical serum samples revealed the same

results as for HEV, that is to say, most cases showed the presence of genotype 3, while one sample belonged to genotype 1, in this case in a patient who had recently travelled to India. The variability of HEV sequences detected in urban sewage samples in the studied area shows that diverse genotype 3 strains simultaneously circulate in the population. The sporadic detection of HEV genotype 1, considered typical of endemic regions and without animal reservoirs identified to date, indicates that HEV infections are well established in the human population in Europe and that a small proportion of genotype 1 strains also circulate in industrialized countries.

The results obtained in this study strongly suggest that HEV has replaced HAV as the most frequently detected hepatitis virus potentially transmitted through local faecally contaminated water or food in eastern Spain.

In industrialized countries such as the United States, a decline in the frequency of hepatitis A and in the mortality rate was observed in the past decade (serologic results and other approach) (Bell *et al.* 2005; Vogt *et al.* 2008). The study of the viruses present in urban sewage provides a useful approach to obtaining global information on their molecular epidemiology considering also subclinical infections in the population (Pina *et al.* 2001).

The dramatic reduction in the presence of HAV in sewage observed in eastern Spain could be most likely related to improvements in sanitation. However, these improvements have not had an equivalent effect on the circulation of HEV genotype 3 in the area. The continued circulation of this genotype would be maintained through animal hosts as HEV infections in swine represent an external source of HEV in the human population.

ACKNOWLEDGEMENTS

During the development of this study, Marize Miagostovich held a post-doctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq–210129/2006-9). Jesus Rodríguez-Manzano is a fellow of the Spanish Government, MICINN. We thank the Serveis Científic-Tècnics at the University of Barcelona for sequencing the PCR products. We also thank Hospital Valle Hebron and the INIA laboratory in Valencia for providing serum and

raw sewage samples. The research described in the manuscript was supported by a grant of Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (project AGL2005-07776-C03-02) and the Grup de Recerca Consolidat of the Generalitat de Catalunya (2005SGR00592).

REFERENCES

- Balayan, M. S. 1997 Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **4**(3), 155–165.
- Bell, B. P. 2002 Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies. In Tenth International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, GA, USA, 9–13 April 2002, p. 9.
- Bell, B. P., Kruszon-Moran, D., Shapiro, C. N., Lambert, S. B., McQuillan, G. M. & Margolis, H. S. 2005 Hepatitis A virus infection in the United States: Serologic results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Vaccine* **23**(50), 5798–5806.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. & Girones, R. 2006 Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(12), 7894–7896.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. J., Wertheim-van Dillen, P. M. E. & Van der Noordaa, J. 1990 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**(3), 495–503.
- Buti, M., Domínguez, A., Plans, P., Jardí, R., Schaper, M., Espuñes, J., Cardeñosa, N., Rodríguez-Frías, F., Esteban, R., Plasència, A. & Salleras, L. 2006 Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**(12), 1328–1332.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Martín, M., Bofill-Mas, S. & Girones, R. 2005 Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* **9**(4), 448–454.
- Clemente-Casares, P., Rodríguez-Manzano, J. & Girones, R. 2009 Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population in Spain. *J. Water Health* **7**(4), 664–673.
- Departament de Salut, Generalitat de Catalunya 2008 (available at <http://www.gencat.cat/salut>).
- Direcció general de salut pública, conselleria de sanitat, Generalitat Valenciana 2008 (available at <http://www.sp.san.gva.es/rvn/>).
- Emerson, S. U. & Purcell, R. H. 2004 Running like water—the omnipresence of hepatitis E. *N. Engl. J. Med.* **351**(23), 2367–2368.
- Emerson, S. U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X. J., Purdy, M., Schlauder, G. G. & Tsarev, S. A. 2005 Hepevirus. In *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV* (ed. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball), pp. 853–857. Elsevier Academic Press, London.
- Erker, J. C., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. 1999 Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods* **81**(1–2), 109–113.
- Fix, A. D., Abdel-Hamid, M., Purcell, R. H., Shehata, M. H., Abdel-Aziz, F., Mikhail, N., el Sebai, H., Nafeh, M., Habib, M., Arthur, R. R., Emerson, S. U. & Strickland, G. T. 2006 Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**(4), 519–523.
- Jacobsen, K. H. & Koopman, J. S. 2004 Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol. Infect.* **132**(6), 1005–1022.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Hill, V. R., Lu, X., Sobsey, M. D. & Erdman, D. D. 2005a Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6), 3131–3136.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D. & Robertson, B. H. 2005b Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6), 3359–3363.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J. & Hill, V. R. 2006 A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* **131**(1), 65–71.
- Legrand-Abrevanel, F., Mansuy, J. M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J. M., Rostaing, L. & Izopet, J. 2009 Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg. Infect. Dis.* **15**(1), 110–114.
- Martín, M., Segalés, J., Huang, F. F., Guenette, D. K., Mateu, E., de Deus, N. & Meng, X. J. 2007 Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet. Microbiol.* **122**(1–2), 16–24.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. 1997 A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**(18), 9860–9865.
- Meng, X. J., Dea, S., Engle, R. E., Friendship, R., Lyoo, Y. S., Sirinarumit, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. 1999 Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.* **59**(3), 297–302.
- Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G. & Margolis, H. S. 2006 Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**(1), 63–79.
- Orrù, G., Masia, G., Orrù, G., Romanò, L., Piras, V. & Coppola, R. C. 2004 Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J. Virol. Methods* **118**(2), 77–82.
- Paul, D. A., Knigge, M. F., Ritter, A., Gutierrez, R., Pilot-Matias, T., Chau, K. H. & Dawson, G. J. 1994 Determination of hepatitis

- E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *Infect. Dis.* **169**(4), 801–806.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Girones, R. 1998 Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11), 4485–4488.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J. & Girones, R. 2000 HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.* **33**(5), 826–833.
- Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J. & Girones, R. 2001 Genetic analysis of the hepatitis A virus strains recovered from the environment and from acute hepatitis patients. *J. Gen. Virol.* **82**(12), 2955–2963.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. & Girones, R. 1994 Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(8), 2963–2970.
- Purcell, R. H. & Emerson, S. U. 2008 Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* **48**(3), 494–503.
- Siegl, G., Weitz, M. & Kronauer, G. 1984 Stability of hepatitis A virus. *Intervirology* **22**(4), 218–226.
- US Food and Drug Administration 2001 FDA Talk Paper (available at <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2001/ANS01084.html>).
- Vogt, T. M., Wise, M. E., Bell, B. P. & Finelli, L. 2008 Declining hepatitis A mortality in the United States during the era of hepatitis A vaccination. *J. Infect. Dis.* **197**(9), 1282–1288.
- Yarborough, P. O. 1999 Hepatitis E virus. *Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches. Intervirology* **42**(2–3), 179–184.

First received 3 March 2009; accepted in revised form 24 July 2009. Available online 9 November 2009

RESUMEN ESTUDIO 2:**Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain**Clemente-Casares P, Rodriguez-Manzano J, Girones R*Journal of Water and Health*. 2009; 7(4):664-73**INTRODUCCIÓN**

En los países en desarrollo es habitual identificar hepatitis agudas esporádicas y epidemias causadas por HEV, principalmente vinculadas a una transmisión de origen hídrico. Tradicionalmente, los países industrializados se han considerado zonas no endémicas para este patógeno, donde todos los casos esporádicos identificados se asociaban con cepas importadas. El estudio de la presencia de un patógeno determinado en el agua residual generada por una población concreta proporciona una visión global de su excreción, y por lo tanto de la prevalencia de una infección en esa población. Estudios previos realizados en la Comunidad Autónoma de Cataluña (Barcelona) muestran la presencia de HEV en agua residual, identificando más de veinte cepas autóctonas distintas, principalmente correspondientes al genotipo 3.

El estudio aquí descrito tiene como objetivo caracterizar la diversidad de las cepas de HEV presentes en muestras de agua residual, biosólidos y lodos que potencialmente pueden contaminar el agua y el medio ambiente, así como determinar si genotipos distintos al 3 se encuentran circulando de forma habitual a través del agua residual y los biosólidos de zonas industrializadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seis muestras de agua residual urbana, dos muestras de biosólidos urbanos y dos muestras de lodos procedentes de un matadero de ganado bovino y porcino (80% ganado porcino), todas ellas positivas para HEV, han sido estudiadas mediante la clonación y secuenciación de 10 – 12 clones/muestra con la intención de obtener información acerca de la potencial diversidad de las cepas de HEV excretadas en la población estudiada. Un total de 101

clones fueron secuenciados y los resultados muestran que la mayoría de cepas identificadas pertenecen al genotipo 3 (74 clones). Dos muestras de agua residual y un biosólido mostraron cepas perteneciente al genotipo 1, mientras que las dos muestras de lodos de matadero mostraron estar contaminadas únicamente con el genotipo 3, tal y como cabía esperar. Las secuencias obtenidas en las muestras de origen animal mostraron una elevada similaridad con cepas de origen humano previamente reportadas en la misma región de estudio. La similaridad de secuencias obtenidas en las diferentes muestras estudiadas (intra-muestra) oscila entre 89% – 99%.

La variabilidad de secuencias de HEV observadas en este estudio sugiere que diversas cepas de HEV están circulando de forma habitual entre la población de la zona estudiada. En concordancia con el elevado número de muestras de agua residual positivas para HEV descritas en estudios previos en Barcelona y los valores de seroprevalencia reportados recientemente (7.3%), infecciones por HEV en humanos (principalmente subclínicas) son probablemente más prevalentes de lo esperado.

CONCLUSIONES

Cepas autóctonas de HEV han sido descritas como responsables de infecciones identificadas en países industrializados, previamente considerados como zonas no endémicas. Las cepas de HEV circulantes en una de estas regiones localizada en el sureste de Europa (Barcelona, España) han sido estudiadas a través del análisis de amplicones obtenidos a partir de genomas de HEV identificados en muestras de agua residual, biosólidos y lodos. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de cepas de HEV pertenecientes al genotipo 3 y 1, mostrando una circulación simultánea de cepas diversas de HEV entre la población de la región estudiada. En las muestras de lodos procedentes de mataderos de ganado bovino/porcino únicamente se identificó el genotipo 3 y se observó una elevada similaridad con cepas de origen humano identificadas previamente en la misma zona de estudio, probando que las mismas cepas son responsables de infecciones en humanos y cerdos. La circulación esporádica del genotipo 1 en áreas industrializadas representa un problema potencial a nivel de salud pública desde el momento en que HEV está asociado con importantes epidemias donde se reportan elevadas tasas de mortalidad, especialmente entre mujeres embarazadas. La contaminación de agua y alimentos a través del contacto con agua residual tratada incorrectamente y biosólidos representa un riesgo significativo para la población humana incluso en países industrializados.

Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain

Pilar Clemente-Casares, Jesus Rodriguez-Manzano and Rosina Girones

ABSTRACT

Autochthonous hepatitis E virus (HEV) strains have been described infecting populations of industrialized countries, previously considered as non-endemic areas. The HEV strains circulating in one of those areas in south-western Europe (Barcelona, Spain) have been studied by analysing amplicons obtained from HEV genomes identified in wastewater, biosolids and sludge. Six sewage and two biosolid HEV positive samples from urban wastewater treatment plants and two positive HEV sludge samples with animal contamination were analysed by cloning and sequencing of 10–12 clones per sample. The results proved the presence of HEV strains belonging to genotype 3 and also sporadically to genotype 1 in urban sewage and biosolids, showing the simultaneous circulation of diverse HEV strains in the human population of the studied area. Only HEV genotype 3 was identified in slaughterhouse sludge samples. The circulation of genotype 1 in industrialized areas may have further health implications since this genotype has been associated with important epidemics in developing areas. Contamination of food and water through their contact with sewage not properly treated and biosolids presenting HEV may represent a significant risk for human populations in relation to HEV even in industrialized areas.

Key words | biosolids, environmental contamination, hepatitis E, *Hepevirus*, sewage, sludge

Pilar Clemente-Casares
Jesus Rodriguez-Manzano
Rosina Girones (corresponding author)
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona,
Avinguda Diagonal 645,
08028 Barcelona,
Spain
Tel.: +34-93-4021483
Fax: +34-93-4039047
E-mail: rgirones@ub.edu

Pilar Clemente-Casares
CRIB, University of Castilla-La Mancha,
Avenida Almansa 14,
02006 Albacete,
Spain

ABBREVIATIONS

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
ORF2	open reading frame 2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus responsible for more than 50% of acute hepatitis in developing countries (Yarborough 1999). In these areas, sporadic and epidemic acute hepatitis E are frequently identified, mainly due to

faecally contaminated water (Emerson & Purcell 2003). Traditionally, industrialized countries have been considered non-endemic areas for this virus, as only sporadic cases related to imported strains were diagnosed (Bader *et al.* 1991; Dawson *et al.* 1992). However, several HEV isolates have recently been identified from patients with acute hepatitis who lived in developed areas and with no history of travelling to endemic areas (Schlauder *et al.* 1998, 1999; Worm *et al.* 1998; Zanetti *et al.* 1999; Pina *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2001, 2002; Mizuo *et al.* 2002). The HEV strains isolated from these cases, which belong to genotypes 3 and 4, can be considered autochthonous of these industrialized areas and seem to have a low pathogenic profile (Purcell & Emerson 2008). However, the arrival and circulation of genotypes 1 and 2 in these areas may have further health implications since these genotypes have been associated with important epidemics. During these

epidemics, high mortality rates have been observed, especially in pregnant women (Balayan 1997).

Studying the presence of a pathogen in the sewage generated by a population provides a global view of the excretion, and therefore the prevalence of infection in this population. A previous study carried out in Barcelona revealed the presence of HEV strains in 43.5% of the sewage samples collected between 1994 and 2002 (Clemente-Casares *et al.* 2003). More than 20 autochthonous strains have been identified since then in urban sewage in Barcelona (Spain), where the seroprevalence in a population sample has recently been estimated as 7.3% (Buti *et al.* 2006). The sequences detected belonged to genotype 3 (Clemente-Casares *et al.* 2003; Bofill-Mas *et al.* 2006; Albinana-Gimenez *et al.* 2006).

Viruses present in wastewater effluents are discharged into aquatic environments. They also accumulate in the biosolids or sludge generated during the treatment of wastewater, which are sometimes applied to fields or used as fertilizers (Straub *et al.* 1993). Accidental contamination of food and water by these viruses represents a risk for human populations. In a study conducted in Barcelona (Bofill-Mas *et al.* 2006), HEV was detected in two out of five biosolid samples collected from an urban sewage treatment plant. Although most of the sequences found were very similar to others previously detected in Barcelona (genotype 3), genotype 1 HEV sequences were also identified.

HEV has also been detected infecting swine, deer, wild boars, mongooses and chickens (Meng *et al.* 1997; Haqshenas *et al.* 2001; Matsuda *et al.* 2003; Tei *et al.* 2003). The strains isolated from the mammals, which belong to genotypes 3 and 4, are very similar to those infecting humans, especially if they have been detected in the same area (Hsieh *et al.* 1998; Haqshenas *et al.* 2001). Indeed, transmission of HEV to humans due to the consumption of uncooked meat from deer and wild boars has already been proven (Matsuda *et al.* 2003; Tei *et al.* 2003). Several research works performed in Spain allowed the detection of naturally HEV infected pigs and also the presence of the virus in sewage and sludge generated in slaughterhouses (Pina *et al.* 2000; Clemente-Casares *et al.* 2003; Albinana-Gimenez *et al.* 2006; Seminati *et al.* 2008; Fernandez-Barredo *et al.* 2007). The arrival of those animal HEV strains in the environment can also represent a risk for human populations.

The objective of this study is the further characterization of the diversity of HEV strains that may be in one wastewater or sludge/biosolid sample that can potentially contaminate water and the environment and to determine whether genotypes other than genotype 3 are present in the wastewater and sludge generated in an industrialized area.

MATERIALS AND METHODS

Urban wastewater treatment plant samples

Urban sewage samples and biosolids generated during sewage treatment were collected from the sewage network of Barcelona (Spain) during the years 2001, 2003, 2005 and 2007. Each sample was collected in a sterile container and kept at 4°C for less than 8 hours until the viral particles were concentrated in phosphate buffered saline (PBS pH 7.3). Positive HEV samples identified by seminested-PCR were selected (six sewage samples and two biosolid samples). A summary of the studied samples is presented in Table 1. The presence of HEV in sewage from Barcelona has been estimated in previous studies as 43.5% (Clemente-Casares *et al.* 2003). Six out of 34 HEV-typified sewage samples were selected for this study. Two HEV positive biosolids of four tested samples (Bofill-Mas *et al.* 2006) were also included.

Slaughterhouse samples

Sludge samples with contamination of animal origin were collected in a slaughterhouse located in Catalonia (Spain) in 2004 and 2006. This slaughterhouse dealt with bovine and, especially, porcine adult animals (more than 80% of the processed animals were pigs). The samples were collected in sterile containers and kept at 4°C for less than 8 hours prior to the concentration of the viral particles. Two positive HEV sludge samples (out of five tested by Albinana-Gimenez *et al.* (2006) and Hundesa *et al.* (2006)) were selected for the study.

Viruses

Faecal suspensions obtained from monkeys (*Macaca mulatta*) infected with the HEV BCN strain (10% in PBS

Table 1 | Typification and diversity of the HEV strains identified by cloning the amplicons obtained from the analysed samples

Sample	Type of sample	Sampling (year/month)	Sequences found	% Intra-sample similarity	Genotype
BCN8	Urban sewage	2001/April	3 (BCN8.1 to 3)	90–96	G3
BCN10	Urban sewage	2001/May	1 (BCN10)	–	G3
BCN25	Urban sewage	2003/March	1 (BCN25)	–	G3
BCN26	Urban sewage	2003/May	5 (BCN26.1 to 5)	94–99	G3
BCN23	Urban sewage	2005/February	1 (BCN23)	–	G1
BCN27	Urban sewage	2007/December	1 (BCN27)	–	G1
BBCN1	Biosolid*	2005/January	2 (BBCN1.1 & 2)	99	G3
BBCN2	Biosolid*	2005/February	3 (BBCN2.1 to 3)	98–99	G1
E5	Sludge [†]	2004/May	4 (E5, E5.2 to 4)	92–99	G3
E6	Sludge [†]	2006/February	8 (E6.1 to 8)	89–99	G3

*From an urban sewage treatment plant.

†From a slaughterhouse (more than 80% of the processed animals in this slaughterhouse were pigs).

7.3) were used as positive control for the polymerase chain reaction (PCR) analysis. This strain had previously been isolated from sewage from Barcelona although it is genetically similar to Indian HEV genotype 1 strains (Pina *et al.* 1998). The viral suspensions were stored at -80°C .

Concentration of viral particles from sewage samples

The recovery and concentration of viral particles were carried out as described in previous studies. The protocol for processing sewage samples is based on ultracentrifugations and elution in 0.25 N glycine buffer pH 9.5 (Puig *et al.* 1994). Briefly, 42 ml of sewage sample were ultracentrifuged ($110,000 \times g$ for 1 hour at 4°C). The sediment was eluted with 3.5 ml 0.25 N glycine buffer (pH 9.5) and kept on ice for 30 minutes. After the addition of $2 \times \text{PBS}$, the suspension was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 minutes to separate any suspended solids. Viruses in the supernatant were pelleted by ultracentrifugation ($110,000 \times g$ for 1 h at 4°C), resuspended in 0.1 ml $1 \times \text{PBS}$ and stored at -80°C .

Concentration of viral particles from biosolid samples

As described previously (Bofill-Mas *et al.* 2006), 40 g of the biosolid samples were eluted in 50 ml glycine buffer pH 9.5 and stirred for 1 hour. The pH was neutralized with NaOH 5 M and the sample was centrifuged for 45 minutes at $38,400 \times g$ at 4°C . Viral particles contained in the

supernatant were pelleted at $110,000 \times g$ for 1 hour at 4°C and finally eluted in 200 μl PBS. The viral concentrate was stored at -80°C until nucleic acid extraction.

Concentration of viral particles from sludge samples

The sludge samples from the slaughterhouse were processed with the same protocol used for sewage but starting with the elution of 1 g of sludge in 3.5 ml of 0.25 N glycine buffer pH 9.5 (Albinana-Gimenez *et al.* 2006).

RNA extraction

Viral nucleic acids from the samples were extracted with a protocol described previously (Boom *et al.* 1990) using guanidinium isothiocyanate (GuSCN) and adsorption of the nucleic acids to silica particles as described.

Detection of HEV by seminested RT-PCR

The HEV RNA was amplified by seminested RT-PCR with degenerated primers described by Erker *et al.* (1999) using a one-step RT-PCR (Albinana-Gimenez *et al.* 2006), followed by a second-round PCR. Five μl of the extracted nucleic acids and a tenfold dilution, corresponding to 2 and 0.2 ml of sewage, 100 mg and 10 mg of dry weight of biosolid and 50 mg and 5 mg of sludge, were analysed for each sample. Fragments of 198 and 148 bp-long (first-round and

second-round products respectively) were amplified within the ORF2 of the HEV genome.

The RT-PCR assay was performed using the OneStep RT-PCR kit from QIAGEN. Five μl of the extracted nucleic acids or a tenfold dilution were added to a total volume reaction of 50 μl containing 1 \times OneStep QIAGEN Buffer, 2 μl of QIAGEN OneStep Enzyme Mix, 400 μM of each dNTP, 10 units of ribonuclease inhibitor (Applied Biosystems) and 25 pmol of each outer primer (HEVORF2con-a1 and HEVORF2con-s1). After 30 minutes at 50°C, the reaction was heated at 95°C for 15 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 20 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 1 minute. All amplifications were completed with a 10 minute, 72°C extension period.

The second-round PCR was carried out by adding 1 μl of the first-round product to a new batch of 50 μl PCR reaction mixture containing 1 \times PCR Gold Buffer (Perkin-Elmer Roche), 1.5 mM MgCl₂, 10 nmol of each dNTP, 2 units of Ampli Taq Gold[™] (Perkin-Elmer Roche) and 25 pmol of each nested primer (HEVORF2con-a1 and HEVORF2con-s2). The products were analysed by agarose gel electrophoresis using ethidium bromide as a stain.

Standard precautions were applied in all the manipulations in order to reduce the probability of sample contamination by amplified DNA molecules. Negative controls for the RT-PCR reaction and the extraction process were added in every assay and the positive amplifications were confirmed by sequencing analysis. External positive controls were used by adding viral particles to viral concentrates. All samples were also analysed for the presence of viral indicators of faecal contamination, human adenoviruses and porcine adenovirus, and no significant inhibition was observed.

Cloning of the amplicons

The amplicons obtained were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Inc.) and ligated into a pGEM[®]-T EasyVector (pGEM[®]-T EasyVector System II, Promega Co.) following the manufacturer's instructions. The ligation product was used to transform *Escherichia coli* JM109 competent cells (Promega Co.) or DH5 α . Transformed bacterial clones were detected by blue/white

screening. The insert from presumptive transformed clones was amplified by inoculation of some growth into a mix containing 1 \times Reaction Buffer (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, Tween-20) (Bioron, GmbH, Germany), 2 mM MgCl₂, 2 units of Taq DNA polymerase (Bioron, GmbH, Germany), 10 nmol of each dNTP and 10 pmol of the T7 and SP6 primers (sequences contained in the vector). Following a denaturing step of 3 minutes at 94°C, 35 cycles at 94°C for 20 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds were carried out. All amplifications were completed with a 10 minute, 72°C extension period. The products were analysed by agarose gel electrophoresis using ethidium bromide as a stain.

Sequence analysis

Ten to 12 clones per sample were sequenced. The purified DNA was sequenced with the ABI PRISM[™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit version 3.1 with Ampli Taq[®] DNA polymerase FS (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The results were checked using the ABI PRISM 377 automated sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). A fragment of 101 bp of each amplicon was compared with other HEV sequences present in the GenBank and the EMBL (European Molecular Biology Library) using the basic BLAST program of the NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, accessed 20 March 2009). Alignments of the sequences were carried out using the ClustalW program of the EBI (European Bioinformatics Institute of the EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, accessed 20 March 2009). Phylograms were generated by the UPGMA algorithm using the NEIGHBOR program. The robustness of the grouping was determined by bootstrap resampling of the multiple sequence alignments (1,000 sets) with the programs SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR and CONSENSE. The output graphics of the trees were created with the TREEVIEW package, version 1.5 (Page 1996). Sequences present in the databases and used for phylogenetic studies are shown in Table 2. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are EU450839-EU450866 and EU729700. Accession numbers for BCN10, BCN23 and E5, previously reported, are

Table 2 | Nucleotide sequence accession numbers for hepatitis E virus strains used for phylogenetic analysis

Country	Strain*	Accession number	
Barcelona, Spain	BCN	AF058684	
	BCN3	AF490985	
	BCN4	AF491003	
	BCN5	AF490986	
	BCN6	AF490987	
	BCN7	AF490988	
	BCN12	AF490993	
	BCN16	AF490997	
	VH1	AF491000	
	VH2	AF491001	
	VH3	AY540113	
	VH4	AY540114	
	VH5	AY540115	
	Por1	AF491002	
	France	France	AY626042
	Greece	Greece1	AF110391
Greece2		AF110392	
Italy	Italy	AF110390	
Austria	Austria	AF279123	
The Netherlands	SwNe	AF336292	
Canada	SwCanada	AY115488	
United States	USA1	AF060668	
	USA2	AF060669	
	SwUSA	AF082843	
Japan	Japan1	AB074918	
	Japan2	AB089824	
	Japan3	AB220971	
Mexico	Mexico	M74506	
Pakistan	Pakistan	M80581	
Burma	Burma	M73218	
China	China1	D11092	
	China2	AJ272108	
	China3	AF082094	
Chad	Chad	AY204877	
Egypt	Egypt	AF051352	
Morocco	Morocco	AY230202	
India	India	DQ459342	

*As named in Figure 1.

AF490991 (Clemente-Casares *et al.* 2003), DQ400354 and DQ400356 (Albinana-Gimenez *et al.* 2006), respectively.

RESULTS

Six samples of urban sewage, two biosolid samples and two samples of sludge from a slaughterhouse, positive for HEV, were studied by cloning and sequencing of 10–12 clones per sample in order to obtain information on the potential diversity of HEV strains excreted in the population and that may be accumulated in the generated residues. One hundred and six clones were sequenced. The results are summarized in Table 1.

As expected, most of the samples presented HEV genotype 3 strains. Four urban sewage samples (BCN10, BCN23, BCN25 and BCN27) showed just one sequence among all the analysed clones: BCN23 and BCN27 typified as genotype 1. Three different sequences were found from sample BCN8 and five from BCN26. The results obtained from the two biosolid samples collected in the urban sewage treatment plant showed two sequences from BBCN1 and three from BBCN2, BBCN2.1 to BBCN2.3 belonging to genotype 1. More diversity was identified in the sludge samples collected in the slaughterhouse, as four and eight sequences were detected from E5 and E6, respectively. Differences among sequences detected from the same sample ranged from 1% to 11% (Table 1). When comparing different samples, the biggest differences were observed between samples containing sequences belonging to different genotypes: that is, differences between sequences from BCN8 and BBCN2 ranged from 22.8% to 24.8%, and 19.8% to 25.7% between BBCN2 and E6. In contrast, similarities between genotype 3 sequences from samples with human and animal contamination were as high as 98.0% (between BCN26.1 and E5.3).

As expected, genotype 3 was the most prevalent genotype in the area (74 clones), although genotype 1 was also detected. The phylogenetic analysis of the sequences obtained in the study is shown in Figure 1. All the sequences detected from samples BCN8, BCN10, BCN25, BCN26, BBCN1, E5 and E6 belonged to genotype 3. They were very similar or even 100% identical in the studied fragment to other isolates previously

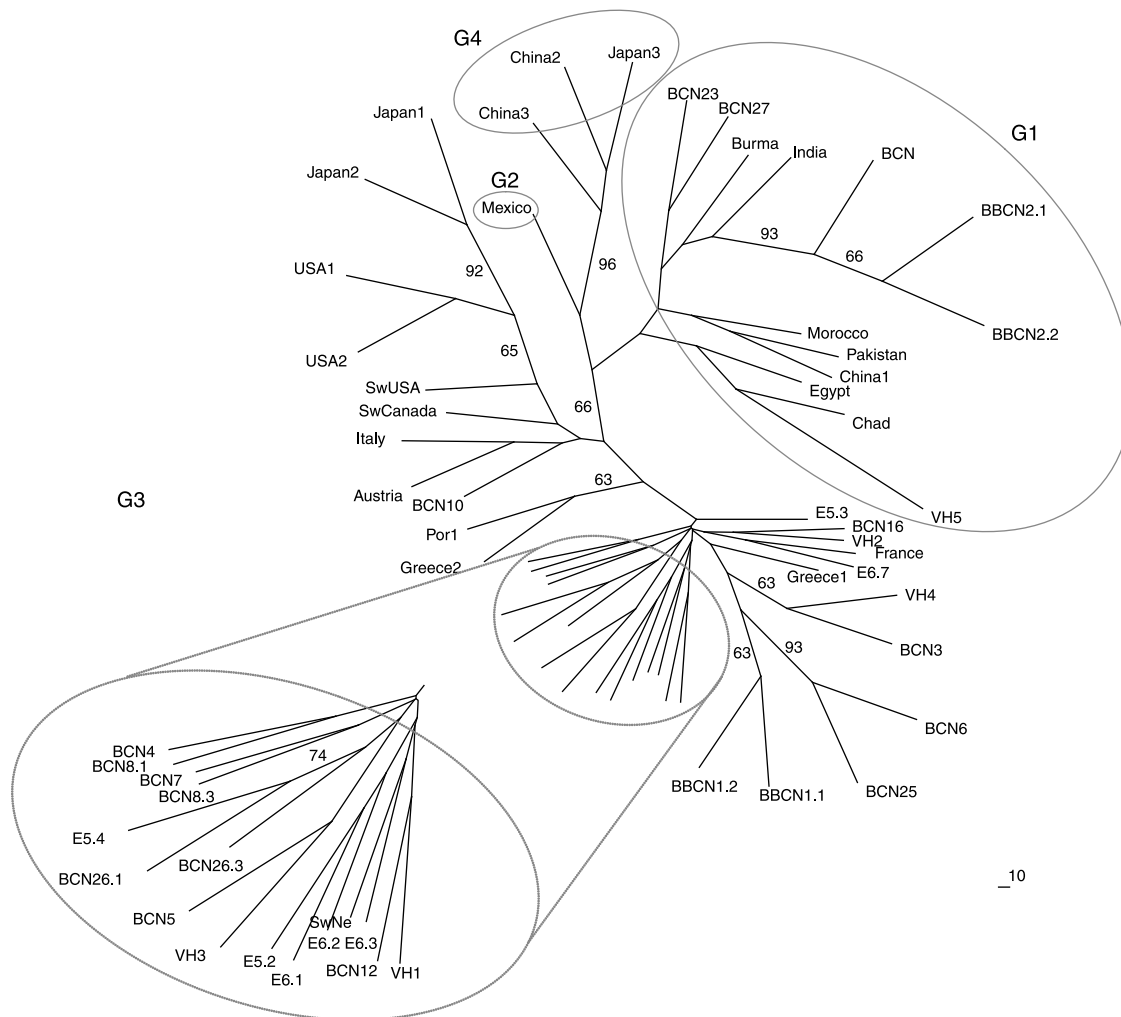


Figure 1 | Unrooted phylogenetic tree depicting relationships over 101 nucleotides within ORF2 among representative HEV strains reported in this study and others isolates from genotype 1, genotype 2, genotype 3 and genotype 4. The internal node numbers represent bootstrap values (1,000 replicates) expressed as the percentage of all trees. Only values greater than 60 are represented. GenBank accession numbers of the sequences used for phylogenetic analysis can be found in [Table 2](#).

detected in Barcelona from sewage and clinical serum samples of hepatitis E cases. BCN23, for example, was 100% identical in the sequenced region to BCN6, detected 2 years before.

Three samples (BCN23, BCN27 and BBCN2) showed sequences belonging to genotype 1. When comparing sequences from BCN23 and BBCN2, collected in the same wastewater treatment plant and during the same month, the identity was only about 92.1–93.1%. BBCN2.1 to BBCN2.3 were 98–100% identical to a strain from South Africa (strain RSA-1) and 98–99% identical to the BCN strain, detected from sewage in Barcelona and previously considered as imported as it clustered within genotype 1

(Pina *et al.* 1998). BCN27 was 97% identical in the studied fragment to BCN23. They were highly similar to the isolate BurmaEpi-1-3 from Myanmar (95.0% and 97%, respectively) and to one from India (DQ459342) (95.0% and 96.0%, respectively). The nucleotide accession numbers of the HEV strains used for the phylogenetic analysis are shown in [Table 2](#).

While genotypes 3 and 1 were found in sewage and biosolid samples with human faecal contamination, sludge containing animal faecal contamination only exhibited sequences belonging to genotype 3 as expected. Those animal HEV sequences were very similar to other European isolates, independently of their human or animal origin;

E6.1 presented the highest identity (97.0%) with the isolate NLSW28 (from swine in the Netherlands) and with BCN12 and BCN9 (from urban sewage from Barcelona). Similar cases are observed with E6.4, E6.8 or E5.2.

DISCUSSION

The variability of HEV sequences observed in this study suggests that diverse HEV strains are commonly circulating in the population of the studied area. According to the high number of sewage samples containing HEV found over previous studies in Barcelona (Clemente-Casares *et al.* 2003) and the seroprevalence values reported by Buti *et al.* 2006 (7.3%), HEV infections in humans (mostly subclinical infections) are probably more prevalent than expected. The low number of identified acute hepatitis E cases in the area (Pina *et al.* 2000; Buti *et al.* 2004) and the short excretion period described for HEV infections would suggest that the frequent detection of HEV in urban sewage must be related to the presence of abundant subclinical infections with excretion of HEV viral particles by the population. The underestimation of the prevalence of HEV infection may be related to multiple reasons including the existence of subclinical infections, the reduction of anti-HEV IgG levels after several years of initial exposure in the population or the lack of antibody response (Buti *et al.* 2004, 2006). The seroprevalence found in Catalonia by Buti *et al.* (2006) is an intermediate value compared with other values reported among blood donors in recent studies conducted in other industrialized areas. According to Bouwknegt *et al.* (2007) seroprevalence in this group is about 2.0% in The Netherlands, while in south-west England or south-west France the seroprevalence is around 16% (Dalton *et al.* 2008; Mansuy *et al.* 2008). However, higher values can be found in endemic areas such as China (43%) or Egypt (45.2%) (Abdelhady *et al.* 1998; Li *et al.* 2006).

It has been confirmed in the study that the predominant genotype in Barcelona is genotype 3, as nearly all the sequences obtained from samples collected in this area belonged to this genotype (Figure 1). In fact, about 92% of the HEV typed samples collected in Barcelona in different studies belonged to genotype 3 and 8% to genotype 1 (Clemente-Casares *et al.* 2003; Albinana-Gimenez *et al.*

2006; Bofill-Mas *et al.* 2006). However, it is significant that HEV genotype 1 was also detected in BCN23 and BBCN2 collected in 2005 and BCN27 collected in 2007. Only genotype 3 was detected from samples with animal origin. The sequences with animal origin identified in the study were highly similar to those with human origin in the same area as previously reported (Clemente-Casares *et al.* 2003). With the exception of BCN26, a higher number of different sequences were obtained from samples with animal contamination than from those with human contamination.

Although the methods applied in this study allow the detection of a diversity of strains present in one specific sample, some limitations must be considered. The use of an amplification method can potentially lead to the introduction of changes related to the error of the polymerase activity. Although this cannot be completely ruled out, when comparing the obtained sequences with others present in the databases, nucleotide changes were mainly observed in the third position of the codons. In fact, all the isolates obtained presented the aa sequence expected for each genotype and the sequencing of the HEV strain used as a positive control produced an identical sequence after being amplified and sequenced in the diverse studies. It must also be considered that the sequences analysed by cloning amplicons probably represent only some of the most abundant HEV strains of that sample. The diversity of HEV strains present in one sample may be still underestimated considering the potential preferential amplification of some sequences over others by PCR or the study of a limited number of clones. Some sequences present originally in a sample may not be represented among the analysed clones. Thus, the presence of more genotype 1 sequences in the tested samples that would be present in lower numbers among other genotype 3 strains cannot be ruled out.

Genotype 3 infections presumably associated with water have been recently described in Europe. In France, 15 patients were identified having as a risk factor to acquire an HEV infection through the consumption of water either directly from a spring or private well or vegetables from a vegetable garden, irrigated with water from a river or a private well (Renou *et al.* 2008). A study conducted in the Netherlands found one patient whose HEV strain was also

isolated from a ditch near the house 3 months after the onset of illness. This ditch received sewage effluent from a leakage in the household septic tank (Borgen *et al.* 2008). HEV has also been detected contaminating river waters. Genotype 3 sequences were isolated from the river Maas in the Netherlands (Borgen *et al.* 2008) and from two bivalve samples harvested in a Japanese river (Li *et al.* 2007). According to the evidence, environmental isolates in industrialized areas usually correspond to autochthonous sequences of HEV genotype 3, which seems to be less virulent than genotypes 1 and 2 (Purcell & Emerson 2008). However, the identification of genotype 1 sequences in sewage or solid waste in these areas suggests the possibility of sporadic environmental contamination by this genotype, responsible for large epidemics of hepatitis E in developing areas (Emerson & Purcell 2003). Although improved treatment of water and sewage has become the best defence against enterically transmitted diseases, the methods currently applied are usually less effective in removing viruses than enteric bacteria (Rao & Melnick 1986; Bofill-Mas *et al.* 2006). Moreover, those excreted strains accumulate in biosolid/sludge during waste treatment. Thus, suitable disposal and treatment of the sludge/biosolids generated also seems essential. Special attention must be paid when genotype 1 infections without history of recent travel are detected, especially if any association to uncontrolled water sources is pointed out.

CONCLUSIONS

This study provides evidence that diverse HEV strains are commonly infecting humans and pigs in the studied area. Although identified strains infecting pigs have been typified in all samples as genotype 3, sewage and biosolids from urban sewage treatment plants may contain not only diverse HEV genotype 3 strains but also sporadically HEV genotype 1. The circulation of genotype 1 in industrialized areas may have further health implications since this genotype has been associated with important epidemics with high mortality rates, especially in pregnant women. Contamination of food and water through their contact with sewage not properly treated and biosolids presenting HEV may represent a significant risk for human

populations even in industrialized areas. Thus, suitable disposal and treatment of the sewage and sludge/biosolids generated is important whether the source of contamination is of human or animal origin.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (project AGL2005-07776-C03-02), the Xarxa de Referència de Biotecnologia de Catalunya and the Grup de Recerca Consolidat de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00592). We thank the Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona for their efficient sequencing services.

REFERENCES

- Abdelhady, S. I., Al-Din, M. S. & El-Din, M. E. 1998 A high hepatitis E virus seroprevalence among unpaid blood donors and haemodialysis patients in Egypt. *J. Egypt Public Health Assoc.* **73**, 165–179.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F. & Girones, R. 2006 Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7416–7422.
- Bader, T. F., Krawczynski, K., Polish, L. B. & Favorov, M. O. 1991 Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1659.
- Balayan, M. S. 1997 Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **4**, 155–165.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. & Girones, R. 2006 Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7894–7896.
- Boom, R., Sol, S. J., Salimans, M., Jansen, C. L., Werthein-van Dillen, P. M. & van der Noordaa, J. 1990 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495–503.
- Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A., de Roda Husman, A. M. & Koopmans, M. 2008 Non-travel related hepatitis E virus genotype 3 infections in The Netherlands; a case series 2004–2006. *BMC Infect. Dis.* **8**(8), 61.
- Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M. M., Widdowson, M. A., Worm, H. C., Koopmans, M. P., Frankena, K., de Roda Husman, A. M., De Jong, M. C. & Van Der Poel, W. H. 2007

- Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* **136**(4), 567–576.
- Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodriguez-Frias, F., Esteban, E. & Girones, R. 2004 Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* **41**, 126–131.
- Buti, M., Domínguez, A., Plans, P., Jardi, R., Schaper, M., Espunes, J., Cardenosa, N., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Plasencia, A. & Salleras, L. 2006 Community-based seroepidemiological survey of HEV infection in Catalonia, Spain. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**(12), 1328–1332.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R. & Girones, R. 2003 Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 448–455.
- Dalton, H. R., Stableforth, W., Thuraiajah, P., Hazeldine, S., Remnarace, R., Usama, W., Farrington, L., Hamad, N., Sieberhagen, C., Ellis, V., Mitchell, J., Hussaini, S. H., Banks, M., Ijaz, S. & Bendall, R. P. 2008 Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**(8), 784–790.
- Dawson, G. J., Mushahwar, I. K., Chau, K. H. & Gitnick, G. L. 1992 Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveler to Pakistan. *Lancet* **340**, 426–427.
- Emerson, S. U. & Purcell, R. H. 2003 Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* **13**, 145–154.
- Erker, J. C., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. 1999 Rapid detection of hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods* **81**, 109–113.
- Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Gomez-Munoz, M. T., Vega, S., Rodríguez-Iglesias, M. A. & Perez-Gracia, M. T. 2007 Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can. J. Vet. Res.* **71**, 236–240.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. & Meng, X. J. 2001 Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* **82**, 2449–2462.
- Hsieh, S. Y., Yang, P. Y., Ho, Y. P., Chu, C. M. & Liaw, Y. F. 1998 Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.* **55**, 300–304.
- Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N. & Girones, R. 2006 Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(12), 7886–7893.
- Li, R. C., Ge, S. X., Li, Y. P., Zheng, Y. J., Nong, Y., Guo, Q. S., Zhang, J., Ng, M. H. & Xia, N. S. 2006 Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg. Infect. Dis.* **12**(11), 1682–1688.
- Li, T. C., Miyamura, T. & Takeda, N. 2007 Short report: detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**(1), 170–172.
- Mansuy, J. M., Legrand-Abravanel, F., Calot, J. P., Peron, J. M., Alric, L., Agudo, S., Rech, H., Destruel, F. & Izopet, J. 2008 High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J. Med. Virol.* **80**, 289–293.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. & Mishiro, S. 2003 Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* **188**, 944.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halburg, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. 1997 A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 9860–9865.
- Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., Sugai, Y., Tokita, H., Akahane, Y., Itoh, K., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. 2002 Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **40**(9), 3209–3218.
- Page, R. M. 1996 TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 357–358.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Girones, R. 1998 Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4485–4488.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J. & Girones, R. 2000 VHE identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.* **33**, 826–833.
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. & Girones, R. 1994 Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2963–2970.
- Purcell, R. H. & Emerson, S. U. 2008 Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* **48**, 494–503.
- Rao, V. C. & Melnick, J. L. 1986 Environmental virology. In *Aspects of Microbiology 13* (eds J. A. Cole, C. J. Knowles & D. Schlessinger). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Renou, C., Moreau, X., Pariente, A., Cadranet, J. F., Penaranda, G., Hardwigen, J., Nicand, E., Izopet, J., Maringe, E., Morin, T., Arotcarena, R., Bourliere, M., Botreau, Y., Carencu, P., Causse, X., Conmbet, F., Gerolami, R., Igual, J.P., Halfon, P., Imbert, Y., Heluwaert, F., Louvel, D., Martin, T., Muller, P., Oules, V., Payen, J. L., Peron, J. M., Picon, M., Poncin, E., Rifflet, H., Rosa, I., Rossi, V., Pavio, N. & L'ANGH 2008 A national survey of acute hepatitis E in France. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**(11), 1086–1093.
- Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Erker, J. C., Kwo, P. Y., Knigge, M. F., Smalley, D. L., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. 1998 The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E

- virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J. Gen. Virol.* **79**, 447–456.
- Schlauder, G. S., Desai, S. M., Zanetti, A. R., Tassopoulos, N. C. & Mushahwar, I. K. 1999 **Novel hepatitis E virus (VHE) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of VHE.** *J. Med. Virol.* **57**, 243–251.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. 2008 **Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain.** *Vet. J.* **175**, 130–132.
- Straub, T. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. 1993 **Hazards from pathogenic microorganisms in land-disposed sewage sludge.** *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **132**, 55–91.
- Takahashi, K., Iwata, K., Watanabe, N., Hatahara, T., Ohta, Y., Baba, K. & Mishiro, S. 2001 **Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan.** *Virology* **287**, 9–12.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Yoshikawa, A., Sato, S., Isoda, N., Kenichi, I., Sugano, K. & Okamoto, H. 2002 **Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad.** *J. Gen. Virol.* **83**, 1931–1940.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. 2003 **Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings.** *Lancet* **362**, 371–373.
- Worm, H. C., Wurzer, H. & Frösner, G. 1998 **Sporadic hepatitis E in Austria.** *N. Engl. J. Med.* **339**, 1554–1555.
- Yarborough, P. O. 1999 **Hepatitis E virus: advances in HEV biology and HEV vaccine approaches.** *Intervirology* **42**, 179–184.
- Zanetti, A. R., Schlauder, G. G., Ramano, L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G. J. & Mushahwar, I. K. 1999 **Hepatitis E virus in patients with acute non-A-C hepatitis in Italy.** *J. Med. Virol.* **57**, 356–360.

First received 30 October 2008; accepted in revised form 9 January 2009. Available online July 2009

RESUMEN ESTUDIO 3:

Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants

Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Carratala A, Girones R

Virology Journal. 2010; 7:141.

INTRODUCCIÓN

Los poliomavirus humanos JC y BK son dos miembros de la familia *Poliomaviridae* que persistentemente infectan humanos y causan enfermedad en individuos inmunocomprometidos. Ambos virus están potencialmente implicados en ciertos tipos de cáncer y se postula que la vía de transmisión es la respiratoria y oral. Se ha descrito una elevada frecuencia de excreción de JCPyV y BKPyV y su presencia persistente en agua residual ha sido constatada en regiones geográficas diversas, indicando que pueden ser transmitidos a través de aguas y alimentos contaminados. En el periodo 2007 – 2008 tres nuevos poliomavirus han sido descritos en humanos; KI, WU y el poliomavirus de células de Merkel. KIPyV y WUPyV se han detectado principalmente en el tracto respiratorio de niños e individuos inmunocomprometidos, aunque también han sido detectados en heces de pacientes con gastroenteritis. En cuanto a MCPyV, también ha sido descrito en secreciones respiratorias y está estrechamente relacionado con MCC, apoyando un papel fundamental de MCPyV en el desarrollo de este tipo de cáncer. Además, estudios recientes han demostrado la presencia de estos tres nuevos virus en poblaciones sanas. Anticuerpos contra el poliomavirus limfotrópico (LPyV), un virus de simio, han sido detectado en muestras de sangre humanas, así como en muestras de sangre periférica de pacientes con leucoencefalopatías, individuos inmunocomprometidos y sujetos sanos.

En este estudio se ha valorado la presencia de KIPyV, WUPyV, MCPyV y LPyV en muestras de agua residual urbana para determinar su prevalencia ambiental, tal y como se ha descrito para JCPyV y BKPyV. Adicionalmente, muestras de agua de río utilizadas como fuente de agua potable y muestras de orina procedente de mujeres embarazadas sanas, han sido analizadas para la presencia de estos nuevos poliomavirus. La presencia de JCPyV y HAdV se evaluó por qPCR como controles de proceso y como índices de contaminación fecal humana.

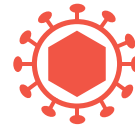
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras analizadas mostraron registros habituales de contaminación fecal de origen humano, evaluados mediante la cuantificación de JCPyV y HAdV. Los poliomavirus KI y WU fueron detectados en 1/8 y 2/8 muestras de agua residual, respectivamente, mientras que MCPyV fue detectado en 7/8 muestras y fue el único nuevo poliomavirus presente en el agua de río (2/7) y las muestras de orina (1/4). Aunque la detección realizada fue cualitativa, diluciones seriadas permitieron estimar una concentración de 10 – 100 PDU/mL. Las secuencias identificadas mostraron una elevada homología con secuencias descritas en otras regiones. Ninguna de las muestras de agua residual ($N = 13$), biosólidos ($N = 9$) analizados fue positivo para LPyV.

La elevada presencia de DNA de MCPyV respecto KIPyV o WUPyV refleja que MCPyV es una infección más prevalente en la población estudiada o que este virus se excreta en concentraciones más elevadas que el resto. La presencia de MCPyV en orina, agua residual urbana y agua de río confirman la hipótesis que este nuevo poliomavirus tiene un patrón de excreción similar a JCPyV y BKPyV. La presencia de KI, WU y MC poliomavirus en agua residual revela el potencial riesgo de que estos virus acaben contaminando agua y alimentos.

CONCLUSIONES

A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo donde se describe la presencia de un virus potencialmente relacionado con cáncer humano en agua residual y agua de río. Los datos obtenidos indican que MCPyV presenta una elevada prevalencia en la población estudiada y que puede diseminarse a través de la contaminación fecal/orina del agua. La metodología desarrollada puede representar una herramienta útil para el estudio de las cepas excretadas, prevalencia y transmisión de estos nuevos poliomavirus descritos.



SHORT REPORT

Open Access

Newly described human polyomaviruses Merkel Cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants

Sílvia Bofill-Mas*, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Anna Carratala and Rosina Girones

Abstract

Recently, three new polyomaviruses (KI, WU and Merkel cell polyomavirus) have been reported to infect humans. It has also been suggested that lymphotropic polyomavirus, a virus of simian origin, infects humans. KI and WU polyomaviruses have been detected mainly in specimens from the respiratory tract while Merkel cell polyomavirus has been described in a very high percentage of Merkel cell carcinomas. The distribution, excretion level and transmission routes of these viruses remain unknown.

Here we analyzed the presence and characteristics of newly described human polyomaviruses in urban sewage and river water in order to assess the excretion level and the potential role of water as a route of transmission of these viruses. Nested-PCR assays were designed for the sensitive detection of the viruses studied and the amplicons obtained were confirmed by sequencing analysis. The viruses were concentrated following a methodology previously developed for the detection of JC and BK human polyomaviruses in environmental samples. JC polyomavirus and human adenoviruses were used as markers of human contamination in the samples. Merkel cell polyomavirus was detected in 7/8 urban sewage samples collected and in 2/7 river water samples. Also one urine sample from a pregnant woman, out of 4 samples analyzed, was positive for this virus. KI and WU polyomaviruses were identified in 1/8 and 2/8 sewage samples respectively. The viral strains detected were highly homologous with other strains reported from several other geographical areas. Lymphotropic polyomavirus was not detected in any of the 13 sewage neither in 9 biosolid/sludge samples analyzed.

This is the first description of a virus isolated from sewage and river water with a strong association with cancer. Our data indicate that the Merkel cell polyomavirus is prevalent in the population and that it may be disseminated through the fecal/urine contamination of water. The procedure developed may constitute a useful tool for studying the excreted strains, prevalence and transmission of these recently described polyomaviruses.

Findings

Human polyomaviruses JC and BK (JCPyV and BKPyV) are two members of the *Polyomaviridae* family that persistently infect humans and cause disease in immunocompromised individuals. These viruses have been potentially implicated in certain cancers [1,2]. Both respiratory and oral routes have been postulated for their transmission [3-5]. A high frequency of excretion of JCPyV and BKPyV has been reported, and both viruses

have been detected in urban sewage from various geographical areas [6,7]. This observation indicates that they could be transmitted by water or food.

In 2007 and 2008, three new polyomaviruses, KI WU and Merkel cell polyomavirus (KIPyV, WUPyV and MCPyV), were reported in humans [8-10]. KIPyV and WUPyV have been detected mainly in respiratory tract specimens from children and also immunocompromised individuals. In 4 continents these viruses showed equivalent prevalence and highly conserved nucleotide sequences. KIPyV and WUPyV have also been co-detected with other viruses in patients with respiratory

* Correspondence: sbofill@ub.edu

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



and, in some cases, gastrointestinal disorders. Both viruses have been detected in feces [11,12] and their role in the etiology of respiratory infections has recently been questioned [13].

MCPyV, which has also been described in respiratory secretions [14-16], is strongly associated with Merkel cell carcinomas (MCC) [17]. This association strongly supports an etiological role for MCPyV in the development of MCC [18]. Recent serological data show that KIPyV, WUPyV and MCPyV are prevalent in the healthy population [19].

Antibodies against lymphotropic polyomavirus (LPyV), a virus of simian origin, have been found in human blood samples [19,20]. Moreover, LPyV has been reported in human peripheral blood from patients with leukoencephalopathies as well as in immunocompromised and healthy subjects [21,22].

Here we assessed KIPyV, WUPyV, MCPyV and LPyV in urban wastewater to determine whether these viruses are prevalent in the environment, as reported for JCPyV and BKPyV [7]. For this purpose, we performed nested-PCR (nPCR) assays and compared our results with the nucleotide sequences available in data banks. Wastewater samples collected over the last 6 years from a treatment plant processing domestic and industrial wastewater from a population of 175,000 inhabitants were tested for the presence of KIPyV, WUPyV and MCPyV (8 sewage samples) and also for LPyV (13 sewage and 9 biosolid and sludge samples). In addition, 7 samples collected in 2009 from river water used to source a drinking water treatment plant were also analyzed for the presence of KIPyV, WUPyV and MCPyV. The presence of JCPyV and human adenoviruses (HADVs) was evaluated by quantitative PCR (qPCR) as a control of the procedures applied and as an index of the level of fecal pollution of human origin present in the samples [6].

Urine samples collected from 4 healthy pregnant women were also tested for WUPyV, KIPyV and MCPyV.

Viral particles were concentrated using methods developed in a previous study using JCPyV as a model. Methods were based on: ultracentrifugation and elution of samples with glycine buffer pH 9.5 for sewage [7] and sludge or biosolids [6], glass wool columns filtration and glycine buffer elution for river water [23] and on ultracentrifugation for urine [3]. Negative controls were established for each batch of samples. Nucleic acids were extracted with the QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, Inc.). Oligonucleotide primers (Table 1) were designed based on existing polyomaviral sequences and their specificity against other known polyomaviruses (JCPyV, BKPyV, SV40, LPyV) was checked by nPCR. Samples were analyzed by nPCR in final 50- μ L reaction volumes. Briefly, 10 μ L of the extracted nucleic acids (corresponding to 2 mL of sewage, 2.5 mL of sludge, 1 g of biosolids, 13.5 mL of river

water, and 2 mL of urine) and a 10-fold dilution (to prevent enzymatic inhibition) of each nucleic acid extraction were analyzed in a 40- μ L reaction mixture containing 1xPCR Buffer, MgCl₂ at 1.5 mM, 0.025 mM of each dNTP, 0.5 μ M of primers and 2 units of TaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems). After a first-round PCR, 1 μ L of the product was added to 49 μ L of the nPCR mixture containing the same components as the first-round PCR mixture. The conditions for the first-round and nPCR reaction conditions were as follows: 95°C for 10 min, 30 cycles of 94°C for 60 sec, 60 sec at the corresponding annealing temperature (Table 1) and extension at 72°C for 60 sec. Amplification was completed with a 7-min extension step at 72°C. Amplicons of the expected size were purified (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Inc) and sequenced (BigDye sequencing kit and ABI Prism 377 genetic analyzer; Applied Biosystems).

Nucleotide sequences were analyzed using the basic BLAST program <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Separate areas were used for the diverse steps of the procedures developed; non-template controls were included in each nPCR reaction. HAdV and JCPyV were tested as a control of the procedures applied as well as of the presence of enzymatic inhibitors in the samples.

We processed the samples as 3 separate batches at 3 separate periods of time. The samples showed typical levels of human fecal pollution, as shown by JCPyV and HAdV concentrations (Table 2). KIPyV and WUPyV were present in 1/8 and 2/8 sewage samples respectively while MCPyV was present in 7/8 sewage samples and was the unique newly described human polyomavirus found in the river water (Table 2). MCPyV was also detected in 1/4 urine samples. The VP1 and VP1/VP2/VP3 genes of the MCPyV genome were also amplified and sequenced in 3 sewage samples to confirm the presence of MCPyV genome (Table 2).

Although the detection technique used here was not quantitative, limiting-dilution nPCR experiments showed approximately 10-100 PCR units/mL of sewage for KIPyV, WUPyV and MCPyV. Samples showed positive results only after nPCR but not after the first-round PCR.

DNA cross contamination was ruled out since no viral strains or plasmids with the genomes of the viruses were available, only for LPyV was a plasmid available in the laboratory as positive control; however, all samples were found to be negative for this virus.

We found that the viruses showed a high degree of sequence stability. All but one sequenced MCPyV amplicon were identical and also identical to the reference sequence with GenBank accession number: [EU375803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/acc.cgi?acc=EU375803), despite their distinct origins (sewage, river water or urine). This observation confirms the high level of conservation of the DNA of these viruses. Only one MCPyV VP1 amplicon showed a nucleotide that differed from the

Table 1: Oligonucleotide primers used for nPCR amplification of WUPyV, KIPyV, MCPyV and simian polyomavirus LPyV

Primer	Virus region	Position	Amplification reaction	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Sequence (5'-3')
WU1	WUPyV (VP1) ^a	1730-1750	First	505	55	CCCACAAGAGTGCAAAGCCTTC
WU2		2234-2213				AGGCACAGTACCATTGGTTTAA
WU3		2044-2063	Nested	164	50	AGTTTTGGTGCTTCTCTKTS
WU4		2207-2188				TACAGTATACTGAGCAGGC
KI1	KIPyV (VP1) ^b	1684-1704	First	378	59	GCTGCTCAGGATGGGCGTGA
KI2		2061-2043				CAGKGTCTAGGGTCTCCTGGT
KI3		1899-1918	Nested	190	54	GTTGCTTGTGTACCTCTAG
KI4		2088-2067				AATTGTATAGGTAGTTGGGCCT
MC1	MCPyV (TAg) ^c	1716-1736	First	477	55	GCCTGTGAATTAGGATGTATTT
MC2		2210-2198				CATTTCTGCTCTGGTCATTTCCA
MC3		2010-2033	Nested	183	50	GCCCATTATCTAGACTTTGCAAA
MC4		2192-2173				TCTAACCTCCTTTGGCTA
MC1b	MCPyV (VP1) ^c	3174-3194	First	440	58	GGCTTCTTTTTGAGAGGCCT
MC2b		3613-3592				AGTGGGCCCTCTATGCAAAGGA
MC3b		3276-3297	Nested	240	54	TTGGGTAACAGTTTTCTCTG
MC4b		3515-3493				TGCTAGATATTTAATGTTACT
MC1c	MCPyV (VP1/2/3) ^c	4228-4252	First	265	53	GAATTAACCCATTCTTGATTCA
MC2c		4492-4472				TTGGCTTCTCTCTGGTACT
MC3c		4264-4286	Nested	198	53	ATTTGGGTAATGCTATCTTCTCC
MC4c		4461-4439				GGATATATTTCTCTGAATTACA
LN1	LPyV (VP2/VP3) ^d	1542-1564	First	423	54	GGCACACCAAAGAGTAACTCAAG
LN2		1965-1943				CAGGTCATGTCTTCATTAGGAG
LN3		1617-1639	Nested	232	54	GGAAGTGGAGCTTAATAAATTGG
LN4		1863-1849				ATATCCATACAAGTCTCAGAAG

VP1, VP2 and VP3 = Virion protein 1, 2 and 3; TAg = T antigen; K= G +T; S = G + C

^a The sequence positions are referred to strain EF444549

^b The sequence positions are referred to strain EF127906

^c The sequence positions are referred to strain EU375803

^d The sequence positions are referred to strain K02562

others and from strain EU375803 although it does not produce any change in the derived protein sequence.

The WUPyV amplicon sequenced was identical to reference strain EF444549 while the KIPyV amplicon sequenced showed one nucleotide of difference with reference strain EF127906.

The nucleotide sequences obtained were deposited in GenBank [GenBank: [GQ376529](#) (WUPyV), [GQ376528](#) (KIPyV), [GQ376530](#) (MCPyV TAg region), [GQ452776](#) (MCPyV VP1/VP2-VP3 region) and [GQ390249/50](#) (MCPyV VP1 region)].

None of the 22 sewage, sludge and biosolid samples tested positive for LPyV although typical concentrations of JCPyV and HAdV indicated human fecal contamination (data not shown). The nPCR assay showed a sensitivity of 1-10 genomic copies/reaction when the complete LPyV genome [24] cloned in pBR322 and quantified spectrophotometrically was analyzed by limiting-dilution nPCR. Thus, LPyV was not detected in the tested samples by these methods.

The observation that MCPyV DNA was much more frequently detected than that of KIPyV or WUPyV might

Table 2: Presence of human polyomaviruses and human adenoviruses in sewage and river water samples

Samples, type	Collection date (month/year)	Quantitative PCR (GC/mL of sample)		Nested-PCR results (presence/absence)		
		HAdV	JCPyV	WUPyV	KIPyV	MCPyV (Tag)
BCN1, sewage	02/2004	2.81×10^3	1.35×10^3	+	-	+ ^a
BCN2, sewage	07/2007	4.29×10^3	7.94×10^2	-	-	+ ^a
BCN3, sewage	07/2007	1.57×10^3	NT	-	-	+ ^a
BCN4, sewage	07/2007	6.10×10^3	8.65×10^2	-	-	+ ^{a, b}
BCN5, sewage	05/2008	Non tested	5.48×10^2	+ ^a	+ ^a	+ ^b
BCN6, sewage	09/2006	9.40×10^1	7.65×10^2	-	-	+
BCN7, sewage	11/2006	1.35×10^2	4.83×10^2	-	-	+ ^b
BCN8, sewage	12/2006	6.00×10^2	8.33×10^1	-	-	-
BCN9, river water	03/2009	3.08×10^0	1.00×10^0	-	-	-
BCN10, river water	03/2009	7.90×10^0	9.40×10^0	-	-	+ ^a
BCN11, river water	03/2009	1.10×10^1	1.21×10^1	-	-	+ ^a
BCN12, river water	03/2009	1.18×10^1	1.49×10^1	-	-	-
BCN13, river water	03/2009	1.99×10^0	4.40×10^0	-	-	-
BCN14, river water	03/2009	2.48×10^0	1.21×10^1	-	-	-
BCN15, river water	03/2009	3.46×10^0	9.94×10^0	-	-	-

NT = Not tested

^a Sequenced amplicons

^b Samples from other regions (VP1 and/or VP1/VP2/VP3) in which MCPyV has been amplified and sequenced (GQ452776, GQ390249-50)

reflect that MCPyV is a more prevalent infection or that it is a highly excreted virus.

Our results on MCPyV in urine, urban sewage and river water strongly support the notion that this virus shows an excretion pattern that resembles that of JCPyV and BKPyV. Human excretion of new polyomaviruses, especially MCPyV, may lead to fecal (urine) contamination of water and food.

In this study we did not attempt the *in vitro* culture of the new polyomaviruses because no cell culture systems for these viruses are available at present. Furthermore, for other human polyomaviruses, such as JCPyV, the regulatory regions of strains excreted in urine present an archetypal structure and are inefficiently cultured.

To our knowledge, this is the first report of the presence of a virus strongly related to human cancer in sewage and river water samples. We propose that the methodology reported here is suitable to study the preva-

lence, excretion pattern and genetic variability of recently discovered human polyomaviruses in environmental matrices.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SBM coordinated the study, concentrated urine samples and nucleic acid extractions of the urine samples, collaborated in PCR assays, typed the amplicons detected and drafted the manuscript. JRM concentrated the sewage and biosolid samples and performed the nucleic acid extractions; he also collaborated in the PCR analysis and in the sequencing of the resulting amplicons. BC concentrated river water samples and performed nucleic acid extraction of the same samples. AC collaborated in the production of standards for the quantification of HAdV and JCPyV and in the nucleotide sequence comparisons. RG participated in the development of the methodology, conception and coordination of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

SBM is an assistant professor at the Department of Microbiology of the Faculty of Biology, University of Barcelona. Her main research interests are the epidemi-

ology of human and animal polyomaviruses. She addresses their transmission through the environment and their potential as indicators of the presence of human or/and animal fecal contamination.

Acknowledgements

This work was supported by the "Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN" of the Spanish Government (project AGL2008-05275-C03-01/ALI) and by the "Xarxa de Referència de Biotecnologia de Catalunya". We thank Dr. A. Lewis (Food and Drug Administration, Maryland, USA) for kindly providing the LPyV plasmid. Jesus Rodriguez-Manzano and Anna Carratala are fellows of the MICINN. We thank the "Serveis Científics Tècnics" of the University of Barcelona for sequencing of PCR products.

Author Details

Department of Microbiology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received: 30 November 2009 Accepted: 28 June 2010

Published: 28 June 2010

References

1. Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M: **BKvirus, JC virus and Simian Virus 40 infection in humans, and association with human tumors.** *Adv Exp Med Biol* 2006, **577**:319-341.
2. Lee W, Langhoff E: **Polyomavirus in human cancer development.** *Adv Exp Med Biol* 2006, **577**:310-318.
3. Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Major EO, Curfman B, Girones R: **Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission.** *J Neurovirol* 2003, **9**:498-507.
4. Monaco MCG, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO: **Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection.** *J Virol* 1998, **72**:9918-9923.
5. Riccardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE, Boland CR: **JC virus DNA sequences are frequently present in human upper and lower gastrointestinal tract.** *Gastroenterol* 2000, **119**:1228-1235.
6. Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R: **Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:7894-7896.
7. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R: **Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:238-245.
8. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B: **Identification of a third human polyomavirus.** *J Virol* 2007, **81**:4130-4136.
9. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS: **Clonal integration of a polyomavirus in human merkel cell carcinoma.** *Science* 2008, **319**:1096-1100.
10. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D: **Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections.** *PLoS Pathogens* 2007, **3**:595-604.
11. Mourez T, Bergeron A, Ribaud P, Scieux C, de Latour RP, Tazi A, Socié G, Simon F, LeGoff J: **Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease.** *Emerg Infect Dis* 2009, **5**:107-109.
12. Neske F, Blessing K, Pröttel A, Ullrich F, Kreth HW, Weissbrich B: **Detection of WU polyomavirus DNA by real-time PCR in nasopharyngeal aspirates, serum, and stool samples.** *J Clin Virol* 2009, **44**:115-118.
13. Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P: **No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease.** *J Clin Virol* 2007, **40**:307-311.
14. Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL: **KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: A new era for human polyomavirus research.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**(4):270-75.
15. Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T: **Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:489-491.
16. Kantola K, Sadeghi M, Lahtinen A, Koskenvuo M, Aaltonen LM, Möttönen M, Rahiala J, Saarinen-Pihkala U, Riikonen P, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K: **Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency.** *J Clin Virol* 2009, **45**(4):292-295.
17. Becker JC, Schrama D, Houben R: **Visions and reflections (minireview).** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:1-8.
18. Hodgson NC: **Merkel cell carcinoma: changing incidence.** *J Surg Oncol* 2005, **89**:1-4.
19. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL: **Seroepidemiology of human polyomaviruses.** *PLoS Pathogens* 2009, **5**:1-10.
20. Viscidi RP, Clayman B: **Serological cross reactivity between polyomavirus capsids.** *Adv Exp Med Biol* 2006, **577**:73-84.
21. Delbue S, Tremolada S, Branchetti E, Elia F, Gualdo E, Marchioni E, Maserati R, Ferrante P: **First identification and molecular characterization of lymphotropic polyomavirus in peripheral blood from patients with leukoencephalopathies.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:2461-2462.
22. Delbue S, Tremolada S, Elia F, Carloni C, Amico S, Tavazzi E, Marchioni E, Novati S, Maserati R, Ferrante P: **Lymphotropic polyomavirus is detected in peripheral blood from immunocompromised and healthy subjects.** *J Clin Virol* 2010, **47**(2):156-160.
23. Calgua BA, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares C, Hundesa A, Wyn-Jones P, López-Pila JM, Girones R: **Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples.** *J Virol Methods* 2008, **153**:79-83.
24. Pawlita M, Clad A, zur Hausen H: **Complete DNA sequence of lymphotropic papovavirus: prototype of a new species of the polyomavirus genus.** *Virology* 1985, **143**(1):196-211.

doi: 10.1186/1743-422X-7-141

Cite this article as: Bofill-Mas *et al.*, Newly described human polyomaviruses Merkel Cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants *Virology Journal* 2010, **7**:141

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Capítulo II

**Estudio de la eficiencia de
eliminación de patógenos virales en
plantas depuradoras de agua residual
y control microbiológico del
agua regenerada**

RESUMEN ESTUDIO 4:**Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water**

Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R

Water Science and Technology. 2012; In press.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de patógenos entéricos descritos en muestras ambientales proceden de una contaminación originada en el agua residual o directamente a través de excreciones humanas y animales. Actualmente, regiones geográficas diversas se enfrentan a retos constantes para obtener suficiente agua de calidad destinada al consumo humano, especialmente en áreas donde la disponibilidad de este recurso es limitada. La regeneración del agua residual es un recurso cada vez más utilizado e inevitablemente un bien que debemos considerar. Grupos de microorganismos tales como los coliformes fecales, *E. coli* y los enterococos son los indicadores de contaminación fecal más extendidos y más utilizados. No obstante, la utilidad de dichos indicadores para predecir la presencia y concentración de patógenos víricos y protozoos ha sido ampliamente cuestionada. Comparando con virus y protozoos, los indicadores bacterianos son más sensibles a tratamientos de inactivación, a la exposición a la luz solar, son menos resistentes en el medio ambiente, carecen de un origen exclusivamente fecal, son capaces de multiplicarse en el medio ambiente y no permiten discriminar el origen de la contaminación fecal. Los adenovirus han emergido como una prometedora herramienta a la hora de mejorar los estándares de calidad del agua, debido principalmente a la especificidad que presentan frente al huésped, estabilidad en el ambiente y su elevada prevalencia en regiones geográficas diversas.

Para el desarrollo de este trabajo se ha realizado una colaboración entre nuestro grupo y otros dos grupos de investigación con experiencia constatada en diferentes áreas de estudio dentro de la microbiología. El objetivo principal consistió en analizar la diseminación y eficiencia de eliminación de patógenos e indicadores de contaminación fecal en dos plantas de tratamiento de agua residual donde se aplican tratamientos terciarios, evaluando así la

presencia de un riesgo microbiológico asociado al agua regenerada y proponiendo indicadores de contaminación alternativos para un control microbiológico más adecuado. El agua regenerada producida en ambas estaciones depuradoras es utilizada como agua de riego y para mantener el caudal ecológico de un río próximo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos moleculares basados en la PCR, qPCR, técnicas de hibridación in situ y métodos de cultivo clásicos han sido utilizados para el análisis de coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp., *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter* spp., HAdV, JCPyV, HAV, HEV, NoV GGI, NoV GGII, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Muestras de agua residual urbana fueron recolectadas en dos estaciones depuradoras localizadas en el este de España (Valencia), se tomaron muestras de agua residual cruda, después de aplicar el tratamiento primario-secundario y tras la aplicación del tratamiento terciario (filtros de arena y UV). Los análisis mostraron que todos los patógenos e indicadores de contaminación fecal analizados fueron detectados en cada uno de los diferentes puntos de muestreo de ambas plantas depuradoras, exceptuando a HEV, *Vibrio vulnificus* y JCPyV, que no fueron detectados en las muestras de agua regenerada. Adicionalmente, HAdV y *Arcobacter* fueron evaluados mediante ensayos de infectividad, mostrando resultados positivos incluso en muestras de agua regenerada del terciario que cumplían con la actual legislación española y constatando la presencia de patógenos totalmente viables que son vertidos en el medio ambiente.

Tratando de evaluar la efectividad de las estaciones depuradoras a la hora de eliminar los patógenos presentes y debido a la elevada presencia de patógenos detectados, se estudiaron las eficiencias de eliminación de HAdV, *Cryptosporidium* spp y *Giardia* spp. Los resultados mostraron que HAdV cuantificados por qPCR fueron detectados en el 100% de las muestras analizadas, mostrando una reducción media en ambas depuradoras de 1,2 – 1,9 log₁₀, mientras que *Cryptosporidium* y *Giardia* cuantificados por IFA presentaron reducciones entre 1,8 – 3,0 log₁₀. Aproximadamente, un 60-90% de la disminución observada se correspondía con la aplicación de los tratamientos primarios y secundarios, mientras que la reducción restante se justificaba por la aplicación de UV y filtros de arena. La combinación de los dos tratamientos terciarios resultó ser menos eficiente que la aplicación convencional del primario y secundario. Mediante regresión logística se estudió la capacidad de predicción que HAdV ofrecía para la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia*, aunque no se observaron buenas

correlaciones. De todos modos, a pesar de no poder predecir la presencia de ambos parásitos debido a que HAdV estuvo presente en todas las muestras analizadas, incluso en ausencia de otros patógenos, su elevada prevalencia y concentración sugieren un papel como indicador protector de la contaminación fecal.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia y concentración de patógenos humanos, incluyendo virus, en muestras de agua residual cruda es elevada y que por lo tanto representan un reto constante para los sistemas de saneamiento. HAdV cuantificados mediante qPCR representa una herramienta útil como patógeno/indicador en agua y debe ser utilizado como indicador de la eficiencia de eliminación de patógenos en las EDAR. Los tratamientos de depuración estudiados reducen la presencia de los patógenos analizados en $1,2 - 3 \log_{10}$, aunque el agua regenerada producida continúa presentando patógenos viables y sigue representando una fuente de diseminación en el ambiente de virus y bacterias infecciosas. La aplicación de sistemas de desinfección por UV y eliminación de microorganismos por filtros de arena representa un buen sistema para mantener la calidad microbiológica del agua, reduciendo la necesidad de cloración. No obstante, los tratamientos implementados en estas EDAR deben ser perfeccionados y la amplia variedad de patógenos detectados deberán ser evaluados utilizando modelos de análisis de riesgo. Información que resultará esencial para el desarrollo de nuevas pautas para la reutilización de agua regenerada.

Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water

J. Rodriguez-Manzano, J. L. Alonso, M. A. Ferrús, Y. Moreno, I. Amorós, B. Calgua, A. Hundesa, L. Guerrero-Latorre, A. Carratala, M. Rusiñol and R. Girones

ABSTRACT

This study involved collaboration between three centres with expertise in viruses, bacteria and protozoa. The focus of the research was the study of the dissemination and removal of pathogens and faecal indicators in two sewage treatment plants (STPs) using tertiary treatments. Samples were collected over a period of 5 months through a sewage treatment processes. Analysis of the samples revealed that the plants were not efficient at removing the faecal indicators and pathogens tested during the study. From entry point (raw sewage) to effluent level (tertiary treatment effluent water), the experimental results showed that the reduction ratios of human adenoviruses were 1.2 log₁₀ in STP1 and 1.9 log₁₀ in STP2. Whereas for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. the reduction ratios were 2.3 log₁₀ for both pathogens in STP1, and 3.0 and 1.7 log₁₀ in STP2, respectively. Furthermore, the presence of faecal indicators and pathogens at different sampling points was evaluated revealing that the tested pathogens were present in reclaimed water. Human adenovirus and *Arcobacter* spp. showed positive results in infectivity assays for most of the tertiary effluent water samples that comply with current legislation in Spain (Real Decreto 1620/2007). The pathogens detected must be evaluated using a risk assessment model, which will be essential for the development of improved guidelines for the re-use of reclaimed water.

Key words | efficiency removal, enteric pathogens, faecal indicators, sewage, tertiary treatment, treatment plant

INTRODUCTION

Numerous studies have documented the presence of enteric pathogens in raw and treated sewage and, by using new molecular methods, new pathogens and potential indicators have also been described (Girones *et al.* 2010). Most pathogens found in environmental waters (rivers, lakes, seawater and groundwater) originate from contamination with sewage or directly with human or animal excreta. Although most pathogens can be removed by sewage treatment, many are discharged into the effluent and enter receiving waters, allowing their transmission through contaminated water. Many regions face water supply challenges due to water scarcity resulting in an increased need for water re-use and for ways to solve water resource issues or create new sources of good quality water supplies.

Classic microbiological indicators such as faecal coliforms, *Escherichia coli* and enterococci are the most commonly analysed indicators used to evaluate the level of faecal contamination. However, whether these bacteria are suitable indicators of the occurrence and concentration of human viruses and protozoa cysts has been questioned (Lipp *et al.* 2001; Tree *et al.* 2003; Wéry *et al.* 2008). Compared to viral or protozoan pathogens, indicator bacteria are more sensitive to inactivation through treatment processes and exposure to sunlight (Hurst *et al.* 2002; Sinclair *et al.* 2009). Other limitations have been associated with their application: short survival compared to pathogens (McFeters *et al.* 1974), non-exclusive faecal source (Scott *et al.* 2002; Simpson *et al.* 2002), ability to multiply in some environments

J. Rodriguez-Manzano (corresponding author)
B. Calgua
A. Hundesa
L. Guerrero-Latorre
A. Carratala
M. Rusiñol
R. Girones
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona. Av. Diagonal 643,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: jesus_rodriguez@ub.edu

J. L. Alonso
I. Amorós
Research Institute of Water and Environmental
Engineering,
Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera 14, 46022 Valencia,
Spain

M. A. Ferrús
Y. Moreno
Department of Biotechnology,
Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera 14, 46022 Valencia,
Spain

(Solo-Gabriele *et al.* 2000; Pote *et al.* 2009), inability to identify the source of faecal contamination (Field *et al.* 2003) and low correlation with the presence of pathogens (Pina *et al.* 1998; Hörman *et al.* 2004; Savichtcheva & Okabe 2006). Enteric viruses have emerged as a promising tool in efforts to increase water quality standards, due to their high host-specificity, stability in different environments, and prevalence in diverse geographical areas. Additionally, the range of methods available for the analysis of pathogens and indicators in water, including the application of molecular techniques, has increased while the associated costs have decreased.

Three centres with relevant expertise collaborated on this project to assess the dissemination and removal of pathogens and faecal indicators in sewage treatment plants (STPs) using molecular techniques and infectivity assays. The objective of the study was to evaluate efficiencies of pathogen removal and potential risks related to the presence of pathogens in reclaimed water, and to define suitable indicators for the microbiological control of reclaimed water. The two STPs studied, located in Eastern Spain, use tertiary treatments with UV irradiation. The effluent water from the two plants is regenerated for use in agricultural irrigation and the ecological maintenance of a river flow.

METHODS

Samples sites

Two full-scale STPs with the capacities of 60,000 (STP1) and 45,000 (STP2) m³/day were studied. The treatments applied in these two STPs and the numbers of samples analysed in the study are summarized in Table 1.

Samples from both STPs were collected every 2–4 weeks over a period of five months, from October 2009 to February

2010. A total of 21 sewage samples were collected from STP1, at the entry point (raw sewage), at the exit point following secondary treatment and at the exit point following tertiary treatment (after UV disinfection). A total of 23 sewage samples were collected from STP2, including one sampling point after sand filtration (just after secondary treatment). Both STPs received sewage from a population of around 250,000 inhabitants and included UV disinfection as a tertiary treatment with a dose average of 100 mWs/cm². The scheme of the water treatment line and the points of water sample intake are shown on Figure 1.

Analytical methods

Sensitive molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR (qPCR) and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), *in situ* hybridization techniques, and classical culture methods such as colony-forming units (CFU) and immunofluorescence assays (IFA) were used in the analysis of bacteria, viruses and protozoa (Moreno *et al.* 2003a, b; Bofill-Mas *et al.* 2006; Albinana-Gimenez *et al.* 2009; Amorós *et al.* 2010; Cañigral *et al.* 2010; González *et al.* 2010; Rodríguez-Manzano *et al.* 2010; Calgua *et al.* 2011). The microorganisms analysed were faecal coliforms and the following groups of viruses: human adenoviruses (HAdV) and JC polyomaviruses (JCPyV) (both proposed as indicators of human faecal/urine contamination), hepatitis A virus, hepatitis E virus and norovirus GI and GII (NoV GI and GII). The bacterial pathogens analysed were: *Salmonella* spp., *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter* spp. The protozoan pathogens analysed were *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.

Bacteriological and protozoan analyses were performed on the same day as sample collection at the Department of

Table 1 | Treatment processes of STPs and sample sites

Sewage treatment plant	Treatment process	Sample	n	
STP1	Screening and grit removal	Untreated sewage (E)	7	
	Primary sedimentation			
	Anaerobic digestion			
	Secondary sedimentation			
STP2	UV disinfection	Secondary clarifier effluent (S)	7	
	Screening and grit removal	Reclaimed water after disinfection (T)	7	
		Primary sedimentation	Untreated sewage (E)	6
		Anaerobic digestion	Secondary clarifier effluent (S)	6
	Secondary sedimentation	Sand filter effluent (F)	6	
Sand filtration	Reclaimed water after disinfection (T)	5		
	UV disinfection			

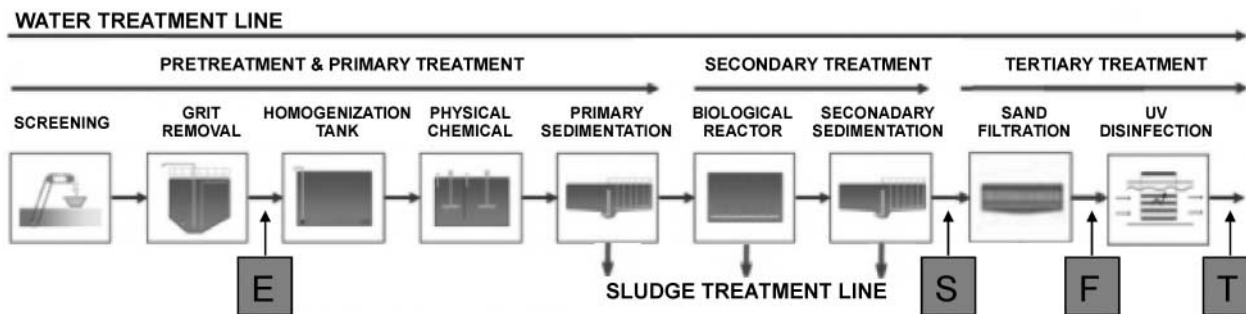


Figure 1 | Simplified scheme of sewage treatment plants.

Biotechnology and the Research Institute of Water and Environmental Engineering (Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain), whereas virological analyses were performed at the Department of Microbiology (University of Barcelona, Barcelona, Spain) the day after sample collection (located 350 km north of the STPs). All samples were collected in sterile containers and kept at 4 °C until analysis.

Recovery of viral particles from sewage was performed following a previously described procedure (Pina *et al.* 1998) presenting an estimated recovery efficiency ranging from 30 to 90% for HAdV, JCPyV, NoV GGII and poliovirus (Pina *et al.* 1998; Bofill-Mas *et al.* 2006; Calgua *et al.* in press). Detection levels when using qPCR or nested-PCR techniques have been quantified as 10 genome copies (GC) per reaction. Considering viral concentration and PCR analysis, the estimated detection limit for viruses is about 60 GC/100 mL of sewage. The presence of faecal coliforms and *Salmonella* spp. was studied using membrane filtration procedures according to UNE-EN ISO 9308-1:2001 and ISO 19250:2010, respectively, presenting detection limits of 1 CFU/100 mL. The detection limit for bacterial qPCR assays (Moreno *et al.* 2003a, b; Amorós *et al.* 2010; Cañigral *et al.* 2010; González *et al.* 2010) ranged from 1 to 100 CFU/mL, whereas the detection limit for *Giardia* and *Cryptosporidium* has been estimated as 1 (oo)cyst per litre, by using Environmental Protection Agency Method 1623.

RESULTS AND DISCUSSION

Pathogens and faecal indicators analysed

The presence of pathogens and faecal indicators at each sampling point was evaluated in both STPs and the results are summarized in Table 2.

All tested pathogens and faecal indicators were detected in the samples taken from the different levels of treatment, with the exception of HEV, *V. vulnificus* and JCPyV, which were not detected in tertiary reclaimed water samples. JCPyV quantified by qPCR in raw sewage (100% positive samples) had an average concentration of 5.44×10^4 GC/100 mL in STP1 and 9.11×10^4 GC/100 mL in STP2. Norovirus GII was quantified by RT-qPCR at the effluent level (4 out of 7 effluent water samples were positive in STP1 and 4 out of 5 were positive in STP2), showing mean values of 3.75×10^2 GC/100 mL and 3.34×10^2 GC/100 mL, respectively. Furthermore, HAdV and *Arcobacter* spp. were tested by infectivity assays showing positive results at different collection points, including tertiary reclaimed water.

Removal efficiencies of human adenoviruses and protozoan pathogens

Removal of HAdV, *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. were studied by calculating the \log_{10} reduction through the treatment processes, the results are summarized in Tables 3 and 4. Primary treatment is mainly used for grit removal and the expected removal of this step is lower than the other processes evaluated (Fu *et al.* 2010), whereas the secondary treatment process plays an important role in reducing pathogens and chemical pollutants since the microorganisms are mostly separated from the water through sedimentation, either by themselves or attached to activated sludge. For these reasons, the removal efficiencies of primary and secondary treatments were analysed together.

The results show that the first two stages (primary and secondary treatments) are the most important steps in the removal of microorganisms, showing values of 1.03 \log_{10} , 1.99 \log_{10} and 1.37 \log_{10} in STP1 and 1.51 \log_{10} , 2.56 \log_{10} and 1.28 \log_{10} in STP2 for HAdV, *Giardia* and *Cryptosporidium*, respectively. About 60–89% of total reduction

Table 2 | Microorganisms analysed in sewage treatment plants STP1 and STP2

		STP1			STP2			
		E	S	T	E	S	F	T
Human adenovirus	qPCR	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)
	IFA	1/1 (100)	NT	5/7 (71.4)	1/1 (100)	NT	1/2 (50.0)	5/5 (100)
JC polyomavirus	qPCR	6/6 (100)	NT	0/7 (0.0)	5/5 (100)	NT	NT	0/5 (0.0)
Hepatitis A virus	RT-nPCR	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)	0/6 (0.0)	0/6 (0.0)	0/6 (0.0)	1/5 (20.0)
Hepatitis E virus	RT-nPCR	3/7 (42.9)	1/7 (14.3)	0/7 (0.0)	5/6 (83.3)	3/6 (50.0)	1/6 (16.7)	0/5 (0.0)
Norovirus GI	RT-nPCR	3/6 (50.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	4/5 (80.0)	0/2 (0.0)	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)
Norovirus GII	RT-qPCR	4/6 (66.7)	1/3 (33.3)	4/7 (57.1)	5/5 (100)	1/2 (50.0)	2/3 (66.7)	4/5 (80.0)
<i>Salmonella</i> spp.	SCM	6/7 (85.7)	5/7 (71.4)	1/7 (14.3)	4/6 (66.7)	2/6 (33.3)	3/6 (50.0)	1/5 (20.0)
Faecal coliforms	SCM	NT	NT	7/7 (100)	NT	NT	4/6 (66.7)	3/5 (60.0)
<i>Vibrio vulnificus</i>	qPCR	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	0/7 (0.0)	1/6 (16.7)	0/6 (0.0)	0/6 (0.0)	0/5 (0.0)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	qPCR	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)	0/6 (0.0)	2/6 (33.3)	0/6 (0.0)	1/5 (20.0)
<i>Listeria monocytogenes</i>	qPCR	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)	1/7 (14.3)	4/6 (66.7)	1/6 (16.7)	0/6 (0.0)	1/5 (20.0)
<i>Arcobacter</i> spp.	qPCR	7/7 (100)	7/7 (100)	7/7 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)
<i>Giardia</i> spp.	IFA	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71.4)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	IFA	7/7 (100)	5/7 (71.4)	4/7 (57.1)	6/6 (100)	6/6 (100)	5/6 (83.3)	4/5 (80.0)

STP1 and 2: sewage treatment plant 1 and 2; E: entry (raw sewage); S: secondary treatment effluent; F: after sand filtration treatment; T: tertiary treatment effluent (after UV disinfection); qPCR: quantitative PCR; RT-nPCR: reverse transcription nested PCR; RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR; SCM: standard culture methods; IFA: immunofluorescence assay; nPCR: nested PCR; NT: not tested. All the data are represented as positive samples/analysed samples (% positive samples).

Table 3 | Log₁₀ removal of microorganisms within the treatment processes of STP1

Parameter	Primary and secondary treatments (E-S)	UV disinfection (S-T)	Whole processes (E-T)
Human adenovirus ^a	1.03 (89%)	0.13 (11%)	1.16
<i>Giardia</i> spp. ^b	1.99 (85%)	0.34 (15%)	2.33
<i>Cryptosporidium</i> spp. ^b	1.37 (60%)	0.90 (40%)	2.27

E: entry (raw sewage), S: secondary treatment effluent and T: tertiary treatment effluent (after UV disinfection).

^aQuantified by qPCR.

^bQuantified by IFA. Data in parenthesis show % of log₁₀ removal.

Table 4 | Log₁₀ removal of microorganisms within the treatment processes of STP2

Parameter	Primary and secondary treatments (E-S)	Sand filtration (S-F)	UV disinfection (F-T)	Whole processes (E-T)
Human adenovirus ^a	1.51 (81%)	0.31 (17%)	0.04 (2%)	1.86
<i>Giardia</i> spp. ^b	2.56 (86%)	0.12 (4%)	0.30 (10%)	2.98
<i>Cryptosporidium</i> spp. ^b	1.28 (73%)	0.29 (17%)	0.18 (10%)	1.75

E: entry (raw sewage), S: secondary treatment effluent, F: after sand filtration treatment and T: tertiary treatment effluent (after UV disinfection).

^aQuantified by qPCR.

^bQuantified by IFA. Data in parenthesis show % of log₁₀ removal.

was quantified at this sampling point. The application of UV disinfection in STP1 (reducing them by 0.13 log₁₀, 0.34 log₁₀ and 0.90 log₁₀, respectively) and in STP2 (0.04 log₁₀, 0.30

log₁₀ and 0.18 log₁₀, respectively) was evaluated. UV disinfection should reduce the concentration of pathogens notably, although this process showed relatively poor

reduction. Furthermore, using a sand filtration process before the UV disinfection in STP2 was also evaluated (reducing HAdV by 0.31 log₁₀, *Giardia* by 0.12 log₁₀ and *Cryptosporidium* by 0.29 log₁₀), and the observed data revealed that the combination of these two processes was less effective than the first two stages studied in both STPs. The application of UV disinfection and sand filtration is required to disinfect water and maintain quality, which reduces the requirements for chlorination. However, the data obtained reveals that HAdV detected by qPCR was detected in the reclaimed water following the disinfection processes. It exhibited similar log₁₀ removal behaviour to that of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in these plants, which were detected by IFA, showing a higher concentration than other pathogens or faecal indicators, even in tertiary reclaimed water that complies with current regulations in Spain (Real Decreto 1620/2007).

The presence of HAdV, faecal coliforms, *Salmonella*, *Giardia* and *Cryptosporidium* in tertiary reclaimed water are presented in Table 5. UV dose (mWs/cm²), accumulated precipitation (mm) for a 24 h period and average temperature (°C) observed during sampling have also been included. Climatological data were recorded by the Spanish Meteorological Agency (AEMET).

No associations between the temperature, precipitation and presence of tested microorganisms was observed. Correlations between the concentrations of *Giardia*, *Cryptosporidium* and the viral faecal indicator evaluated (HAdV) were determined by linear regression and the model adequacy was tested by the Anova Test ($\alpha = 0.05$), calculated by PASW Statistics 18 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Values less than the detection limit were considered as zero. Taking all samples into account, bad correlations were found between the microorganisms ($r < 0.4$, P -Value < 0.05), indicating that HAdV could not predict the concentration of these pathogens. However, high concentrations of HAdV were detected in all samples, even when pathogenic protozoa concentrations were very low or negative, indicating that human adenoviruses could be a protective indicator of faecal contamination considering the diversity of pathogens analysed in both STPs studied.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that the prevalence and concentrations of human pathogens, including viruses, in raw sewage in the STPs analysed are elevated and represent a challenge for the sanitation system. The results obtained

Table 5 | Presence of faecal bacteria/viral indicators and pathogens in tertiary reclaimed water samples

Site	Day	Mean temperature (°C)	Precipitation (mm/day)	UV dose (mWs/cm ²) ^a	HAdV ^b (GC/100 mL)	HAdV ^c	Faecal coliforms ^b (CFU/100 mL)	<i>Salmonella</i> ^b (CFU/100 mL)	<i>Giardia</i> ^c (cysts/L)	<i>Cryptosporidium</i> ^c (oocysts/L)
STP1	21/10/2009	19.4	4.1	43	2.61 × 10 ⁴	Presence	> 1,000	Presence	2.0	0.0
	04/11/2009	20.4	0	49	8.32 × 10 ³	Presence	> 1,000	Absence	0.0	0.0
	18/11/2009	17.2	0	137	6.62 × 10 ²	Absence	> 1,000	Absence	2.0	0.4
	02/12/2009	16.2	1.9	54	5.55 × 10 ²	Presence	> 1,000	Absence	0.0	0.4
	16/12/2009	5.9	0.7	50	1.21 × 10 ⁴	Absence	111	Absence	3.6	0.8
	13/01/2010	12.1	1.8	190	1.10 × 10 ²	Presence	35	Absence	1.2	0.0
STP2	04/02/2010	10.5	6.1	161	8.08 × 10 ²	Presence	25	Absence	13.2	0.4
	05/11/2009	17.2	0	135	7.54 × 10 ²	Presence	> 1,000	Absence	0.4	0.4
	19/11/2009	15.7	0	116	1.97 × 10 ²	Presence	> 1,000	Absence	1.2	0.4
	03/12/2009	14.7	0.2	106	2.42 × 10 ²	Presence	Absence	Absence	0.4	1.6
	17/12/2009	7.6	0	108	4.90 × 10 ³	Presence	32	Presence	2.0	3.6
	14/01/2010	12.5	0	96	2.56 × 10 ²	Presence	Absence	Absence	1.2	0.0

^aC: degrees Celsius; mm/day: millimetres per day; mWs/cm²: milliwatt seconds per square centimetre; GC: genomic copies; CFU: Colony-forming unit.

^bQuantified by qPCR.

^cDetected and quantified by standard culture methods.

^dQuantified or tested by IFA.

indicate that human adenoviruses quantified by qPCR represents a useful tool as pathogen/indicator in water and may be used as an indicator of removal efficiency of pathogens by STPs. The current treatments studied here reduce the numbers of the analysed pathogens by about 1.2–3.0 log₁₀; however, the reclaimed water produced contains viable pathogens and would be a source of dissemination of infectious viruses and bacteria in the environment and in food. The application of UV disinfection and sand filtration is useful for disinfection and maintaining water quality, reducing the requirements for chlorination, however, the depuration treatments applied in many STPs should probably be improved. The pathogens detected must be evaluated using a risk assessment model. Such information will be essential in developing improved guidelines for the re-use of reclaimed water.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research reported in the manuscript was supported by grants from the ‘Ministerio de Educación y Ciencia’ of the Spanish Government (projects AGL2008-05275-C03-01 and AGL2011-30461-C02-01). Anna Carratalà and Jesús Rodríguez-Manzano were fellows of the Spanish Ministry of Science.

REFERENCES

- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J. M., Courtois, S. & Girones, R. 2009 Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* **158**, 104–109.
- Amorós, I., Alonso, J. L. & Cuesta, G. 2010 Cryptosporidium oocysts and giardia cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J. Food Prot.* **73**, 1138–1140.
- Bofill-Mas, S., Albiñana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. & Girones, R. 2006 Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7894–7896.
- Calgua, B., Barardi, C. R., Bofill-Mas, S., Rodríguez-Manzano, J. & Girones, R. 2011 Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol. Methods* **171**, 1–7.
- Calgua, B., Rodríguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M. & Girones, R. New methods for the concentration of viruses in urban sewage using quantitative PCR. In press.
- Cañigral, I., Moreno, Y., Alonso, J. L., González, A. & Ferrús, M. A. 2010 Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiol. Res.* **165**, 657–664.
- Field, K. G., Bernhard, A. E. & Brodeur, T. J. 2003 Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection. *Environ. Monit. Assess.* **81**, 313–326.
- Fu, C. Y., Xie, X., Huang, J. J., Zhang, T., Wu, Q. Y., Chen, J. N. & Hu, H. Y. 2010 Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* **61**, 1589–1599.
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. A., Hundesa, A., Carratala, A. & Bofill-Mas, S. 2010 Molecular detection of pathogens in water – the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* **44**, 4325–4339.
- González, A., Suski, J. & Ferrús, M. A. 2010 Rapid and accurate detection of arcobacter contamination in commercial chicken products and wastewater samples by real-time PCR. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**, 327–338.
- Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Torvela, N., Heikinheimo, A. & Hänninen, M. L. 2004 *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000–2001. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 87–95.
- Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J. & Stetzenbach, L. D. 2002 *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, DC.
- Lipp, E. K., Farrah, S. A. & Rose, J. B. 2001 Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 286–293.
- McFeters, G. A., Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., Thomson, C. A. & Stuart, D. G. 1974 Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* **27**, 823–829.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Hernández, M. & Hernández, J. 2003a Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1181–1186.
- Moreno, Y., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Jiménez, A. & Hernández, J. 2003b Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res.* **37**, 2251–2256.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. & Girones, R. 1998 Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3376–3382.
- Pote, J., Haller, L., Kottelat, R., Sastre, V., Arpagaus, P. & Wildi, W. 2009 Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland. *J. Environ. Sci.* **21**, 62–69.
- Real decreto 1620/2007 2007 De 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *B.O.E.* **294**, 50639–50661.
- Rodríguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R. & Girones, R. 2010 Analysis of the evolution in the circulation of HAV

- and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health*. **8**, 346–354.
- Savichtcheva, O. & Okabe, S. 2006 Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* **40**, 2463–2476.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R. & Lukasik, J. 2002 Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5796–5803.
- Simpson, J. M., Santo Domingo, J. W. & Reasoner, D. J. 2002 Microbial source tracking: state of the science. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 5279–5288.
- Sinclair, R. G., Jones, E. L. & Gerba, C. P. 2009 Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1769–1780.
- Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R. & Palmer, C. J. 2000 Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 230–237.
- Tree, J. A., Adams, M. R. & Lees, D. N. 2003 Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2038–2043.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J. P. & Godon, J. J. 2008 Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* **42**, 53–62.

First received 25 January 2012; accepted in revised form 20 March 2012

Capítulo III

**Desarrollo de nuevos métodos de
concentración de partículas víricas en
agua residual**

RESUMEN ESTUDIO 5:**New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR**Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones RSometime a *Journal of Virological Methods*. 2012**INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de tecnologías moleculares aplicadas a estudios ambientales ha permitido constatar que incluso en países altamente industrializados existe una alta prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas, principalmente por las infecciones víricas originadas en agua y alimentos contaminados. Concentraciones significativas de virus son detectadas en las aguas vertidas en el ambiente y en los biosólidos generados en plantas de tratamiento de agua residual. Por lo tanto, el agua residual representa un importante foco de introducción de patógenos al ambiente, especialmente patógenos víricos ya que estos son estables en condiciones ambientales. Un reciente estudio de metagenómica sobre virus en agua residual ha reportado la presencia de cerca de 600.000 secuencias potencialmente relacionadas con virus, de las cuales 596.146 podrían representar nuevos virus.

Debido a actual la necesidad de establecer una metodología para concentrar virus en agua residual que proporcione una buena relación de coste-efectividad y que sea fácilmente estandarizable y aplicable en laboratorios de rutina, en este estudio se han desarrollado y evaluado tres nuevos métodos de concentración de partículas víricas en agua residual cruda procedente de Barcelona y País Vasco (España) mediante el estudio de la concentración y cuantificación por qPCR de virus DNA (HAdV y JCPyV) y RNA (NoV GGII). Además, los métodos se han comparado con un protocolo previamente descrito en la literatura y ampliamente utilizado en nuestro grupo de investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio aquí descrito se ha comparado y evaluado un método de concentración de partículas víricas en agua residual frecuentemente utilizado en nuestro laboratorio de

investigación (UC) con tres nuevos métodos (ESMP, UF y LF). De acuerdo con los estudios estadísticos realizados y con la manipulación experimental, el protocolo de concentración basado en la elución de las partículas víricas mediante la utilización de un tampón glicina a pH básico seguido por una floculación orgánica (ESMP) se presentó como el más adecuado para concentrar y cuantificar HAdV, JCPyV y NoV GGII en muestras crudas cuando se lo comparó con: (i) ultracentrifugación-elución con tampón glicina, pH = 9.5 (UC), (ii) ultrafiltración-elución con tampón glicina, pH = 9.5 (UF) y (iii) liofilización (LF). Aunque todos los métodos aquí descritos presentaron rangos de cuantificación habituales para los virus analizados en este tipo de muestras, la utilización de material y maquinaria específica tales como la ultracentrífuga (UC), ultrafiltros (UF) o el liofilizador (LF), dificultan su implementación debido al elevado coste económico asociado.

Para evaluar la eficiencia de recuperación de ESMP y asegurar la repetitividad del método escogido, diez alícuotas tomadas a partir de una única muestra de agua residual cruda fueron evaluadas para HAdV, JCPyV y NoV GGII. El CV fue utilizado como estimador de la variabilidad intra-laboratorio y los resultados obtenidos mostraron un CV de 16% para HAdV, del 12% para JCPyV y del 17 para NoV II. También se realizaron ensayos de recuperación y se observaron valores que oscilaban entre el 30% – 95% para HAdV, 55% – 90% para JCPyV y 45% – 90% para NoV II. Finalmente, ESMP fue validado mediante un estudio de campo formado por muestras de agua residual compuestas durante un período de 24 horas. Tal y como se esperaba, el 100% de las muestras fueron positivas y los valores obtenidos se situaron en rangos de detección habituales.

CONCLUSIONES

Se han descrito un total de cuatro alternativas para concentrar virus DNA y RNA en agua residual, tres de las cuales se han desarrollado y presentado por primera vez en el trabajo aquí descrito. ESMP se ha definido como el método más sensible, mostrando una recuperación de partículas del 50%. Considerando los valores obtenidos para el CV (12 – 17%) este método produce resultados reproducibles. Dicho método puede ser aplicado en programas de detección de virus a gran escala, es efectivo, económico y fácilmente estandarizable y aplicable en laboratorios de rutina relacionados con la calidad del agua. Los métodos moleculares de qPCR aplicados son una herramienta útil para la detección de virus en agua residual, debido a que proporcionan resultados consistentes y las interferencias por inhibición son muy limitadas.

El CV se ha propuesto como un elemento para la evaluación y comparación de los métodos desarrollados para concentrar y detectar virus en muestras de agua residual, proponiendo un $CV \times 100 \leq 50\%$ como valor de referencia para considerar a un método como reproducible y eficiente.

NEW METHODS FOR THE CONCENTRATION OF VIRUSES FROM URBAN SEWAGE USING QUANTITATIVE PCR

Byron Calgua^{a,*}, Jesus Rodriguez-Manzano ^{a,*}, Ayalkibet Hundesa^a, Esther Suñen^b, Miquel Calvo^c, Sílvia Bofill-Mas^a, Rosina Girones^{a,1}

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain

^bDepartment of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Paseo de la Universidad 7, Vitoria-Gasteiz 01006, Spain

^cDepartment of Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain

*Byron Calgua and Jesus Rodriguez-Manzano contributed equally to this study and should both be considered first authors.

¹Author for correspondence: Dr. Rosina Girones, Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Telephone number: (+34) 93 402 1483. Fax number: (+34) 93 403 9047. E-mail: rgirones@ub.edu

ABSTRACT

Viruses are among the most important pathogens present in water contaminated with feces or urine and represent a serious risk to human health. Here we compare four procedures for concentrating viruses from sewage, three of which were developed in the present study. Viruses were quantified using PCR techniques. According to statistical analysis and the sensitivity to detect human adenoviruses (HAdV), JC polyomaviruses (JCPyV) and noroviruses genogroup II (NoV GGII), (i) a new procedure (ESMP) based on the elution of the viruses with glycine-alkaline buffer followed by organic flocculation with skimmed milk was found to be the most efficient method when compared to (ii) ultrafiltration and glycine-alkaline elution, (iii) a lyophilization-based method and (iv) ultracentrifugation and glycine-alkaline elution. Through the analysis of replicate sewage samples, ESMP showed reproducible results with a coefficient of variation (CV) of 16% for HAdV, 12% for JCPyV and 17% for NoV GGII. Using spiked samples, the viral recoveries were estimated at 30%-95% for HAdV, 55%-90% for JCPyV and 45%-50% for NoV GGII. ESMP was validated in a field study using twelve 24-h composite sewage samples collected in a urban sewage treatment plant in the North of (Spain) that reported 100% positive samples with mean values of HAdV, JCPyV and NoV GGII similar to those of other studies. Although all of the methods compared here consistently yield high values of virus detection and recovery in urban sewage, some require expensive laboratory equipment. ESMP is an effective low-cost procedure which allows a large number of samples to be processed simultaneously and is easily standardizable for use in a routine laboratory involved in water monitoring. Moreover, in the present study, a CV was applied and proposed as a parameter to evaluate and compare the methods for detecting viruses in sewage samples.

Keywords: sewage, virus, virus concentration, qPCR, human adenovirus, JC polyomavirus, norovirus, coefficient of variation.

1. INTRODUCTION

Raw sewage is the most important source of pathogens that enter the environment, especially viruses that show a high stability in environmental conditions. Although raw sewage from urban areas, hospitals and slaughterhouses is usually treated before being released into the environment, several studies have documented the presence of pathogenic viruses in treated water (Bofill-Mas *et al.*, 2006; Fumian *et al.*, 2010; Gantzer *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 2005; van

den Berg *et al.*, 2005). Untreated and treated sewage may represent a source of environmental contamination

A recently published metagenomic study of viruses present in urban sewage reported the presence of nearly 600,000 new virus-related sequences; 43,381 associated with known viruses and 596,146 that may be new viruses unrelated to previously identified ones (Cantalupo *et al.*, 2011). New viruses, such as the picornavirus Klassevirus and the Asfarvirus-like virus, have also recently been reported in urban sewage (Hotz *et al.*, 2009; Loh *et al.*, 2009). Moreover, studies of urban sewage have provided valuable information on the prevalence of many viral infections and the dissemination of new viruses in diverse populations; Bofill *et al.* (2010) described the presence of new polyomaviruses Merkel cell, KI and WU; Rodriguez-Manzano *et al.* (2010) analyzed the evolution in the circulation of the hepatitis A and E viruses in the population of Eastern Spain; and Prado *et al.* (2011) detected different enteric viruses in effluent water from two hospitals. All of these data suggest that raw sewage represents a useful matrix to study viruses excreted by human and animal populations.

Classical enteric human viruses, such as adenoviruses, rotaviruses, noroviruses and enteroviruses, and viruses excreted by urine such as the BK and JC polyomaviruses, have been widely detected in sewage from different geographical areas (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Fumian *et al.*, 2010; Miagostovich *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2010). Interestingly, various studies have reported that the levels of classical bacterial indicators (*E. coli* and enterococci) do not always correlate with viruses, particularly when bacterial indicator concentrations are low (Brownell *et al.*, 2007; Calgua *et al.*, 2008; Colford *et al.*, 2007; Wyn-Jones *et al.*, 2011). Improved indicators will be useful and human adenoviruses (HAdV) and JC polyomaviruses (JCPyV) have been proposed as viral indicators of human fecal contamination in the environment and have played an important role in recent studies on water quality (Albinana-Gimenez *et al.*, 2006; Bofill-Mas *et al.*, 2000; McQuaig *et al.*, 2006, 2009; Miagostovich *et al.*, 2008; Puig *et al.*, 1994; Tong and Lu, 2011; Wyn-Jones *et al.*, 2011), showing high stability in the environmental conditions and to disinfection treatments commonly applied to sewage and drinking water (Bofill *et al.*, 2006; Ogorzaly *et al.*, 2010; Wong and Xagorarakis, 2011). According to previous studies, HAdV are almost always present in sewage samples from different geographical areas and show a mean concentration of 10^3 and 10^2 genomic copies (GC)/mL for HAdV and JCPyV, respectively (Bofill-Mas *et al.*, 2006; Fong *et al.* 2009; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2012).

HAdV is grouped in 52 serotypes, which have been widely reported to cause a broad range of clinical manifestations including respiratory tract infection, acute conjunctivitis, cystitis, gastroenteritis, and systemic infections. JCPyV is a human virus in the *Polyomaviridae* family that triggers latent and chronic infections that persist indefinitely in individuals and causes healthy individuals to regularly excrete viral particles in their urine (Shah, 1995). JCPyV is commonly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in immunocompromised individuals and has attracted new attention due to its reactivation in a small percentage of patients with multiple sclerosis and other autoimmune diseases treated with immunomodulators (Berger and Major, 1999; Yousry *et al.*, 2006). The noroviruses are a major cause of sporadic outbreaks of infectious gastroenteritis, which occasionally requires hospitalization (Glass *et al.*, 2009). Outbreaks commonly occur in closed populations such as childcare centers and cruise ships (Khan and Bass, 2010), with older children and adults being infected more frequently than infants (Glass *et al.*, 2009). Based on the phylogenetic analysis of the viral capsid (VP1) gene, NoV is classified into five genogroups, which are further subdivided into genotypes. Genogroups I (GGI), II (GGII) and IV (GGIV) infect humans (Glass *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010). Despite this diversity, only a few strains, primarily those of genogroup II, genotype 4 (GGII.4), have been responsible for the majority of recent cases and outbreaks (Barreira *et al.*, 2010; Bull and White, 2011; Ferreira *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2011).

Methods based on ultracentrifugation and glycine-alkaline elution, have been described by Pina *et al.* (1998) and have been widely used in our laboratory (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Clemente-Casares *et al.*, 2003, 2009; Pina *et al.*, 1998; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010). In order to define concentration methods with high level of cost-efficiency and applicability, new protocols have been developed and evaluated in this study for quantifying viruses present in sewage. DNA viruses such as HAdV and JCPyV, and RNA virus as NoV have been selected as representative viruses for the study.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sewage samples

Four sets of sewage samples were used in this study. Each sample was harvested in a sterile 1,000-mL polyethylene container and kept at 4 °C for less than 24 h until the virus particles were concentrated:

(i) Comparison of methods: five samples of 200 mL raw urban sewage were collected between November and December 2010 at the entrance of a sewage treatment plant (STP) located in Barcelona (Catalonia, Spain) that receives sewage from a human population of about 1.8 million inhabitants. Each sample was divided into four aliquots ($n=20$) and each set of aliquots ($n=5$) was processed using one specific concentration method based on flocculation, ultrafiltration, lyophilization and ultracentrifugation. The volumes of each aliquot and the procedure used are described in Figure 1.

(ii) Repeatability assay for the elution and skimmed-milk flocculation procedure: one sample of raw urban sewage was collected at the entrance of STP located in Barcelona (Catalonia, Spain) and divided into ten 50-mL aliquots.

(iii) Recovery assay for the elution and skimmed-milk flocculation procedure: one sample of raw urban sewage was collected at the entrance to a STP located in Barcelona (Catalonia, Spain) and divided into ten 50-mL aliquots. The aliquots were processed using two different assays for estimating virus recovery.

(iv) Field study: twelve 24-h composite 50-mL samples were collected between September and December 2010 at the entrance of a STP in Vitoria (Basque Country, Spain) that receives sewage from a human population of about 240,000 inhabitants.

2.2. Virus-concentration methodology

Figure 1 shows a schematic chart with a description of the protocol used in each of the four virus-concentration methods tested in the present study and a complete description can be found below. According to the virus-concentration method applied and the limitations caused by the volume capacity of the filters and rotors, used sample volumes ranged from 42 to 50 mL, depending on the method used. Viral concentrates obtained by applying the different procedures were dissolved with the same phosphate buffer at pH 7.5 (1:2, v/v of Na_2HPO_4 0.2 M and NaH_2PO_4 0.2 M). When necessary, the final viral concentrates were stored at -80°C .

2.2.1 Elution and skimmed-milk flocculation procedure (ESMP)

The sewage sample (50 mL) was transferred to a 500-mL centrifuge pot and the viruses present were eluted using 100 mL of glycine buffer 0.25 N, pH 9.5 (1:2 v/v). The sample was

stirred rapidly for 30 min on ice and centrifuged at 8,000 xg for a further 30 min at 4 °C. The supernatant (150 mL) was transferred to a new centrifuge pot, the pH was adjusted to 3.5 with HCl 1N, and 1.5 mL of pre-flocculated skimmed-milk solution (final concentration of skimmed milk 0.01% (w/v)) was added. The pre-flocculated skimmed-milk solution (1% (w/v)) was prepared in advance according to Calgua *et al.* (2008) by dissolving 1 g of skimmed-milk powder (Difco, Detroit, MI, USA) in 100 mL artificial seawater and carefully adjusting the pH to 3.5 with HCl 1 N. The sample was then stirred for 8 h to allow the viruses to be adsorbed into the skimmed-milk flocs at room temperature (RT). Then flocs were sedimented by centrifugation at 8,000 xg for 30 min at 4 °C. The supernatants were carefully removed without disturbing the sediment and the pellet was dissolved in 500 μ L of phosphate buffer.

2.2.2. Ultrafiltration-based method (UF)

Millipore Ultrafree-15 Centrifugal Filters 100,000-MW cutoff (Millipore, Milford, MA, USA) were washed with 10 mL of bi-distilled sterile water (four filters per sample), centrifuged at 2,000 xg for 10 min and the filtered water was discarded. A 45-mL sample of sewage was transferred to three pre-washed filters (15 mL each), centrifuged at 2,000 xg for 1 h at RT and the filtered volume was discarded. The viruses were eluted from each filter by using 4 mL of glycine buffer 0.25 N and pH 9.5. The eluted viruses (approximately 12 mL) were transferred to a sterile 50-mL tube, incubated for 30 min at 4 °C (vortexed every 10 min) and centrifuged at 3,000 xg for 30 min at 4 °C. The supernatant was then recovered and transferred to a pre-washed filter. The filter was centrifuged at 2,000 xg for 1 h at RT and subsequently mixed by vortex and centrifuged at 2,000 xg for 2 min at RT. Finally, the volume retained by the filter was collected in 100 μ L.

2.2.3. Lyophilization-based method (LF)

A 50-mL sample of sewage was frozen to -80 °C and lyophilized for 24 to 36 h. The lyophilized sample (powder) was then dissolved in 500 μ L of phosphate buffer.

2.2.4. Ultracentrifugation-based method (UC)

This procedure had been described previously and applied to several studies (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Clemente-Casares *et al.*, 2003, 2009; Pina *et al.*, 1998; Rodriguez-Manzano *et al.*, 2010).

Briefly, 42 mL of sewage were ultracentrifuged at 100,000 xg for 1 h at 4 °C to pellet all the viral particles together with any suspended material. The viruses present in the pellet were eluted by mixing it with 4 mL of 0.25 N glycine buffer (pH 9.5) on ice for 30 min, and after the addition of 4 mL of phosphate buffer, the suspended solids were separated by centrifugation at 3,000 xg for 20 min. Finally, the viruses were concentrated by ultracentrifugation at 100,000 xg for 1 h at 4 °C and resuspended in 100 μ L of phosphate buffer.

2.3. Extraction of nucleic acids from viral concentrates

The extraction of nucleic acids (NA) was performed with QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and the automated system QUIACube (Qiagen, Valencia, CA, USA), both according to manufacturer's instructions. NA extracts were stored at 4 °C and assayed on the same day using quantitative PCR (qPCR) or quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).

2.4. Viral enzymatic amplification and quantitation by qPCR

Quantitative PCR was performed in a 25- μ L final volume containing 1X Master Mix (Applied Biosystems, TaqMan[®] Environmental Master Mix 2.0, Foster City, CA, USA). The reaction contained 10 μ L of a NA extraction or 10 μ L of a quantified DNA and the corresponding primers and TaqMan probes. HAdV genomes were quantified with 0.9 μ M of the AdF and AdR primers and 0.225 μ M of the AdP1 probe as described by Hernroth *et al.* (2002). JCPyV genomes were quantified with 0.5 μ M of the JE3F and JE3R primers and 0.15 μ M of the JE3P fluorogenic probe as described in Pal *et al.* (2006). AmpliTaq Gold was activated for 10 min at 95 °C followed by 40 cycles (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C) using an MX3000P sequence detector system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The qPCR method used for the quantitation of HAdV was tested in previous studies where the qPCR successfully detected human adenoviruses from all species, including 40 and 41 (data not shown). This assay also showed a higher sensitivity in the quantitation of human viruses from urban sewage compared to other previously described assays (Bofill-Mas *et al.*, 2006). HAdV and JCPyV qPCR demonstrated high specificity and their sensitivity was estimated as 1–10 genome copies.

Quantitative reverse transcription-PCR was also performed in a 25- μ L reaction mixture containing 1X of QuantiTect[™] Probe RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The reaction contained 5 μ L of NA extraction or 5 μ L of a quantified plasmid cDNA, 1 μ M of the JJV2F and COG2R primers and 0.1 μ M of the RING2-TP probe, as described by Jothikumar *et al.* (2006).

Following retrotranscription (30 min at 50 °C) and activation of the HotStarTaq (15 min at 95 °C), 45 cycles (10 s at 95 °C, 20 s at 55 °C, 15 s at 72 °C) were performed using an MX3000P sequence detection system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The qPCR assay used for noroviruses has been shown to be specific and to present a sensitivity of <10 genome copies per reaction (Jothikumar *et al.*, 2006).

For the detection and quantitation of specific viral genomes, 10 µL (for HAdV and JCPyV) and 5 µL (for NoV GGII) of neat and 10-fold dilution of every DNA/RNA extraction were tested; these dilutions were designed to detect and reduce amplification inhibition caused by the potential presence of inhibitory substances that may interfere with the qPCR. All samples were run in quadruplicate (two replicates per dilution), and positive and negative controls were included. Known quantities of target DNA were added to a parallel amplification reaction containing qPCR mix and the plasmid. In every assay, the amplification plots of samples and standard dilutions were compared. A sample was considered positive if it produced correct amplification curves and the quantitation data was within the detection limit. The amount of DNA was defined as the average of the duplicate data obtained.

2.5. qPCR standards

For the generation of standards to use in the real-time qPCR assays, three plasmid constructions were employed. The plasmid pJCPyV, which contained the whole JCPyV genome strain Mad-1 in pBR322, was kindly donated by Andrew M. Lewis at the Office of Vaccine Research and Review, CBER/FDA, MD, USA. The plasmid pAd41, containing the hexon region of HAdV 41 in pBR322, was kindly donated by Dr. Annika Allard of the University of Umeå, Sweden. For NoV II, the plasmid pNoV, containing the ORF1–ORF2 junction in pTrueBlue, was kindly donated by Dr. Vinjé and Dr. Jothikumar at the CDC (Atlanta, GA, USA). *Escherichia coli* JM109 cells (Promega, Madison, WI, USA) were transformed with the plasmid (pJCPyV, pAdV41 or pNoV). The plasmids were purified from bacteria using the QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and the DNA was quantified with a GeneQuant pro (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). To reduce the possibility of DNA contamination, the plasmids were linearized with EcoRI (pJCPyV and pNoV) or NruI (pAd41) (Promega, Madison, WI, USA), and then purified and quantified again. Suspensions containing 10^{-2} – 10^7 viral DNA molecules per 10 µL were made in TE buffer and used as standard dilutions, then aliquoted and stored at –80 °C until use.

2.6. Statistical analysis

Data from virus quantification was analyzed using the non-parametric Friedman test for relative efficiency analysis and ranks were allotted by assigning the higher value to the better yield method (Friedman *et al.*, 1937). A *P-value* of <0.05 was considered significant. The statistical analysis was performed using R software version 2.14.1 (R, 2008; Verzani, 2004).**3.**

3. RESULTS

3.1. Comparison of methods for concentrating viruses from raw sewage

The samples/aliquots evaluated (n = 20) by the four different viral concentration methods were positive for all viruses tested and showed high concentration values (Table 1). For HAdV, the different methods differed significantly (Friedman test, *P-Value* = 0.033) and the associated multiple comparison test showed that UC was significantly different from all the other methods tested in terms of the amount of HAdV detected, being of HAdV significantly lower. However, the assigned ranks showed that the higher values were obtained with ESMP (rank = 3.60), followed by LF (rank = 2.60), UF (rank = 2.60) and UC (rank = 1.20). For JCPyV, there were no statistically significant differences (Friedman test, *P-Value* = 0.948), although ESMP showed the higher rank value (rank = 2.80), followed by UC (rank = 2.40), LF (rank = 2.40) and UF (rank = 2.40). For NoV GGII detection, there were no significant differences (Friedman test, *P-Value* = 0.077) and ESMP (rank = 3.60) showed the higher ranking values, followed by UC (rank = 2.80), UF (rank = 1.80) and LF (rank = 1.80).

3.2. Repeatability assay for ESMP validation

To evaluate ESMP efficiency and ensure the repeatability of the procedure, 10 aliquots of raw urban sewage were evaluated for HAdV, JCPyV and NoV GGII as a model for DNA and RNA viruses. The percentage of coefficient of variation (CV) ($[\text{standard deviation}/\text{mean}] \times 100$) was used as an estimator of intra-laboratory variability. The results obtained are shown in Figure 2. The estimated CV was 15.9% for HAdV (mean: 6.89×10^2 ; Min: 5.27×10^2 ; Max: 8.64×10^2 ; SD: 1.09×10^2 GC/mL) and 12.2% for JCPyV (mean: 1.39×10^3 ; Min: 1.12×10^3 ; Max: 1.59×10^3 ; SD: 1.71×10^2 GC/mL), whereas it was 17.4% for NoV GGII (mean: 3.17×10^3 ; Min: 2.45×10^3 ; Max: 3.81×10^3 ; SD: 5.52×10^2 GC/mL).

3.3. Recovery assay for ESMP

The recovery of ESMP for HAdV, JCPyV and NoV GGII was evaluated using two different assays from one raw-sewage sample collected in Barcelona, Spain.

(i) By analyzing the losses in the viral concentration of four aliquots (50 mL) through the quantitation of viruses present in the pellet from the first centrifugation (A: Figure 1, step 4) and the supernatant from the last centrifugation (B: Figure 1, step 9), depending on the total viruses quantified in the final concentrate (C) and according to the following equation: $\text{Recovery (\%)} = C/(A+B+C) \times 100$. The viruses present in the A portion were resuspended in 7 mL of glycine buffer (0.25 M, pH 9.5) and then ultracentrifuged, whereas the viruses from the B portion were directly ultracentrifuged. The viruses from both pelleted portions were eluted in 100 μL of phosphate buffer and the NA directly extracted for the qPCR assay.

(ii) Six aliquots of 50 mL each were concentrated by ESMP and the titer was determined among spiked samples with known amount of viruses ($n=4$). Non-spiked samples ($n=2$) were used to determine endogenous viruses.

For HAdV, JCPyV and NoV GGII, the estimated recoveries were about 30%-95%, 55%-90% and 45%-90%, respectively.

3.4. Field study

In winter 2010 (September to December), 50 mL of twelve 24-h composite samples collected at the entrance of a STP located in Vitoria (Basque Country, Spain) were analyzed by applying the ESMP. The NA from viral concentrates were extracted and analyzed using qPCR and qRT-PCR. As expected, all samples were positive for HAdV, JCPyV and NoV GGII, with values (GC/mL) ranging from 4.56×10^2 to 3.41×10^3 (SD: 8.47×10^2), from 1.59×10^2 to 1.61×10^3 (SD: 4.07×10^2) and from 1.41×10^0 to 7.98×10^1 (SD: 2.27×10^1), respectively (Table 2).

4. DISCUSSION

There is a need for cost-effective easily standardizable virus concentration methods to be used in routine laboratories. In the present study, a previously described method that has been

successfully applied in many studies (UC) was compared and evaluated using three proposed new protocols. Moreover, the repeatability of the results and the virus recovery of the most sensitive method, i.e. the ESMP protocol, were further evaluated.

The first step of the ESMP is to elute the viruses (50 mL of sewage) from the organic matter using an alkaline-glycine buffer, then the viruses present in the supernatant are concentrated using organic flocculation under acidic conditions and the addition of a skimmed-milk solution, a process based on previous methods to concentrate viruses from sea, river and ground water with a viral recovery of about 50% for HAdV, JCPyV, NoV and rotaviruses (Bofill *et al.*, 2011; Calgua *et al.*, 2008). Although no significant statistical differences were observed in accordance with Friedman's ranking analysis, this method gave a better yield of HAdV (DNA virus), JCPyV (DNA virus) and NoV GGII (RNA virus) in natural samples when compared to three alternative methods: (i) Ultracentrifugation and glycine-alkaline elution (Pina *et al.*, 1998), which has been described as an efficient method that allows 42 mL of sewage to be concentrated to 100 μ L of PBS, but may be limited by the need for a high-cost ultracentrifugation device, which most routine laboratories involved in water-quality analysis do not have access to. (ii) Ultrafiltration and alkaline-glycine elution, an alternative method also described here. This showed the same ratio of concentration as the ultracentrifugation method and although it does not require special equipment, the cost of the filters required for one sample and the potential problems associated with the clogging of high organic matter could limit this method. (iii) The lyophilization-based method is a one-step procedure also described in the present study as a new method for the concentration of viruses in sewage. This allows 50 mL of sewage to be concentrated to 500 μ L of phosphate buffer with high virus-recovery rates. One advantage of this method is that none of the sample is lost during the concentration process. However, the time required for the method (24-36h) and the lyophilization device it uses mean that this method is probably unfeasible in most laboratories. Although there are more procedures described for the concentration and detection of viruses from sewage, most of them use membranes and/or filters that require pre-treatments. The use of a pre-filter before virus concentration using membranes or filters to avoid clogging may be associated with the loss of viruses in the organic matter that may be retained in the pre-filter. This represents a significant limitation for the detection of viruses usually present in low concentrations.

The reproducibility of concentration methods for the quantification of viruses in water has been defined as a significant limitation in current protocols (Girones *et al.*, 2010). The CV of the ESMP, the most sensitive method, was also evaluated by using the values of the viruses

detected in natural samples together with the virus-recovery test using a spiked sample. The percentage of CV (in the present study: $CV = \text{standard deviation [SD]}/\text{mean-viruses recovered [MVR]} \times 100$) is the ratio between SD and MVR and, as expected, when a method is developed successfully, this value is lower. There is a lack of information in the literature about the CV applied to methods for concentration viruses from water samples. ESMP showed mean recovery values of about 50% for HAdV, JCPyV and NoV GGII, and CVs (n=10) ranging between 12% and 17%. Nupen *et al.* (1970) compared two procedures for concentrating viruses from sewage and two methods (cell culture-based methods) to detect the virus-recovery rate; the results showed CV values from 40% to 80%, depending on the detection method selected. Lambertini *et al.* (2008) showed CVs ranging between 21% and 91% with trials of more than three samples for polioviruses, HAdV and NoV detection in different ground and tap water samples by using the glass-wool based procedure as a virus-concentration method and qPCR as a method for detection and quantification. Moreover, different CVs were reported for poliovirus detection (24-81%) compared to Vilaginès *et al.* (2003) (CV 8-40%). In addition, the molecular protocols for detecting and quantifying viruses using qPCR TaqMan® in the present study have been applied previously with different environmental samples such as sewage, seawater and river water (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Bofill-Mass *et al.*, 2010; Calgua *et al.*, 2011; Wyn-Jones *et al.*, 2011). The variability to quantify RNA viruses is expected to be higher than DNA viruses, since an additional RT-PCR step is required. Each qPCR assay included a standard curve (each point per triplicate) that showed significantly lower variability with a correlation close to 1, meaning that the molecular assays for the detection did not introduce any variation to the results of the processes. Furthermore, the NA-extraction protocol had previously been compared with other kits and in-house procedures (data not show), and the most sensitive one, which represents a good approach for avoiding potential inhibitors that may hamper molecular detection, was selected. According to the data available in the literature, most of the studies to compare methods for viral recovery from water estimated the virus-recovery rate, but sometimes used different means. Due to the importance of the repeatability of the results and the fact that variable data from the viruses detected can also give high recovery rates, the inclusion of the CV showing acceptable ratios that should not be more than 0.5 for these types of methods, as previously mentioned (Hill *et al.*, 1971), provides a very significant information related to the applicability of the assay.

Finally, the ESMP was validated in a field study to detect HAdV, JCPyV and NoV GGII in sewage samples. The values detected are in concordance with previous data detected in Spanish

samples (Bofill-Mas *et al.*, 2006; Rodríguez-Manzano *et al.*, 2012). Regarding the quantitative detection assay, each sample and virus were evaluated by quadruplicate; duplicate for the undiluted NA and duplicate for the 10-fold dilution, which led to quantitative data with robust values (Table 2) and an absence of the inhibition effect on the qPCR.

Therefore, as demonstrated in the present study, the methods recover DNA and RNA viruses and the criteria used to select the method are based on the efficiency, low cost and lack of requirements for expensive equipments.

5. CONCLUSIONS

5.1. A total of four alternative procedures for concentrating RNA or DNA viruses from sewage samples are reported: three new procedures presented here (ESMP, LF and UF) and one previously reported (UC) with high efficiency values in virus recovery and quantification by qPCR.

5.2. ESMP has shown to be the most sensitive procedure and shows about 50% viral recovery (DNA and RNA viruses). Considering the CV values (12%-17%), this procedure produces reproducible results. Moreover, the procedure can be applied to large-scale virus-detection programs since it is effective, inexpensive and easily standardizable for use in a routine laboratory involved in water quality.

5.3 The molecular qPCR protocols applied are useful tools for the rapid detection and quantification of viruses from sewage samples.

5.4. In the present study, the CV measurement is proposed as an essential element in the evaluation and comparison of methods that have been developed to detect viruses in water samples. In addition, $CV \times 100 \leq 50\%$ is the proposed limit to indicate the reproducibility and efficiency of a method at concentrating and detecting viruses in water samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research described in the manuscript was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Spanish government (projects AGL2008-05275-C03-01 and AGL2011-30461-C02-01) and European project VIROCLIME, Contract 243923, led by David

Kay. We also thank the contribution of the government of Catalonia (2005SGR00592). We thank PhD Sara de Mateo for her valuable language revision. Anna Carratalà and Jesús Rodríguez-Manzano were fellows of the Spanish Ministry of Science.

REFERENCES

- Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L., Girones, R.,** 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 43, 2011–2019.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., Girones, R.,** 2006. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7416–7422.
- Barreira, D.M., Ferreira, M.S., Fumian, T.M., Checon, R., de Sadovsky, A.D., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., and Spano, L.C.,** 2010. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J. Clin. Virol.* 47, 60–64.
- Berger, J.R., Major, E.O.,** 1999. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Semin. Neurol.* 19, 193–200.
- Bofill-Mas, S.L., Hundesa, A., Calgua, B., Rusiñol, M., Maluquer de Motes, C., Girones, R.,** 2011. Cost-effective Method for Microbial Source Tracking Using Specific Human and Animal Viruses. *J. Vis. Exp.* 3.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R.,** 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7894–7896.
- Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., la Rosa, G., Iaconelli, M., Muscillo, M., Rutjes, S., de Roda Husman, A.M., Grunert, A., Gräber, I., Verani, M., Carducci, A., Calvo, M., Wyn-Jones, P., and Girones, R.,** 2010. Quantification of human adenoviruses in European recreational waters. *Food Environ. Virol.* 2, 1001–1009.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R.,** 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 238–245.
- Bofill-Mas, S., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Carratala, A., Girones, R.,** 2010. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virol. J.* 7, 141.
- Brownell, M.J., Harwood, V.J., Kurz, R.C., McQuaig, S.M., Lukasik, J., Scott, T.M.,** 2007. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. *Water Res.* 41, 3747–3757.
- Bull, R.A., White, P.A.,** 2011. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol.* 19, 233–240.
- Calgua, B., Barardi, C.R., Bofill-Mas, S., Rodríguez-Manzano, J., Girones, R.,** 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol. Methods.* 171, 1–7.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R.,** 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods.* 153, 79–83.
- Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A.D., Katz, J.P., Grabe, M., Hendrix, R.W., Girones, R., Wang, D., Pipas, J.M.,** 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations.

MBio. 2, 1–11.

Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 448–454.

Clemente-Casares, P., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R., 2009. Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *J. Water Health.* 7, 664–673.

Colford, J.M., Wade, T.J., Schiff, K.C., Wright, C.C., Griffith, J.F., Sandhu, S.K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., Weisberg, S.B., 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology.* 18, 27–35.

Ferreira, M.S., Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Vieira, C.B., Xavier, M.P., Fioretti, J.M., Andrade, J., Volotão, E.M., Rocha, M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *J. Med. Virol.* 82, 1442–1448.

Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., Rose, J.B., 2009. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 715–723.

Friedman, M., 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J. Am. Stat. Assoc.* 32, 675–701.

Fumian, T.M., Guimarães, F.R., Pereira Vaz, B.J., da Silva, M.T., Muylaert, F.F., Bofill-Mas, S., Girones, R., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2010. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J. Water Health.* 8, 438–445.

Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M., Schwartzbrod, L., 1998. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4307–4312

Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A.A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44, 4325–4339.

Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361, 1776–1785.

Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4523–4533.

Hill Jr., W.F., Elemer, W.A., Benton, W.H., 1971. Detection of viruses in water: A review of methods and application. *Water Res.* 5, 967–995.

Holtz, L.R., Finkbeiner, S.R., Zhao, G., Kirkwood, C.D., Girones, R., Pipas, J.M., Wang, D., 2009. Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread. *Virol. J.* 6, 86.

Jothikumar, N., Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D., Hill V.R., Vinjé, J., 2006. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-Based One-Step Reverse Transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1870–1875.

Khan, M.A., Bass, D.M., 2010. Viral infections: new and emerging. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 26–30.

Koo, H.L., Ajami, N., Atmar, R.L., DuPont, H.L., 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.* 10, 61–70.

Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A., Borchardt, M.A., 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2990–2996.

Loh, J., Zhao, G., Presti, R.M., Holtz, L.R., Finkbeiner, S.R., Droit, L., Villasana, Z., Todd, C., Pipas, J.M., Calgua, B., Girones, R., Wang, D., Virgin, H.W., 2009. Detection of novel

sequences related to african Swine Fever virus in human serum and sewage. *J Virol.* 83, 13019–13025.

McQuaig, S.M., Scott, T.M., Harwood, V.J., Farrah, S.R., Lukasik, J.O., 2006. Detection of human-driven fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7567–7574.

McQuaig, S.M., Scott, T.M., Lukasik, J.O., Paul, J.H., Harwood, V.J., 2009. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3379–3388.

Miagostovich, M.P., Ferreira, F.F., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Diniz-Mendes, L., Luz, S.L., Silva, L.A., Leite, J.P., 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 375–382.

Nupen, E.M., 1970. Virus studies on the windhoek waste-water reclamation plant (south-west africa). *Water Res.* 4, 661–672.

Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8019–8025.

Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K., Lewis Jr., A.M., 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods.* 135, 32–42.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3376–3382.

Prado, T., Silva, D.M., Guilayn, W.C., Rose, T.L., Gaspar, A.M., Miagostovich, M.P., 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 45, 1287–1297.

Pusch, D., Oh, D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E., 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150, 929–947.

R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, 2008. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.

Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R., Girones, R., 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health.* 8, 346–354.

Shah, K.V., 1995. Polyomaviruses, in: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 1997–2005.

Tong, H.I., Lu, Y., 2011. Effective detection of human adenovirus in Hawaiian waters using enhanced PCR methods. *Virol. J.* 8, 57.

van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res. Microbiol.* 156, 532–540.

Verzani, J., 2004. *Using R for Introductory Statistics.* Chapman & Hall/CRC.

Victoria, M., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Ferreira, F.F., Vieira, C.B., Shubo, T., Leite, J.P., and Miagostovich, M.P., 2010. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Water Health.* 8, 1558–1565.

Vilaginès, P., B. Sarrette, G. Husson, R. Vilaginès., 1993. Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Sci. Technol.* 27, 299–306.

Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. A perspective on the prevalence of DNA enteric virus genomes in anaerobic-digested biological wastes. *Environ. Monit. Assess.*

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C.,

Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* 45, 1025–1038.

Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkil, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E.W., Jager H.R., Clifford, D.B., 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal. *N. Engl. J. Med.* 354, 924–933.

Elution Skimmed Milk Procedure (ESMP)	Ultrafiltration (UF)	Lyophilization (LF)	Ultracentrifugation (UC) (Pina et al., 1998)
<ol style="list-style-type: none"> Place 50 mL of sewage into 500 mL centrifuge pot 	<ol style="list-style-type: none"> Wash the filter units (100K) with 10 mL of bidistilled sterile water (4 units by sample) 	<ol style="list-style-type: none"> Transfer 50 mL of sewage into sterile glass or plastic capped bottle 	<ol style="list-style-type: none"> Transfer 42 mL of sewage into ultracentrifuge tubes
<ol style="list-style-type: none"> Elute viruses using 100 mL of glycine buffer 0.25 N, pH 9.5 (1:2 v/v) 	<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 2,000xg for 10 min 	<ol style="list-style-type: none"> Freeze the sample at -80 °C 	<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge for 1 h at 100,000xg at 4 °C
<ol style="list-style-type: none"> Incubate on ice for 30 min with magnetic stir 	<ol style="list-style-type: none"> Discharge the filtered water 	<ol style="list-style-type: none"> Remove the water by lyophilization for 24-36 h 	<ol style="list-style-type: none"> Remove the supernatant and elute the viruses in a total of 4 mL of glycine buffer 0.25 N, pH 9.5
<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 8,000xg for 30 min at 4 °C 	<ol style="list-style-type: none"> Transfer 45 mL of sewage into 3 pre-washed filter units (15 mL/filter) 	<ol style="list-style-type: none"> Dissolved the lyophilized material with 500 µL of phosphate buffer at pH 7.5 	<ol style="list-style-type: none"> Place the volume (4 mL) in a sterile capped tube and incubate on ice for 30 min shaking
<ol style="list-style-type: none"> Recover the supernatant (150 mL), transfer to a new centrifuge pot and carefully adjust the pH to 3.5 with HCl 1N 	<ol style="list-style-type: none"> Remove the filtered volume 	<ol style="list-style-type: none"> Add with 4 mL of cold PBS 2X 	<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 3,000xg for 20 min
<ol style="list-style-type: none"> Add 1.5 mL of pre-flocculated skimmed milk solution, final concentration of skimmed milk 0.01% (w/v) 	<ol style="list-style-type: none"> Recover the volume retained in the filter (100 µL) with 4 mL of glycine buffer 0.25 N, pH 9.5 	<ol style="list-style-type: none"> Transfer the eluted to sterile tube and incubate at 4 °C for 30 min (vortex every 10min) 	<ol style="list-style-type: none"> Transfer the supernatant into a ultracentrifuge tube and centrifuge for 1 h at 100,000xg at 4 °C
<ol style="list-style-type: none"> Stir from 8 h to O/N at RT to allow the viruses to absorb to the flocs 	<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 3,000xg for 30 min at 4 °C 	<ol style="list-style-type: none"> Recover the supernatant and transfer to a new pre-washed filter unit 	<ol style="list-style-type: none"> Discard the supernatant and elute the pellet with 100 µL of phosphate buffer at pH 7.5
<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 8,000xg for 30 min at 4 °C and discard the supernatant 	<ol style="list-style-type: none"> Recover the supernatant and transfer to a new pre-washed filter unit 	<ol style="list-style-type: none"> Centrifuge at 2,000xg for 1 h at room temperature 	
<ol style="list-style-type: none"> Dissolved the pellet in 500 µL of phosphate buffer at pH 7.5 	<ol style="list-style-type: none"> Vortex the volume that remains in the filter and centrifuge for 2 min at 2,000xg 	<ol style="list-style-type: none"> Recover the final volume retained (100 µL) 	

Fig. 1. Protocols developed for virus concentration from raw sewage.

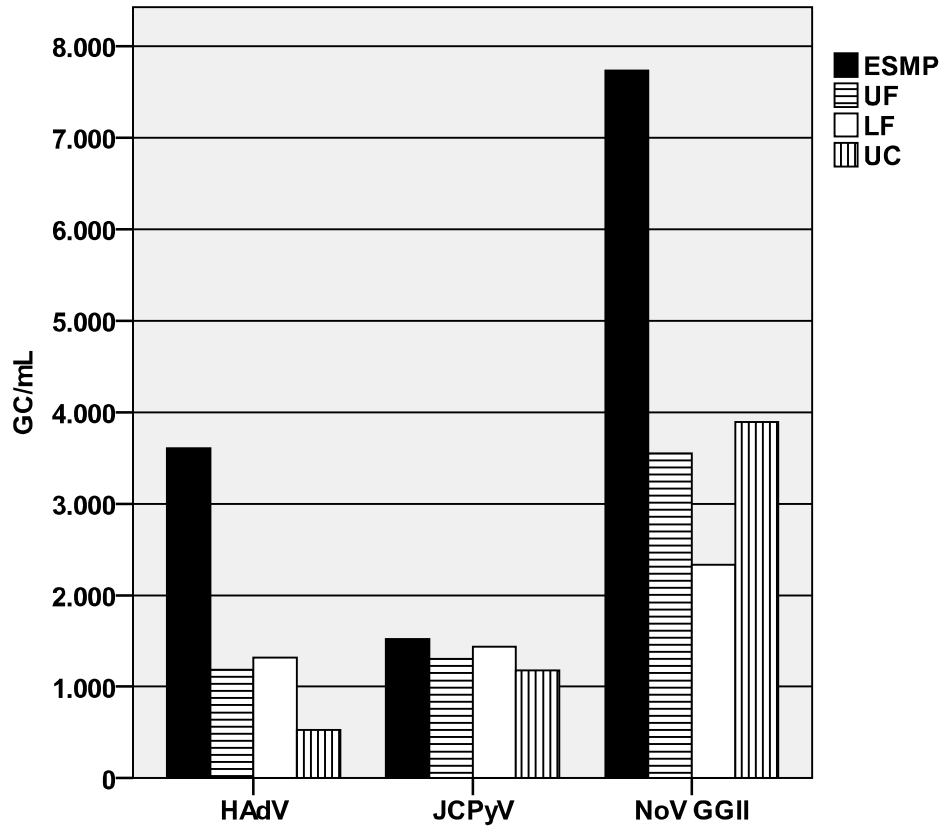


Fig. 2. Evaluation of four different methods for virus concentration from raw sewage. **UC:** ultracentrifugation method; **UF:** ultrafiltration method; **ESMP:** elution skimmed-milk procedure; **LF:** lyophilization method; **GC/mL:** genomic copies/milliliter; **HAdV:** human adenovirus; **JCPyV:** JC polyomavirus; **NoV GGII:** norovirus genogroup II. Bars show means of quantitation.

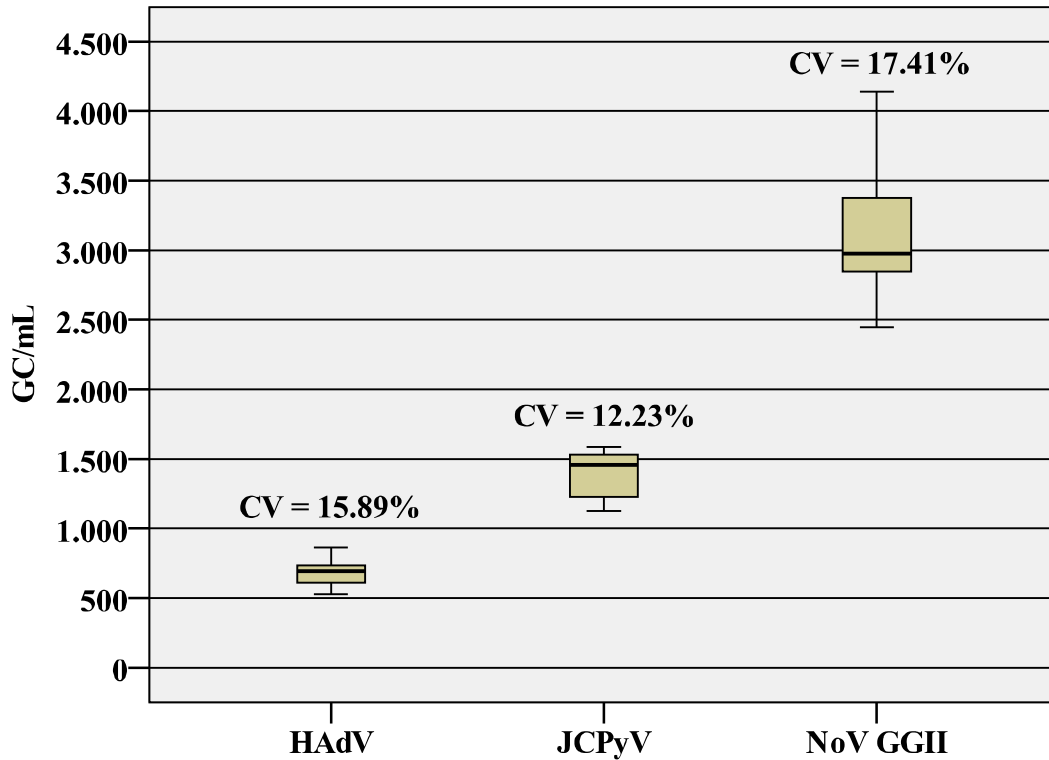


Fig. 3. Repeatability assay for ESMP evaluated with HAdV (DNA), JCPyV (DNA) and NoV GGII (RNA). **HAdV:** human adenovirus; **JCPyV:** JC polyomavirus; **NoV GGII:** norovirus genogroup II; **CV:** coefficient of variation percentage; **GC/mL:** genomic copies/milliliter. The box plots show the first (bottom of box) and third (top of box) quartiles (equivalent to the 25th and 75th percentiles), the median (the horizontal line in the box) and the range (excluding outliers and extreme scores).

Table 1. Quantitation of viruses in raw-sewage samples by four different concentration methods.

Virus	Method	qPCR (GC/mL)				Rank ^a	P-Value
		Mean	SD	Minimum	Maximum		
HAdV	UC	5.3×10^2	3.2×10^2	2.3×10^2	1.0×10^3	1.20	0.033
	UF	1.2×10^3	7.2×10^2	3.9×10^2	1.9×10^3	2.60	
	ESMP	3.6×10^3	1.8×10^3	1.9×10^3	6.4×10^3	3.60	
	LF	1.3×10^3	1.2×10^3	4.4×10^2	2.9×10^3	2.60	
JCPyV	UC	1.2×10^3	6.6×10^2	4.2×10^2	2.1×10^3	2.40	0.948
	UF	1.3×10^3	7.9×10^2	4.7×10^2	2.4×10^3	2.40	
	ESMP	1.5×10^3	5.7×10^2	9.9×10^2	2.4×10^3	2.80	
	LF	1.4×10^3	4.5×10^2	7.8×10^2	1.9×10^3	2.40	
NoV GGII	UC	3.9×10^3	2.0×10^3	2.3×10^3	7.3×10^3	2.80	0.077
	UF	3.5×10^3	4.2×10^3	1.1×10^3	1.1×10^4	1.80	
	ESMP	7.7×10^3	3.2×10^3	2.7×10^3	1.2×10^4	3.60	
	LF	2.3×10^3	1.3×10^3	5.4×10^2	4.0×10^3	1.80	

UC: ultracentrifugation method; **UF:** ultrafiltration method; **ESMP:** elution skimmed-milk procedure; **LF:** lyophilization method; **HAdV:** human adenovirus; **JCPyV:** JC polyomavirus; **NoV GGII:** norovirus genogroup II; **GC/mL:** genomic copies/milliliter; **SD:** standard deviation. ^aFriedman's statistical ranks were assigned using the better yield method.

Table 2.

Detection of HAdV, JCPyV and NoV GII in 24-h composite urban-sewage samples by ESMP.

Collection data (day/month/year)	qPCR (GC/mL)		JCPyV		NoV GII	
	HAdV Virus titer	Mean (SD)	Virus titer	Mean (SD)	Virus titer	Mean (SD)
26/09/2010	1.89 × 10 ³		3.61 × 10 ²		2.42 × 10 ¹	
27/09/2010	7.66 × 10 ²		6.27 × 10 ²		3.36 × 10 ¹	
13/10/2010	2.83 × 10 ³		8.34 × 10 ²		3.53 × 10 ¹	
14/10/2010	1.12 × 10 ³		2.45 × 10 ²		3.86 × 10 ¹	
03/11/2010	1.57 × 10 ³		8.37 × 10 ²		2.42 × 10 ¹	
04/11/2010	3.41 × 10 ³	1.62 × 10 ³	7.26 × 10 ²	5.70 × 10 ²	5.57 × 10 ¹	2.84 × 10 ¹
16/11/2010	9.86 × 10 ²	(8.47 × 10 ²)	2.67 × 10 ²	(4.07 × 10 ²)	8.56 × 10 ⁰	(2.27 × 10 ¹)
17/11/2010	2.05 × 10 ³		5.13 × 10 ²		7.98 × 10 ¹	
30/11/2010	1.72 × 10 ³		1.71 × 10 ²		2.58 × 10 ¹	
01/12/2010	1.50 × 10 ³		1.59 × 10 ²		5.33 × 10 ⁰	
15/12/2010	4.56 × 10 ²		1.61 × 10 ³		1.41 × 10 ⁰	
16/12/2010	1.15 × 10 ³		4.92 × 10 ²		8.02 × 10 ⁰	

qPCR: quantitative PCR; **HAdV**: human adenovirus; **JCPyV**: JC polyomavirus; **NoV GII**: norovirus genogroup II; **GC/mL**: genomic copies/milliliter; **SD**: standard deviation.

Capítulo IV

Evaluación de la contaminación viral en moluscos bivalvos de mercado y eficiencia de la eliminación vírica en procesos de depuración de moluscos

RESUMEN ESTUDIO 6:**Failure to remove viral contamination in molluscan shellfish applying current depuration treatments**

Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Calgua B, Carratala A, Maluquer de Motes C, Rusiñol M, Moresco V, Ramos AP, Martínez-Marza F, Calvo M, Barardi CRM, Bofill-Mas S, Girones R.

Sometido a *International Journal of Food Microbiology*. 2012

INTRODUCCIÓN

Diferentes virus pueden ser descritos en el tracto digestivo humano, pero únicamente unos pocos son reconocidos como importantes patógenos alimentarios. Norovirus y el virus de la hepatitis A son los principales patógenos víricos responsables de producir infecciones y enfermedades a través de la ruta de transmisión fecal-oral. Estudios epidemiológicos han estimado que NoV es responsable del 60% – 80% de todos los brotes infecciosos de gastroenteritis a nivel global, donde el consumo de marisco contaminado tiene un papel relevante. HAV también está relacionado con el consumo de marisco y es responsable de enfermedades graves con una gran morbilidad e incluso la muerte. La principal razón por la que los moluscos están íntimamente relacionados con la transmisión de NoV y HAV reside en el hecho de que son animales filtradores que crecen en ambientes donde resulta extremadamente difícil controlar los niveles de contaminación, además que habitualmente son consumidos crudos o insuficientemente cocinados.

En este trabajo se ha valorado la presencia de virus entéricos (NoV GGI, NoV GGII y HAV) en muestras de moluscos bivalvos (nacionales e importados) recolectadas a nivel de mercado durante los inviernos de 2004 – 2008 a través del Programa de Vigilancia de la Seguridad de los Alimentos en Cataluña (PVSAC). Además, muestras importadas de coquinas congeladas potencialmente vinculadas a un brote infeccioso de hepatitis A identificado en España en el 2008 fueron analizadas para describir su probable implicación.

Con el objetivo de averiguar como muestras de moluscos bivalvos que cumplen con las actuales regulaciones europeas son introducidos en la cadena alimentaria, se evaluó la eficiencia de eliminación de HAdV como indicador de contaminación fecal en tres instalaciones

de depuración de marisco donde se aplican tratamientos específicos (ozono, venturi y ozono-UV), pertenecientes a empresas productoras. Por último, un ensayo de inmufluorescencia indirecta previamente descrito para muestras ambientales se adaptó para evaluar la presencia de HAdV infecciosos en las muestras depuradas, comprobando así la presencia de patógenos viables en los productos listos para ser consumidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados globales muestran que un 12% (19/151) de los lotes de moluscos bivalvos recogidos en mercados durante 2004 – 2008 estaban contaminados con NoV GGII, mientras que NoV GGI y HAV no fueron detectados entre las muestras analizadas. No se observaron diferencias significativas en la presencia de NoV GGII entre muestras procedentes de zonas de cultivo nacionales e importadas europeas. Con la intención de evaluar la utilidad de HAdV como indicador de contaminación fecal, se examinó su presencia en un grupo de treinta muestras seleccionadas aleatoriamente, observándose un 43% de muestras positivas e identificándose diferencias significativas respecto las muestras positivas y negativas para NoV GGII. Tras estudiar la correlación de ambos virus entéricos mediante modelos de regresión logística, se observó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 74%. De acuerdo con la estadística descriptiva, sensibilidad y especificidad, HAdV cuantificado por qPCR puede ser utilizado como indicador de la contaminación vírica en moluscos bivalvos. Respecto el brote de hepatitis A, el 50% (5/10) de las muestras analizadas fueron positivas para HAV. Los análisis de secuenciación evidenciaron la presencia de subgenotipos IA y IB, típicamente detectados en Europa y Suramérica. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con una secuencia de HAV previamente descrita en agua residual procedente de la región donde tuvo lugar el brote, muestra que fue recogida durante el mismo periodo. Las diferencias observadas entre las secuencias estudiadas apoyan la teoría que las muestras fueron contaminadas de manera previa a la importación.

Las muestras procedentes de las empresas productoras de marisco cumplían con la actual legislación europea, basada en los niveles *E. coli*, tras la aplicación de los distintos tratamientos de depuración. Un 60% de las muestras fueron positivas para HAdV, mientras que NoV I y II no fueron detectados. Respecto la presencia de HAdV, no se observaron diferencias significativas antes y después de aplicar los tratamientos de depuración, al igual que no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos aplicados. La elevada presencia de HAdV en las muestras pre- y post-depuradas puede deberse al hecho que las

muestras enviadas a la depuradora procedían de zonas de cultivo tipo B, mientras que en el mercado se comercializan muestras tipo A y B. Por el otro lado, se esperaba la ausencia de NoV GGI y GGII debido a que las muestras fueron tomadas durante Mayo – Junio, época en la que no se reportan brotes infecciosos por este patógeno. Posteriores ensayos de infectividad mostraron la presencia de HAdV infecciosos tanto en las muestras pre- como post-depuradas. Aunque está constatado que la depuración en mariscos tiene un efecto importante en cuanto a la capacidad de reducir la presencia de bacterias, los datos obtenidos muestran que esta reducción no es equivalente para partículas víricas.

CONCLUSIONES

Este trabajo describe la presencia cualitativa y cuantitativa de virus entéricos en moluscos bivalvos recolectados en mercados y supermercados localizados en el noreste de España, y describe la detección y el genotipado de cepas de HAV relacionadas con un brote de hepatitis causado por coquinas importadas. Los resultados globales del estudio indican que la prevalencia y concentración de virus entéricos representa un reto para el sistema sanitario. Se sugiere que HAdV cuantificado por qPCR puede tener un papel importante como patógeno/indicador, y puede ser utilizado como indicador de la contaminación de origen fecal. Los actuales sistemas de depuración de moluscos no reducen la cantidad de HAdV y la aplicación de una IFA demuestra la presencia de virus infecciosos en moluscos bivalvos depurados. En definitiva, todos los datos obtenidos corroboran que los indicadores fecales bacterianos clásicos no reflejan la presencia de virus entéricos humanos, confirmando que moluscos bivalvos que cumplen con la actual normativa pueden estar contaminados con patógenos víricos tales como NoV.

FAILURE TO REMOVE VIRAL CONTAMINATION IN MOLLUSCAN SHELLFISH APPLYING CURRENT DEPURATION TREATMENTS

Jesus Rodriguez-Manzano^a, Ayalkibet Hundesa^a, Byron Calgua^a, Anna Carratala^a, Carlos Maluquer de Motes^{a,1}, Marta Rusiñol^a, Vanessa Moresco^b, Ana Paula Dolores Ramos^b, Fernando Martínez-Marca^c, Miquel Calvo^d, Celia Regina Monte Barardi^b, Sílvia Bofill-Mas^a, Rosina Girones^{a,*}

^aDepartment of Microbiology, Biology School, University of Barcelona, Spain

^bLaboratorio de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Brazil

^cHealth Protection Agency, Department of Health, Generalitat de Catalunya, Spain

^dDepartment of Statistics, Biology School, University of Barcelona, Spain

¹Present address: Department of Virology, Faculty of Medicine, Imperial College London, United Kingdom.

*Author for correspondence: Dr. Rosina Girones, Department of Microbiology, Biology School, University of Barcelona, Diagonal Ave., 643, 08028 Barcelona, Spain. Telephone number: 34-93-4021483. Fax number: 34-93-4039047. E-mail: rgirones@ub.edu

ABSTRACT

Human enteric viruses are frequently detected in shellfish, and constitute a potential source of food-borne diseases such as gastroenteritis and hepatitis. This report describes a large-scale survey of 151 shellfish batches (mussels and clams) to assess the presence of enteric viruses in national and imported European shellfish samples. The samples were collected in the winter seasons from 2004 to 2008 in a range of regional markets (Spain) through a surveillance system (Food Safety Plan of Catalonia). All batches were negative for hepatitis A virus (HAV) and norovirus genogroup I (NoV GGI), whereas 13% were positive for norovirus genogroup II (NoV GGII). Mussels appeared to be the most contaminated bivalves with 17% of positive samples, whereas only 4% of clams were positive for enteric viruses. Frozen imported coquina clams, presumably linked to a hepatitis A outbreak detected in East of Spain in 2008, were tested to analyze the likely implication of these samples resulting in the detection of five out of ten positives by nested PCR. To understand how positive shellfish complying with European Regulations were introduced into the market, the levels of viral contamination and the efficiency of decontamination in shellfish depuration plants that use up to 3 different treatments were evaluated. Therefore, human adenoviruses (HAdV) were used as a viral model and were evaluated in pre- and post-depurated samples. There were no statistically significant differences in the prevalence and quantification of HAdV in the tested samples. Furthermore, HAdV were evaluated as a fecal indicator and assessed the predictive values for other pathogens. Finally, a previously described indirect immunofluorescence assay developed to detect and quantify HAdV in environmental samples was applied in shellfish samples to detect infectious particles, demonstrating the presence of some infectious viruses in depurated mussels. The results indicated that current shellfish depuration systems to reduce bacterial indicators do not affect levels of viral contamination or provide any information about the presence of food-borne viral pathogens such as NoV and HAV. Future studies should focus on the evaluation of the risk associated with the consumption of these contaminated shellfish.

Keywords: food safety, norovirus, hepatitis A virus, human adenovirus, food-borne, shellfish.

1. INTRODUCTION

Various viruses can be found in the human digestive tract, but only a few are commonly

recognized as important food-borne pathogens. Norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) are the most common causes of illness through the fecal-oral route of transmission (Cliver, 1997; Craun et al., 2002; Koopmans and Duizer, 2004). Epidemiological studies have estimated NoVs to be responsible for 60–80% of all food-borne outbreaks of gastroenteritis worldwide (Koopmans et al., 2001; Reuter et al., 2005) and consumption of contaminated shellfish is known to be one of the main transmission routes for NoVs infection (Loisy et al., 2005). Hepatitis A is a worldwide disease that is also linked to shellfish consumption. It can cause serious debilitating illness and even death on occasions (Lees, 2000). The infection is endemic in countries with poor sanitation levels, where the majority of the population is exposed to HAV during childhood (Jacobsen and Wiersma, 2010). Shellfish consumption can lead to HAV and NoV outbreaks for two main reasons: shellfish can filter and concentrate pathogens; and it is difficult to check that the water in which they grow is free from contamination (U.S. FDA, 2011). Moreover, shellfish is frequently consumed raw or insufficiently cooked around the world, which increases the risk of viral infection (Murchie et al., 2005).

All European Union (EU) Member States are subjected to the requirements of the Shellfish Hygiene Directive, which sets out the need for purification or treatment before shellfish from Class B or C designated waters are put on the market. These standards rely exclusively on *E. coli* numbers that are routinely used to test for microbiological quality and to classify shellfish harvesting areas into 3 quality levels (A-C). Category A has less than 230 MPN/100g of flesh and intervalvular liquid (FIL); Category B has less than 4,600 MPN/100g FIL; and Category C has less than 46,000 MPN/100g FIL (EU, 2004a,b, 2008). Depuration is a natural process whereby shellfish are placed in clean water and allowed to purge themselves of contaminants. Many of the EU countries with large shellfish production facilities (Italy, Spain and France) have an increased emphasis on end product testing. Shellfish depuration is effective in removing many fecal bacterial contaminants from shellfish (Rodrick and Schneider, 2003; Corrêa et al., 2007). However, studies focused on enteric viruses, such as HAV, NoVs and human adenovirus (HAdV), have shown that it is difficult to remove viruses from contaminated shellfish (Muniain-Mujika et al., 2000; Formiga et al., 2002; Hernroth and Allard, 2007; Ueki et al., 2007; Corrêa et al., 2011). Besides, it is recognized that the main bacteriological parameters, such as *E. coli*, are not good indicators of residual viral levels after depuration, as viruses and bacteria have different rates of reduction (Jackson and Ogburn, 1999). Additionally, shellfish depuration methods are not consistently effective, or are ineffective, at removing some contaminants, such as naturally occurring marine vibrios, marine biotoxins or heavy metals and organic chemicals (Lee, 2008).

The high stability of viruses in the environment, the host-specificity and the high prevalence of some viral infections throughout the year in the world population strongly support the use of molecular techniques to identify and quantify specific viruses that can be used as indicators of fecal contamination and as microbial source tracking tools (Girones et al., 2010). Human adenoviruses are found in nearly 100% of urban sewage samples tested all around the world. HAdVs are also frequently detected in shellfish, including samples that meet current safety standards based on levels of fecal bacteria (Formiga-Cruz et al., 2002). Officials at the U.S. Environmental Protection Agency recently added HAdV to the list of potentially dangerous contaminants, a move that was based on their high prevalence in urban sewage, their ability to cause disease, and their resistance to water purification treatments, particularly those involving UV irradiation (Girones, 2006). HAdV have been proposed as a viral indicator of fecal contamination in water and shellfish (Pina et al., 1998; Formiga-Cruz et al., 2003).

In this study, a large-scale survey was carried out to assess the presence of enteric viruses in national and imported European shellfish samples. The samples were collected in winter from 2004 to 2008 in markets in Catalonia (NE Spain) through a surveillance system (Food Safety Plan of Catalonia). Frozen imported coquina clams presumably linked to a hepatitis A outbreak detected in East of Spain in 2008 were tested to analyze the likely implication of these products. To understand how positive shellfish complying with European Regulations were introduced into consumer markets, we analyzed the levels of viral contamination and the efficiency of decontamination in depuration plants that use up to 3 different treatments (ozone, the venturi system and ozone-UV). Furthermore, HAdV was evaluated as a fecal indicator and to assess predictive values for other pathogens. Finally, a previously described indirect immunofluorescence assay (IFA) developed to detect and quantify HAdV in environmental samples (river water and raw sewage) was applied in shellfish samples to detect infectious HAdV particles.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling

2.1.1. Samples from markets and grocery stores

A total of 151 molluscan shellfish samples of Mediterranean blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venus gallina* and *Chamelea gallina*) were collected in a range of

regional markets and grocery stores from September to February of 2004-2008, via a surveillance system (Food Safety Plan of Catalonia). Among the collected samples, (i) 87 batches of mussels and 30 batches of clams had been harvested in Spanish shellfish-growing areas (Autonomous Community of Galicia and Catalonia, NW and NE Spain, respectively), whereas (ii) 14 batches of mussels and 20 batches of clams had been imported and harvested in shellfish-growing areas of the EU (Italy, France and Portugal). Each batch consisted of 500-1,000 g of alive or frozen animals.

2.1.2. Samples potentially linked to an HAV outbreak

Ten batches of imported coquina clams (*Donax trunculus*) suspected to be linked to cases of an HAV outbreak reported in September 2008 in the East of Spain were analyzed. Each sample consisted of 500 g of frozen coquina clams in plastic packaging. The samples were kept frozen at -80°C until analyzed.

2.1.3. Samples collected in shellfish depuration plants

A set of 40 batches of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and 20 seawater samples (10-L each) used for shellfish depuration were collected in May-June 2010 from three shellfish depuration companies treating shellfish from an area classified as type B according to European Union Council Regulations (EU, 2004a, b, 2008). Each company used different treatments to disinfect the water used for depuration: ozone disinfection, a protein skimmer venturi system and ozone-UV light disinfection, respectively. Shellfish and seawater samples were collected before ($N = 20$ for shellfish; $N = 10$ for seawater) and after ($N = 20$ for shellfish; $N = 10$ for seawater) the application of these 24-hour depuration treatments. Shellfish samples collected before and after depuration were taken from the same batch so as to observe the reduction of microbiological contamination. The seawater used in the depuration is recircularized along the 24-h treatment. Shellfish and water samples were harvested in sterile polyethylene containers and kept at 4°C for less than 24 h until the virus particles were concentrated.

2.2. Viruses and cell lines

Fecal suspensions (10-fold dilution in PBS 1X) obtained from clinical fecal samples from gastroenteritis patients were used as positive controls for NoV GGI and GGII. Positive controls for the HAV analysis consisted of dilutions of FRhK-4 cell culture supernatant infected with the

pHM-175 strain. For the HAdV determination, HAdV2 isolated from a clinical sample was grown on A549 cells. An indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to determine HAdV infectivity on 293 cells. All the viral strains had been characterized by sequence analysis and all the viral suspensions were stored at -80°C until use.

2.3. Concentration of viruses from shellfish samples

Shellfish samples were processed by two virus concentration methods and the viral concentrates were stored at 4°C for less than 24 h prior to nucleic acid extraction.

In Method A, shellfish processing was performed as described previously by Pina et al. (1998). This method has been used in a range of previous studies (Formiga-Cruz et al., 2002, 2003; Muniain-Mujika et al., 2003). Briefly, the shellfish samples were washed, scrubbed under clean running water and opened with a sterile shucking knife. Thirty grams of hepatopancreas (HP) were dissected from the samples and collected into a sterile beaker diluted with glycine buffer 0.25 N at pH 10 (1:5, w/v). The mixture was homogenized by magnetic stirring. The treated homogenate was clarified by centrifugation at $2,170 \times g$ for 15 min at 4°C and the pH was neutralized (7 ± 0.2). The supernatant was centrifuged again at $39,800 \times g$ for 45 min at 4°C . To pellet all viral particles, the supernatant was ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4°C and the final pellet was resuspended in 200-400 μL of PBS with a maximum volume of viral concentrate of 500 μL .

In Method B, viral particles were concentrated from shellfish samples as described by Jothikumar et al. (2005b). Briefly, a minimum of six shellfish from each sample were aseptically opened, and the animals were removed from their shells. The peripheral flesh and organs of each animal were cut away from the HP, which was then finely chopped. To degrade the shellfish tissue and allow the release of virions into solution, an equal volume of a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K solution was added, and the sample was then incubated at 37°C for 1 h shaking at 320 rpm. Finally, the reaction mixture was incubated at 65°C for 15 min to inactivate the proteinase and the supernatant was collected by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 min.

Method A was used to process shellfish samples collected from markets and grocery stores, whereas Method B was used to isolate viral particles from mussels collected from commercial shellfish depuration companies. When the samples arrived at the laboratory alive, the HP was

excised from the animals and frozen until analyzed. When samples arrived frozen, the whole animals were kept frozen until analyzed. The recovery efficiencies of both methods were similar. In shellfish samples spiked with HAdV, recovery values of 20–30% were observed (data not shown).

2.4. Concentration of viruses from seawater samples

The protocol used to concentrate viruses has been described by Calgua et al. (2008). Briefly, the viruses were concentrated by the skimmed milk flocculation procedure. A volume of 100 mL of pre-flocculated skimmed milk solution (1% [w/v]) was added to each of the previously acidified (pH 3.5) 10-L seawater samples used for shellfish depuration. Samples were stirred for 8 h at room temperature and flocs were allowed to sediment by gravity for another 8 h. Supernatants were carefully removed and the final volume containing the sediment was transferred to a centrifuge pot and centrifuged at $7000 \times g$ for 30 min at 12 °C. The supernatant was carefully removed and the pellet resuspended in 10 mL of phosphate buffer.

2.5. Bacteriological analysis

The determination of *E. coli* was carried out on samples from depuration companies according to ISO 16649-3 (ISO, 2005), which uses the most probable number (MPN) procedure (Donovan et al., 1998) in Minerals Modified Glutamate Broth (Oxoid). Considering that samples from markets and grocery stores (from the surveillance program and potentially linked to an HAV outbreak) had health certificates for their sale in Spanish markets and importation to Spain, bacteriological analyses were not performed on these samples. It was assumed that all samples meet the health and hygiene requirements established in Regulations 853/2004, 854/2004 and 1021/2008 (EU, 2004a,b, 2008).

2.6. Nucleic acid extraction

In order to prevent inhibition in the PCR assays and the generation of false-negative results, two different nucleic acid (NA) extraction kits were evaluated following the manufacturer's instructions. Nucleic acids from viral concentrates were extracted using a QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and NucliSens® (Biomérieux, Boxtel, The Netherlands). Basically, both kits are based on the method of Boom et al. (1990) and they use guanidinium isothiocyanate to denature viral capsids and silica particles or membrane to bind viral nucleic

acids until their final elution.

2.7. Enzymatic amplification

The position, sequences, annealing temperature and length of primers and probes used in this study are presented in Table 1.

(i) Nested RT-PCR (nRT-PCR) and semi-nested RT-PCR (snRT-PCR). The amplification conditions of the nRT-PCR (HAV) and snRT-PCR (NoV GGI and II) methods used for qualitative detection have been described elsewhere (Pina et al., 1998; Vennema et al., 2002; Boxman et al., 2006). In brief, the reverse transcription step was performed on 10 µL of neat and 10-fold dilution of extracted RNA with gene-specific primers, a one-step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and 10 U of RNase inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 50 µL reaction mixture. The nRT-PCR and snRT-PCR were carried out with AmpliTaq™ Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

(ii) Quantitative PCR (qPCR) and quantitative RT-PCR (RT-qPCR). For the specific detection and quantification of HAdV and HAV genomes, 10 and 5 µL of neat, 10-fold and 100-fold dilutions of every extraction were tested, respectively. These dilutions were made to detect and reduce amplification inhibition due to the potential presence of interfering substances. For HAdV, amplification was performed in a 25 µL reaction mixture with PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 10 µL of a DNA sample or 10 µL of a quantified plasmid DNA, 1× TaqMan master mix, and the corresponding primers (900 nM) and probe (250 nM) (Hernroth et al., 2002), following the manufacturer's instructions and the annealing temperatures described in Table 1. A one-step RT-qPCR for HAV detection, which combined cDNA synthesis and PCR in a single reaction, was used. The RT-qPCR assays were carried out in 25 µL of a reaction mixture composed of 5 µL of extracted RNA and 20 µL of master mix. This master mix was made with a QIAGEN OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and contained 2.5 mM of MgCl₂, 250 nM of forward and reverse primers and 100 nM of TaqMan probe (Jothikumar et al., 2005a). The qPCR assays for HAdV and HAV were performed in a Stratagene® MX3000P sequence detector system (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

All samples were run in quadruplicate, and positive and negative controls were included in all

PCR assays. Known quantities of target DNA/RNA were added to a parallel amplification reaction containing the qPCR mix and the sample. In every assay, the amplification plots of samples and standard dilutions were compared. A sample was considered positive if it produced correct amplification curves and the quantitation data was within the detection limit. The amount of DNA/RNA was defined as the average of the duplicate data obtained.

2.8. qPCR standards

The pBR322 plasmid containing the complete hexon of HAdV 41 used in the construction of the standards for the HAdV qPCR assay was kindly donated by Dr. Annika Allard from the University of Umeå, Sweden. Dilutions from 10^{-1} to 10^7 GC/10 μ L of the standard were analyzed in triplicate.

For HAV, standard curves were generated by transforming *E. coli* JM109 cells (Promega, Madison, WI, USA) with pGEM-T Easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA) containing a 412 bp sequence of the HAV 5'-untranslated region (5'UTR). Serial dilutions from 5×10^{-1} to 5×10^7 viral DNA molecules per 5 μ L of TE buffer were analyzed in triplicate.

2.9. Sequencing and analysis of viral genomes

Amplicons obtained by nested PCR assays were purified using a QIAquick purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Both strands of the purified DNA amplicons were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Products were checked by the University of Barcelona's Scientific and Technical Services using an ABI PRISM 377 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were compared with the nucleotide sequences present in the GenBank using the BLAST program of the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), aligned using the Clustal X 1.8 program. Phylogenetic tree reconstructions for HAV were performed with Mega 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>). Evolutionary distances were determined by the Kimura two-parameter equation and the tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) algorithm.

2.10. Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database under accession numbers AYXXXXX to AYXXXXX (HAV).

2.11. Indirect immunofluorescence assay

An IFA previously described by Calgua et al. (2011) for the detection of HAdV in environmental samples was applied in the present study to detect and quantify infectious HAdVs in post-depurated mussels from shellfish companies. For this purpose, 760 μL of a 293 cell suspension (5.00×10^5 cell/mL, suspension prepared in growth medium) was added to each well of a Lab-Tek 8-well chamber slide (Nagle Nunc International, Naperville, IL). Once we had concentrated the viral particles present in the shellfish using Method B (Jothikumar et al., 2005b), the viruses present in 2 mL of the final resuspended pellet containing approximately 1.3 g of HP were re-concentrated to 500 μL (PBS 1X) with an ultracentrifugation step (100,000 $\times g$ for 1 h at 4°C) and clarified with chloroform (1:2 v/v). Then, 140 μL containing different dilutions were added and mixed in each well. Cells were then incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Once cells were attached, the medium was removed carefully and 1 mL of fresh growth medium was added.

Infected cells were incubated for 8 days at 37°C in 5% CO₂. After this period, the medium was removed and the cells washed with cold PBS. Cells were fixed with ice-cold absolute methanol for 10 min and washed again with PBS for 5 min. Monolayers were incubated for 1 h at 37°C with blocking solution (BS), which contained PBS with 1% of BSA (w/v) and 0.05% of Tween (v/v). They were then stained for 1 h at 37°C with their corresponding primary antibody, previously diluted in BS (100 or 240 μL for 8- or 4-well chambers, respectively). The antibody solution was removed and cells were washed for 15 min at 37°C with BS. Cells were then stained for 15 min at RT with a 1:100 (v/v) dilution of goat anti-mouse IgG-FITC (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) in BS. Cells were finally washed with BS for 15 min at 37°C and mounted on chambers to which UltraCruz™ mounting medium was added (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Epifluorescence microscopy with UV light was used for the visualization.

2.12. Comparison of nucleic acid extraction methods

Two extraction methods were compared using shellfish samples that were naturally contaminated with HAdV. The QIAamp[®] Viral RNA Mini kit provided a higher number of positive samples than the NucliSens[®] kit. No significant differences in the quantification of HAdV among positive samples were observed (data not shown). For these reasons, the QIAamp[®] Viral RNA Mini kit was the method selected for all the NA extractions in this study.

2.13. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using R software version 2.14.1 (Verzani, 2004; <http://www.R-project.org>). We used a two-sided Fisher's exact test to study the association between mussels and clams, national and imported European shellfish, and HAdV detected by qPCR and NoV II by snRT-PCR. The potential utility of quantitative HAdV data as a predictor of positive NoV II shellfish samples was evaluated with a logistic regression model. The sensitivity and specificity of this model in predicting the presence of NoV II was calculated. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to evaluate the statistical significance between pre- and post-depurated shellfish samples and seawater present during collection time. Results were considered to be significant with a *P* of <0.05 and values less than the detection limit were considered as zero.

3. RESULTS

3.1. Viruses in shellfish from markets and grocery stores, winter seasons of 2004-2008

To determine whether viral food-borne pathogens such as HAV and NoV circulate in shellfish sold in Spain, the presence of these viruses in shellfish collected from Spanish markets during the 2004-2008 winter seasons was studied. The virological analysis performed by RT-PCR amplification of a region of the RNA-dependent RNA polymerase (237 bp) of NoV and the 5' untranslated region (291 bp) of HAV showed that, respectively, NoV GGI and HAV were not detected in any national or imported European sample analyzed, whereas NoV GGII was detected in 16 out of 117 (13.7%) national samples and in 3 out of 34 (8.8%) imported European samples (Table 2). From the total of 101 mussel samples (87 from national harvesting areas and 14 from other European harvesting areas), 17 samples (16.8%) were positive for NoV GGII by snRT-PCR, whereas only 2 out of the 50 (4.0%) clam samples (*Venus*

gallina and *Chamelea gallina*) were positive for NoV GGII. The distribution by year of NoV GGII-negative and -positive shellfish samples is represented in Fig. 1. The statistical analysis showed no significant differences in NoV GGII presence between national and imported European samples (Fisher exact test, $P = 0.567$). Conversely, the prevalence of NoV GGII in mussels was higher than in clams and statistically significant (Fisher exact test, $P = 0.035$). Thirteen selected positive NoV GGII samples were sequenced, showing similarity percentages ranging from 83% to 100%.

In addition to HAV and NoV, HAdV was analyzed by qPCR in 30 shellfish samples (24 mussel and 6 clam samples) out of the total collected ($N = 151$). Ten of the selected samples were positive and 20 were negative for NoV GGII. Both groups were randomly selected. The overall results show that 13 samples were positive for HAdV (43.3%) by qPCR and the mean concentration was 3.51×10^2 GC/g (SD: 1.23×10^3 GC/g) of the HP tested. Eight (80.0%) of the 10 NoV GGII-positives samples were positive for HAdV, with a mean value of 9.98×10^2 (SD: 2.05×10^3) GC/g HP. In contrast, only 5 out of the 20 NoV GGII-negative (25%) samples were positive for HAdV, showing a mean concentration of 2.78×10^1 (SD = 6.63×10^1) GC/g HP. Overall, the presence of HAdV among NoV GGII-positive samples determined by qPCR showed a significant association (Fisher exact test, $P = 0.007$). To ensure at least 80% sensitivity, a predicted probability cutpoint of 0.5 was required (if the predicted probability of HAdV presence was ≥ 0.5 , the shellfish was classified as NoV II positive, but if the predicted probability was < 0.5 , the shellfish was classified as negative). This cutpoint resulted in a sensitivity of 100% and a specificity of 74%.

3.2. Analysis of shellfish potentially linked to an HAV outbreak in September 2008

HAV RNA was detected by nested RT-PCR with primers of 5'UTR in 50% (5 out of 10) of the frozen coquina clam samples potentially linked to hepatitis A cases. One of the HAV-positive coquina samples was also positive by qPCR, with an estimated concentration of 4.6×10^2 GC/g HP. Three out of five positive HAV samples detected by amplification of 5'UTR (291 bp) were sequenced. The sequences of the detected HAV were compared with sequences described in previous studies (Pina et al., 2001; Rodriguez-Manzano et al., 2010) and those available in databases. The strains detected from clams belonged to subgenotype IA (clams B and C) and IB (clam A). The identified sequences are represented in Fig. 2. The HAV sequence from clam A was most closely related to Clam C with an identity of 99.6%, and was 96.0% similar to clam B.

HAV from clam B shared 95.1% nucleotide identity with clam C. We had previously identified one HAV-positive sample out of 41 sewage samples collected from the same area during 2007-2008 (Rodríguez-Manzano et al., 2010). A pairwise comparison between the three sequences and this sewage sequence revealed that there were differences among the 226 bp of 5'UTR. HAV from the sewage sample was most closely related to clam C (98.2%), followed by clam A (96.5%) and clam B (96.0%). This diversity suggests that HAV sequences from the shellfish outbreak had different origins to the HAV strains detected in the sewage.

3.3. Study of the effectiveness of shellfish depuration

Shellfish marketed in the EU needs to comply with strict European regulations on microbiological safety. This is usually achieved in shellfish classified as B category by using shellfish depuration treatments. To understand how depuration treatments affect viral load in shellfish, a study on the effectiveness of shellfish depuration in samples collected from 3 different depuration plants from May to June 2010 was performed. HAdV was used as the model for this study. The presence and concentration of HAdV was evaluated in a) mussels before the depuration treatment (non-depurated mussels); b) mussels from the same batch that were already depurated (depurated mussels); c) seawater used for shellfish depuration, and d) seawater after shellfish depuration. The presence and quantitation of HAdV in mussels and seawater (pre- and post-depuration) detected by qPCR are reported in Table 3. HAdV was detected by qPCR in 14 (70%) non-depurated samples and 12 (60%) depurated shellfish batches, showing mean concentration values of 1.07×10^2 (SD = 1.22×10^2) GC/g HP and 1.14×10^2 (SD = 2.35×10^2) GC/g HP, respectively. Five out of 12 (42%) seawater samples used for depuration and 6 out of 12 (50%) after depuration were positive for HAdV, with mean values of 6.45×10^2 (SD = 1.80×10^3) GC/L and 5.99×10^2 (SD = 1.10×10^3) GC/L, respectively. Taken together, the results indicated no reduction in HAdV levels due to depuration treatments. Overall, no statistically significant differences in the pre- and post-treatment application (Kruskal-Wallis test, $P = 0.849$) were found, either between pre- and post-depurated seawater (Kruskal-Wallis test, $P = 0.580$) or mussels (Kruskal-Wallis test, $P = 0.821$). The samples were negative for NoV GGI and GGII in all pre- and post-depurated samples.

3.4. Indirect immunofluorescence assay (IFA)

Although the qPCR analysis provided clear quantitative data, it gave no indication of the infectivity of the contaminating virus. To address this, a previously developed

immunofluorescence protocol (Calgua et al., 2011) was adapted. Two depurated shellfish samples from each depuration treatment were selected. The concentrates were cleared with chloroform and dilutions (1:10, 1:2 and undiluted) were used to infect 293 cells, followed by staining with an HAdV-specific antibody (Fig. 3). Three out of 6 (50%) analyzed samples were HAdV-positive by IFA and this was quantified as 2.10×10^0 (SD = 1.00×10^0) FFU/g HP. The 6 selected samples had been previously evaluated by HAdV qPCR and contained a mean of 3.18×10^2 GC/g HP (SD = 3.63×10^2 GC/g HP). As described previously in water matrixes (Calgua et al., 2011), we observed a $2 \log_{10}$ reduction in the numbers of infectious viruses (FFU/g HP) compared with the number of genome copies detected by qPCR (GC/g HP) (Table 4). Despite the low concentration level of HAdV detected in the IFA assay, an inhibition effect was not observed.

3.5. *E. coli* determination in shellfish

The presence of *E. coli* in shellfish from depuration plants was quantified among post-depurated samples from the three applied treatments. The results demonstrate that all batches had *E. coli* counts below the upper limit, ranging from <20 MPN/g to 220 MPN/g and complying with EU regulations (EU, 2004a,b, 2008).

4. DISCUSSION

Enteric viral disease outbreaks linked to the consumption of contaminated bivalve shellfish have been reported in the scientific literature from many countries and the presence of pathogens combined with an absence of fecal indicators is currently a major concern (Cliver, 1997; Lees, 2000). This study describes the dispersal of viral contaminants in shellfish in the Spanish markets, defining the abundance of NoVs as contaminants in mussels and clams, the absence of HAV in the common market and the presence in imported samples from endemic areas with contamination of HAV. The results support the previously described limitations in some shellfish depuration systems for the removal of viruses, using HAdV as an indicator of fecal contamination.

No statistically significant differences among national and imported European samples collected in winter from Spanish markets have been found in this study ($P > 0.05$). Conversely, the prevalence of NoV GGII was significantly higher in the analyzed mussel samples (16.8%)

than in the tested clams (4.0%) ($P < 0.05$). Although global epidemiological data suggests that oysters, followed by clams and mussels, are the most common route of infectious outbreaks associated with bivalve molluscan shellfish (Potasman et al., 2002), mussels appear to be the most contaminated bivalves in this study. This is in agreement with another study performed in Europe (Gabrieli et al., 2007). The overall results show that 19 out of 151 (12.6%) shellfish samples were positive for NoV GGII, whereas NoV GGI and HAV were not detected in any sample. The absence of HAV and NoV GGI was expected, as most developed countries in Europe are non-endemic areas for HAV (Beth, 2002) and GGII strains predominate worldwide in fecal samples (Myrmel et al., 2004). The reduction of HAV in Spanish urban sewage in recent years was described in Rodriguez-Manzano et al. (2010) and was related to the improvement of sanitation systems. However, sporadic outbreaks are detected in relation to imported food from endemic countries.

In September 2008, the Health Department of the Autonomous Community of Valencia (NE Spain) reported the occurrence of a hepatitis A outbreak and its possible association with imported frozen cockles from Peru (www.aesan.msc.es). A rapid alert system for food-borne outbreaks (www.gencat.cat), together with the National Epidemiological Surveillance Network (BOE, 1996), quickly reported the existence of the outbreak. In this outbreak, 25 people developed hepatitis A after the consumption of raw cockles (*Donax* spp.). A similar hepatitis A outbreak associated with the same vector had been previously reported (Sánchez et al., 2002). This suggests that imported shellfish are a source of hepatitis A outbreaks in developed countries. The samples complied with required health controls and were suitable for human consumption.

Five out of 10 analyzed clam samples likely to be linked to HAV infected people were positive when analyzed by nRT-PCR. The analysis of the 5'UTR demonstrated the presence of subgenotypes IA and IB, which are typically detected in Europe and South America (Cristina and Costa-Mattioli, 2007). However, because of the low concentration of viruses, only 3 out of 5 positive samples could be sequenced. Genetic characterization of established HAV genotypes has focused traditionally on the VP1 amino terminus or the VP1/P2A junction region, for which a reference database of sequences is available (Ching et al., 2002). In this study, it was not possible to obtain a complete sequence from these genomic regions, probably because the concentration of viruses present in the samples was bordering the detection limit of the applied techniques. The phylogenetic analysis was performed on the basis of 5'UTR, a region that proved useful for HAV characterization in a previous study (Pina et al., 2001). The

comparison of the three identified sequences from HAV-contaminated clams, with the sequence previously obtained from sewage in the area where the outbreak was detected, reveals differences in the 5'UTR region. These data support the fact that the clams might have been contaminated prior to importation. The endemic origin of the samples (Beth, 2002) confirms that HAV strains are circulating worldwide and both IA and IB are related with sewage and shellfish in endemic areas (Pina et al., 2001). This is in agreement with dramatic reduction of HAV in Spain reported in recent years (Rodríguez-Manzano et al., 2010).

The prevalence of HAdVs was generally associated with the presence of faecal contamination and risk of contamination by NoV and HAV (Pina et al., 1998, Muniain-Mujika et al., 2000). In the present study, in 30 shellfish samples collected at market level in winter from 2004 to 2008 (20 negative and 10 positive for NoV GGII), the estimated sensitivity and specificity of HAdV to predict the presence of NoV GGII was 100% and 74%, respectively. The percentage of positive samples for HAdV (43%) was similar to those obtained in previous studies employing molecular detection procedures (Muniain-Mujika et al., 2002; Formiga et al., 2003). HAdV concentration in the HP of shellfish samples ranged from 2.83×10^0 to 6.49×10^3 GC/g HP, with means of 2.78×10^1 and 9.98×10^2 GC/g HP for negative- and positive-NoV GGII samples, respectively. The results showed significant differences in the presence and concentration of HAdV between negative- and positive-NoV GGII samples. According to descriptive statistics, sensitivity and specificity, HAdV quantified by qPCR may have a role as a pathogen/indicator, and may be used as an indicator of viral pollution in shellfish during the studied season.

Samples analyzed from commercial shellfish depuration companies comply with European Union Council Regulations after the application of three shellfish depuration treatments. The greater presence of HAdV in post-depurated shellfish (60%) than in samples from market and grocery stores (43%) may be due to the fact that depurated samples were collected in type B areas and samples from the market could also come from type A areas. However, the absence of NoV GGI and GGII was expected as samples were collected from May to June and many norovirus-associated outbreaks reported in the EU occur during the winter (Buesa et al., 2002; Potasman et al., 2002; Nygård et al., 2003; Siebenga et al., 2009). When the data were analyzed, no significant differences ($P > 0.05$) were observed in HAdV quantification between pre- and post-depuration processes at shellfish and seawater level. This indicates that depuration protocols do not reduce viral load. Conversely, depuration is known to affect bacterial levels in shellfish (Love et al., 2010). All depurated samples analyzed in this work

complied with EU microbiological safety legislation (based on *E. coli* levels) and thus were considered safe for consumption. The results indicate that current shellfish depuration systems to reduce bacterial indicators do not affect levels of viral contamination and are unable to inform about the presence of food-borne viral pathogens such as HAV and NoV. It also confirms previous studies showing that shellfish complying with EU regulations may be contaminated by viral pathogens such as NoVs (Lees, 2000; Formiga et al., 2002; Romalde et al., 2002; Muniain-Mujika et al., 2003). This study also proved the infectivity of viral pathogens detected in shellfish after three depuration treatments. Collectively, the presence of NoVs in mussels and clams, and the presence of HAV in clams associated with a hepatitis outbreak, reaffirm that classical bacterial indicators do not reveal viral contamination in shellfish and cannot be used alone for the evaluation of bivalve safety.

As demonstrated here and in previous studies (Bofill-Mas et al., 2006; Hundesa et al., 2009; Hundesa et al., 2010), qPCR is a useful tool to detect and quantify viruses in the environment as it provides sensitive and accurate results in a considerably short period of time. However, in some conditions, qPCR data may not correlate to the presence of infectious viral particles and thus infectivity assays are required. The results of the present study indicate that the described IFA is a suitable tool for obtaining infectivity data from environmental HAdVs. In this study, infectious HAdVs have been detected in depurated mussels. No direct quantitative correlation is expected between the concentration of HAdV and NoVs, since the excretion and infection patterns of both viruses are different. However, absence or a very low level of HAdV is an indication of low fecal contamination and it may be expected that the risk for pathogens such as HAV or NoV will also be very low.

In conclusion, this study reports qualitative and quantitative data on the presence of human enteric viruses in bivalve molluscan shellfish from markets and grocery stores located in the North East of Spain, and describes the detection and genotyping of HAV strains that are potentially linked to a hepatitis A outbreak caused by frozen imported coquina clams. The overall results of the study indicate that the prevalence and concentrations of enteric human pathogens in molluscan bivalve shellfish represents a challenge for the sanitation system. It suggests that HAdVs, quantified by qPCR, may have a role as a pathogen/indicator and may be used as an indicator of fecal pollution. The current depuration treatments do not reduce the amount of HAdV and the application of IFA demonstrates the presence of infectious viruses in depurated shellfish. The risk associated with the consumption of these contaminated shellfish must be evaluated using a risk assessment model, and this information will be essential to

develop improved guidelines for the microbiological quality of shellfish products.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the University of Barcelona's Scientific and Technical Services for sequencing the PCR products. The research described in the manuscript was supported by grants from the "Ministerio de Educación y Ciencia" of the Spanish Government (project AGL2008-05275-C03-01, AGL2011-30461-C02-01 and A/017172/08) and the European Commission Framework Program 7 project "Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VITAL)" (Grant No. KBBE 213178) led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, UK), Martin D'Agostino (FERA, UK) and Franco M. Ruggeri (ISS, Italy). The work was also possible for the support and cooperation of the Health Protection Agency, Health Department, Generalitat de Catalunya. Anna Carratalà was a fellow of the Spanish Ministry of Science. We are grateful to Dr. D. Furones from the Centre d'Aquicultura, Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries (IRTA), San Carles de la Ràpita, Spain, for assistance during the sampling in the Ebro River Delta area. C.R.M. Barardi has a fellowship from CNPq, V. Moresco and A.P. D.Ramos received support from AECID, Spain.

REFERENCES

- Beth, P. B.**, 2002. Global epidemiology of hepatitis A: implications for control strategies. 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R.**, 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7894–7896.
- Boletín Oficial del Estado**, 1996. Por la que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Madrid, Spain, Real Decreto 2210/1995, BOE 21, pp. 2153–2158.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., van der Noordaa, J.**, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495–503.
- Boxman, I. L., Tilburg, J. J., Te Loeke, N. A., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., Koopmans, M.**, 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 108, 391–396.
- Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Rodríguez Díaz, J., García Díaz, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., Bosch, A.**, 2002. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2854–2859.
- Calgua, B., Barardi, C. R., Bofill-Mas, S., Rodríguez-Manzano, J., Girones, R.**, 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods* 171, 1–7.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A.**,

- Wyn-Jones, A. P., López-Pila, J. M., Girones, R.,** 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods* 153, 79–83.
- Ching, K. Z., Nakano, T., Chapman, L. E., Demby, A., Robertson, B. H.,** 2002. Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *Journal of General Virology* 83, 53–60.
- Cliver, D. O.,** 1997. Virus transmission via food. *World Health Statistics Quarterly* 50, 90–101.
- Corrêa, A. A., Albarnaz, J. D., Moresco, V., Poli, C. R., Teixeira, A. L., Simões, C. M. O., Barardi, C. R. M.,** 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research* 63, 479–489.
- Corrêa, A. A., Rigotto, C., Moresco, V., Kleeman, C. R., Teixeira, A. L., Poli, C. R., Simões, C. M. O., Barardi, C. R. M.,** 2011. The depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, in press.
- Craun, G. F., Nwachuku, N., Calderon, R. L., Craun, M. F.,** 2002. Outbreaks in drinking-water systems, 1991-1998. *Journal of Environmental Health* 65, 16–23.
- Cristina, J., Costa-Mattioli, M.,** 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Research* 127, 151–157.
- Donovan, T.J., Gallacher, S., Andrews, N.J., Greenwood, M.H., Graham, J., Russell, J.E., Roberts, D., Lee, R.,** 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health* 1, 188–196.
- EU,** 2004a. Commission regulation (EC) No 853/2004 of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Communities L* 139, 22–82.
- EU,** 2004b. Commission regulation (EC) No 854/2004 of 29 April 2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities L* 139, 83–127.
- EU,** 2008. Commission regulation (EC) No 1021/2008 of 17 October 2008 amending Annexes I, II and III to Regulation (EC) No 854/2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption and Regulation (EC) No 2076/2005 as regards live bivalve molluscs, certain fishery products and staff assisting with official controls in slaughterhouses. *Official Journal L* 277, 15–17.
- Formiga-Cruz, M., Tofiño-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D. N., Henshilwood, K., Allard, A. K., Conden-Hansson, A. C., Hernroth, B. E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M. D., Girones, R.,** 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5990–5998.
- Formiga-Cruz, M., Allard, A. K., Conden-Hansson, A. C., Henshilwood, K., Hernroth, B. E., Jofre, J., Lees, D. N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R. E., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., Girones, R.,** 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1556–1563.
- Gabrieli, R., Macaluso, A., Lanni, L., Saccares, S., Di Giamberardino, F., Cencioni, B., Petrinca, A. R., Divizia, M.,** 2007. Enteric viruses in molluscan shellfish. *New Microbiologica* 30, 471–475.
- Girones, R.,** 2006. Tracking viruses that contaminate environment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 1, 19–25.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa A.A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S.,** 2010. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Research* 44, 4325–4339.

- Hernroth, B., Allard, A.**, 2007. The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). *International Journal of Food Microbiology* 113, 296–302.
- Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., Allard, A. K.**, 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4523–4533.
- Hundesá, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodríguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., Girones, R.**, 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *Journal of Virological Methods* 163, 385–389.
- Hundesá, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodríguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., Girones, R.**, 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *Journal of Virological Methods* 158, 130–135.
- ISO**, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. ISO 16649:2005. International Organisation for Standardisation, London.
- Jacobsen, K. H., Wiersma, S. T.**, 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 41, 6653–6657.
- Jackson, K. L., Ogburn, D. M.**, 1999. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. NSW Fisheries Final Report Series No. 13. FRDC Project No. 96/355, pp. 77.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Sobsey, M. D., Robertson, B. H.**, 2005a. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3359–3363.
- Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R., Vinjé, J.**, 2005b. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1870–1875.
- Koopmans, M., Vinjé, J., Duizer, E., de Wit, M., van Duynhoven, Y.**, 2001. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Novartis Foundation symposium* 238, 197–214.
- Koopmans, M., Duizer, E.**, 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23–41.
- Lee, R.**, 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO Fisheries Technical Paper No. 511*. FAO, Rome, Italy.
- Lees, D.**, 2000. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 59, 81–116.
- Loisy, F., Atmar, R. L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F. S.**, 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods* 123, 1–7.
- Love, D.C., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D.**, 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 211–217.
- Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F., Girones, R.**, 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 83, 75–85.
- Muniain-Mujika, I., Girones, R., Lucena, F.**, 2000. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *Journal of Virological Methods* 89, 109–118.
- Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Linton, M., Patterson, M. F., Smiddy, M., Kelly,**

- A. L.**, 2005. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 257–270.
- Myrmel, M., Berg, E. M., Rimstad, E., Grinde, B.**, 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2678–2684.
- Nygård, K., Torvén, M., Ancker, C., Knauth, S. B., Hedlund, K. O., Giesecke, J., Andersson, Y., Svensson, L.**, 2003. Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 9, 1548–1552.
- Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J., Girones, R.**, 2001. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology* 82, 2955–2963.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Cofre, J., Girones, R.**, 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3376–3382.
- Potasman, I., Paz, A., Odeh, M.**, 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases* 35, 921–928.
- Reuter, G., Krisztalovics, K., Vennema, H., Koopmans, M., Szucs, G.**, 2005. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks--emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *Journal of Medical Virology* 76, 598–607.
- Rodrick, G. E., Schneider, K. R.**, 2003. Molluscan shellfish depuration. In: Villaboa, A., Reguera, B., Romalde, J., Reis, R., *Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, Santiago de Compostela, Spain, 2002.
- Rodríguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardí, R., Girones, R.**, 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *Journal of Water and Health* 8, 346–354.
- Romalde, J. L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pintó, R. M., Barja, J. L., 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, 119–130.
- Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H., Bosch, A.**, 2002. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4148–4155.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.P., Vinjé, J., Lee, B.E., Pang, X.L., Ho, E.C., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N.B., Hewitt, J., Greening, G.E., Jin, M., Duan, Z.J., Lucero, Y., O’Ryan, M., Hoehne, M., Schreier, E., Ratcliff, R.M., White, P.A., Iritani, N., Reuter, G., Koopmans, M.**, 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *Journal of Infectious Diseases*. 200, 802–812.
- Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Amura, T.**, 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5698–5701.
- U.S. Food and Drug Administration**, 2011. Pathogens from the harvest area, Chapter 4, In: *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, pp. 75–90.
- Vennema, H., de Bruin, E., Koopmans, M.**, 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology* 25, 233–235.
- Verzani, J.**, 2004. *Using R for Introductory Statistics*. Chapman & Hall/CRC.

WEB REFERENCES

Health Department in the Autonomous Community of Valencia
http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/retirada_coquinas.shtml (last accessed

February 20th 2012).

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) <http://www.megasoftware.net/> (last accessed February 20th 2012).

National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (last accessed February 20th 2012).

R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, 2008. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org> (last accessed February 20th 2012).

Rapid alert system for food-borne outbreaks

<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3505/index.html>

(last accessed February 20th 2012).

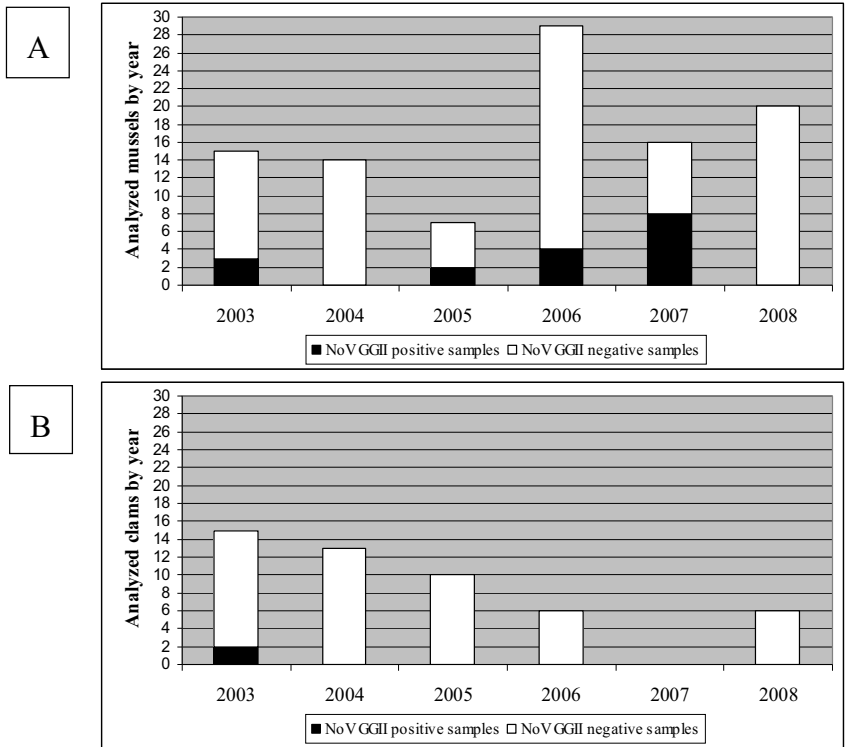


Fig. 1. Presence and absence of NoV GGII in mussel (A) and clam (B) batches collected in winter from markets and grocery stores (by year) detected by semi-nested RT-PCR.

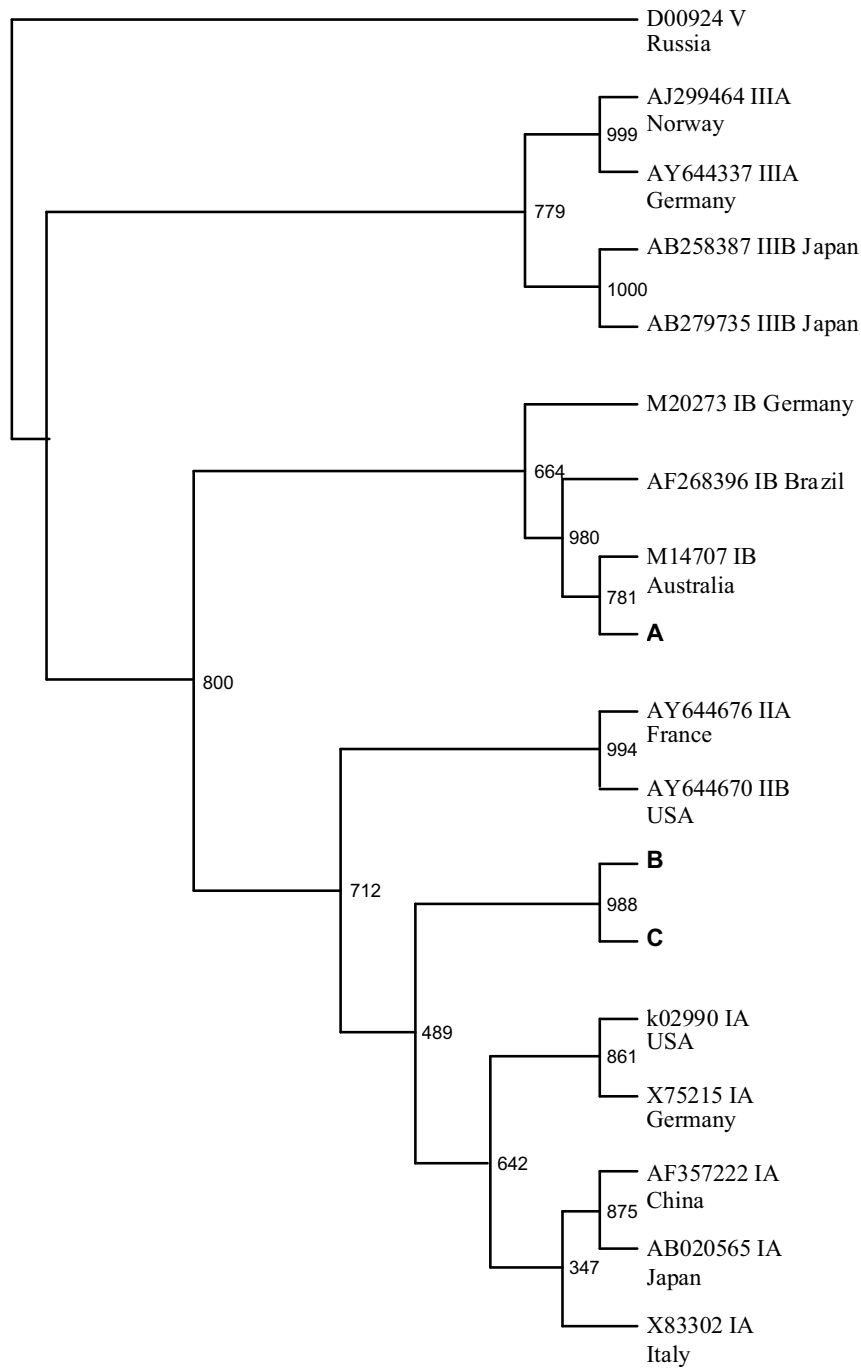


Fig. 2. Constructed phylogenetic tree based on 247 bp of 5'UTR (HAV) by the neighbour-joining method using D00924 (genotype V) as outgroup. **A:** positive clam subgenotype IB; **B:** positive clam subgenotype IA; **C:** positive clam subgenotype IA.

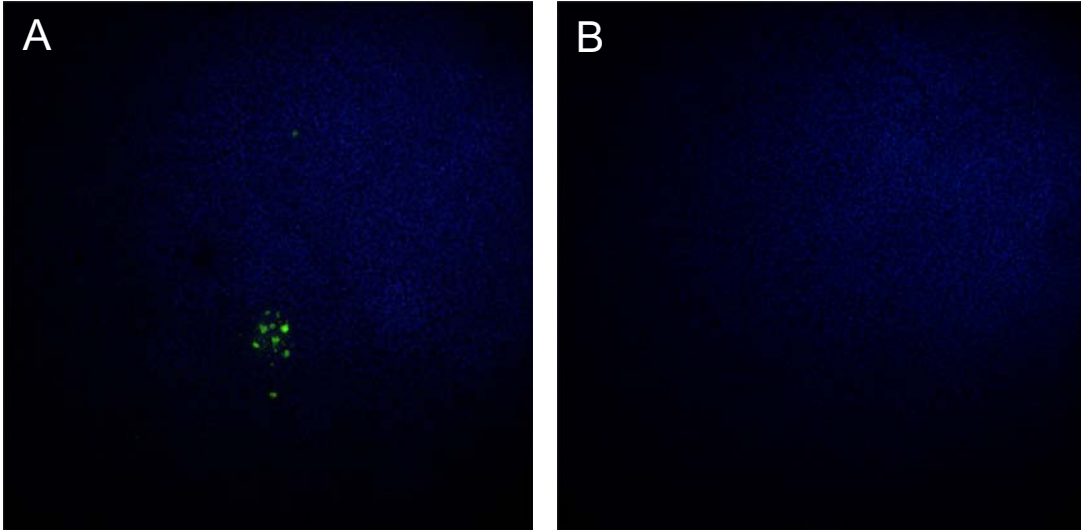


Fig. 3. Infected 293 cells with HadV isolated from the mussel HP by IFA. (A) 8th day of infection, individual infected cells are detected, (B) Negative control. Cells stained with anti-mouse-IgG/FITC and with mountain medium DAPI.

Table 1
Oligonucleotide primer sequences and additional information for enteric virus detection in shellfish samples

Primers *	Polarity	Position **	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Length
<i>HAV (5'UTR) by nested RT-PCR</i>					
HAV1	+	332-352	TTGGAACGTACCTTGGAGTG	55 °C	369 bp
HAV2	-	680-700	CTGAGTACCTCAGAGCAAAC		
neHAV1	+	371-391	ATCTCTTTGATCTTCCACAAG	55 °C	291 bp
neHAV2	-	641-661	GAACAGTCCAGCTGTCAATGG		
<i>Nov GGI (RdRp) by semi-nested RT-PCR</i>					
JV131	-	4858-4878	TCATCATCACCATAGAAIGAG	37 °C	327 bp
JV12Y	+	4552-4572	ATACCACTATGATGCAGAYTA		
G1	+	4691-4707	TCNGAAATGGATGTTGG	37 °C	188 bp
<i>Nov GGI (RdRp) by semi-nested RT-PCR</i>					
JV131	-	4585-4605	TCATCATCACCATAGAAIGAG	37 °C	327 bp
JV12Y	+	4279-4299	ATACCACTATGATGCAGAYTA		
Noroli-R	-	4495-4515	AGCCAGTGGCCGATGGAATTC	37 °C	237 bp
<i>HAdV (Hexon) by qPCR</i>					
ADF	+	18869-18887	CWTACATGCACATCKCSGG	60 °C	69 bp
ADR	-	18919-18937	CRCGGCRAAYTGCACCAAG		
ADP	+	18890-18917	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCT-BHQ1		
<i>HAV (5'UTR) by qRT-PCR</i>					
QHAFV	+	392-410	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	55 °C	89 bp
QHAVR	-	461-480	GCGGATATTGGTGAAGTTGTT		
QHAVP	+	413-441	6-FAM-CTTAGGCTAACTTCTATGAAGAGATGC-BHQ1		

*HAV (nested RT-PCR) primer sets were earlier published by Pina et al. (1998), Nov GI and GII by Boxman et al. (2006), HAdV by Herroth et al. (2002) and HAV (qRT-PCR) by Jothikumar et al. (2005a). **Primer positions are based on GenBank accession numbers: HAV (M14707), Nov GGI (M87661), Nov GGI (X86557) and HAdV (L19443). **5'UTR**: 5'untranslated region; **RdRp**: RNA-dependent RNA polymerase; **6-FAM**: 6-carboxyfluorescein; **BHQ1**: black hole quencher 1; **Mixed bases in the primers**: Y=C/T, N=A/T/C/G, R=A/G, W= A/T, K= G/T, S= C/G, I=inosine.

Table 2

Norovirus GII distribution in molluscan shellfish collected in winter from markets and grocery stores (2004-2008) detected by semi-nested RT-PCR

Shellfish species	National	Imported
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	15/87 (17.2%)	2/14 (14.3%)
<i>Venus gallina</i>	0/27 (0.0%)	0/8 (0.0%)
<i>Chamelea gallina</i>	1/3 (33.3%)	1/12 (8.3%)
Total	16/117 (13.7%)	3/34 (8.8%)

The results are expressed as positive samples/analyzed samples (percentage of positive samples).

Table 3
Presence and quantitation of HAdV in mussels and seawater from commercial shellfish companies as analyzed by qPCR

Sample	Treatment	Pre-depuration		Post-depuration	
		P/A (%)	Mean (SD)	P/A (%)	Mean (SD)
Mussels (GC/g HP)	T1	5/8 (62.5)	1.64 x 10 ² (1.65 x 10 ²)	5/8 (62.5)	1.93 x 10 ² (3.52 x 10 ²)
	T2	6/8 (75.0)	7.05 x 10 ¹ (7.24 x 10 ¹)	5/8 (62.5)	3.01 x 10 ¹ (3.56 x 10 ¹)
	T3	3/4 (75.0)	6.80 x 10 ¹ (6.33 x 10 ¹)	2/4 (50.0)	1.23 x 10 ² (1.48 x 10 ²)
Seawater (GC/L)	T1	2/4 (50.0)	1.50 x 10 ³ (2.92 x 10 ³)	3/4 (75.0)	1.98 x 10 ² (2.32 x 10 ²)
	T2	3/4 (75.0)	1.16 x 10 ² (1.27 x 10 ²)	3/4 (75.0)	1.30 x 10 ³ (1.58 x 10 ³)
	T3	0/4 (0.0)	–	0/4 (0.0)	–

T1: Ozone disinfection; **T2:** Protein skimmer venturi system; **T3:** Ozone-UV light disinfection; **GC/g HP:** Genomic copies/gram of hepatopancreas; **GC/L:** Genomic copies/liter; **P/A (%):** Positive samples/analyzed samples (percentage of positive samples); **SD:** Standard deviation.

Table 4

Application of IFA and qPCR for the detection of HAdV in post-depurated shellfish samples.

Treatment	qPCR HAdV (GC/g HP)	IFA HAdV (FFU/g HP)
T1	2.10×10^2	3.25×10^0
	7.60×10^1	ND
T2	1.04×10^3	1.40×10^0
	8.90×10^1	ND
T3	2.99×10^2	1.65×10^0
	1.94×10^2	ND

GC/g HP: Genomic copies/gram of hepatopancreas; **FFU/g HP:** Focus-forming units/gram of hepatopancreas; **T1:** Ozone disinfection; **T2:** Protein skimmer venturi system; **T3:** Ozone-UV light disinfection; **ND:** not detected.

Capítulo V

**Desarrollo de un modelo matemático
para la valoración cuantitativa del
riesgo de infección y enfermedad por
norovirus asociado al consumo
de marisco**

RESUMEN ESTUDIO 7:**Quantitative risk assessment for human norovirus infection due to oyster consumption**

Rodriguez-Manzano J, Bouwknecht M, van den Berg HH, Teunis PF, de Roda Husman AM

Manuscrito preparado para su sumisión a *Risk Analysis*. 2012

INTRODUCCIÓN

Infecciones producidas por NoV humanos se han atribuido recurrentemente al consumo de moluscos bivalvos. Las ostras son contaminadas por partículas víricas a causa de la filtración de agua contaminada, de manera que retienen dichas partículas incluso después de la aplicación de procesos de depuración. Aproximadamente un 5% de las ostras cultivadas en Holanda presentan contaminación por NoV humanos, incluso aquellas que cumplen con la vigente legislación europea. Actualmente se desconoce la magnitud del impacto que estas infecciones por NoV tienen a nivel de salud pública, dificultándose así la interpretación de los datos obtenidos a partir de los programas establecidos para la detección de NoV en moluscos bivalvos, y más concretamente, en ostras.

Los análisis de riesgo microbiológico son un componente emergente dentro del ámbito de la microbiología y la seguridad alimentaria, y rápidamente están acumulando reconocimiento como la metodología más práctica para valorar el riesgo microbiológico asociado con productos alimenticios. Actualmente, los análisis de riesgo cuantitativo están siendo utilizados para establecer estándares, guías y recomendaciones acerca de la seguridad alimentaria y la salud del consumidor. La evaluación de riesgos es una herramienta útil para obtener información acerca de las probabilidades de infección, enfermedad y los potenciales puntos de intervención para su prevención. El objetivo del estudio aquí descrito consiste en la modelización matemática y aplicación del modelo desarrollado para evaluar el riesgo de infección y enfermedad por NoV asociado al consumo de ostras. Para lograr dicho objetivo y como modelo de estudio, se ha evaluado cuantitativamente la presencia de NoV en dos escenarios diferentes: (i) ostras cultivadas en áreas de producción tipo A localizadas en Holanda (2008) y (ii) un brote de gastroenteritis que tuvo lugar en un pequeño núcleo familiar holandés (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La exposición a NoV debido al consumo de ostras (D) depende de (i) número de NoV infecciosos en las ostras en el momento del consumo (C_{cons}) y (ii) número de ostras consumidas por persona (N) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D = C_{cons} \times N$$

Al mismo tiempo, C_{cons} depende de (i) número de NoV infecciosos por ostra en el momento de la recolección (C_{harv}), (ii) eliminación de NoV durante los procesos de depuración (S_{dep}), (iii) la tasa de inactivación decimal de NoV por día (δ), (iv) tiempo transcurrido entre la recolección y el consumo (t), (v) eficiencia de recuperación para NoV (R), (vi) límite de detección de la RT-qPCR (λ), y (vii) fracción de NoV infecciosos por ostra (ϕ) de acuerdo con la ecuación que sigue a continuación:

$$C_{cons} = C_{harv} \times S_{dep} \times 10^{\delta \times t} \times (1/R) \times \lambda \times \phi$$

La estimación de C_{cons} se obtuvo mediante una simulación de Monte Carlo (10.000 réplicas) a partir de una distribución gama aplicada al modelo matemático desarrollado.

Norovirus GGII fue detectado en un 6,3% (4/63) de las ostras recolectadas en el estuario de Oosterchelde (norte de Holanda), con una concentración estimada de 7 PDU/ostra, mientras que 33% (3/9) de las ostras procedentes del brote infeccioso fueron positivas, mostrando una concentración de 17 PDU/ostra. El tamaño promedio de ostras servidas en 25 restaurantes fue de 6 ostras por comensal, oscilando entre 5 y 12 ostras. El riesgo de infección asociado fue del 33%, variando entre un 8,4 – 49% en función del número de ostras consumida (1 – 20 unidades). La probabilidad de encontrar una ostra contaminada al consumir 6 ostras es del 29%. Para el escenario del brote infeccioso, el riesgo de infección tras ingerir 6 ostras se estimó en un 51%, oscilando entre un 47 – 54% en relación a una ingestión de 1 – 20 ostras, respectivamente. Las probabilidades de enfermedad asociadas a estas probabilidades de infección fueron calculadas a partir de la función de dosis-respuesta. Para las muestras del estuario, la probabilidad de enfermar tras ser infectado fue de un 11%, oscilando entre 0,7 – 27%. Para el brote, la probabilidad de enfermar se estimó en un 31%, oscilando entre 21 – 36%. Se realizaron análisis de sensibilidad para estimar el efecto que la recuperación de partículas víricas tiene sobre las probabilidades de infección y enfermedad calculadas.

CONCLUSIONES

El riesgo estimado de infección por NoV GGII al consumir seis ostras, el número promedio de unidades servidas en los restaurantes holandeses, es de un 33% para las ostras consumidas en el estuario de Oosterchelde y de un 51% para el escenario del brote que tuvo lugar dentro del núcleo familiar, mientras que el riesgo estimado de enfermedad tras ser infectado es de un 11% y 33%, respectivamente. A la hora de realizar el modelo de análisis de riesgo se han identificado importantes lagunas, tales como la eficiencia de recuperación, el límite de detención de la RT-qPCR y la variación en la concentración de NoV entre las diferentes áreas de producción de marisco (A – C). Disponer de dicha información resultará esencial para la realización de futuros análisis. Nuevos datos de la presencia de NoV obtenidos a partir de análisis de RT-qPCR pueden ser fácilmente implementados en el modelo aquí desarrollado, estimando así el riesgo asociado para salud pública en otros países/regiones.

QUANTITATIVE RISK ASSESSMENT FOR HUMAN NOROVIRUS INFECTION DUE TO OYSTER CONSUMPTION

Jesus Rodriguez-Manzano,^{1,2} Martijn Bouwknecht,^{2*} Harold H. J. L. van den Berg,² Peter Teunis,^{3,4} and Ana Maria de Roda Husman²

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

²Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology, Centre for Infectious Disease Control Netherlands, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands; ³Epidemiology and Surveillance Unit, Centre for Infectious Disease Control Netherlands, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands; ⁴Hubert Department of Global Health, Rollins School of Public Health, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America.

***Corresponding author.** Mailing address: Laboratory for Zoonoses and Environmental Microbiology, Centre for Infectious Disease Control, National Institute of Public Health and the Environment, P.O. Box 1, NL-3720 BA Bilthoven, The Netherlands. Phone: +31 302743272. Fax: +31 302744434. E-mail address: martijn.bouwknegt@rivm.nl (Martijn Bouwknecht).

Key words: norovirus, oysters, risk assessment, infection, illness

Running title: QMRA of noroviruses in oyster from harvesting area and outbreak

ABSTRACT

Human noroviruses (HuNoVs) currently belong to the most important human foodborne pathogens and HuNoV illness has been attributed to oyster consumption, but inference on public health risks is missing. A quantitative risk assessment model was developed to estimate the risks of infections and illness due to consumption of oysters. The model was fed with data on HuNoVs in oysters collected from harvesting areas and a family outbreak. Four out of 63 oysters (6%) were positive for HuNoV by real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) and a distribution of the HuNoV-concentration was constructed with a mean of 7 (95% interval: 0-77) PCR-detectable units (PDU) per oyster. Assuming the efficiency of recovery of HuNoV from oysters is 100%, and a negligible inactivation rate between the moment of harvest and consumption, the estimated probability of HuNoV infection and illness ranged from 0.08 to 0.50 and 0.01 to 0.27, respectively, for consuming 1 to 20 oysters. Additionally, nine oysters associated with a family outbreak were examined for HuNoVs, and four were positive (44%). A distribution of the HuNoV-concentration was constructed with a mean of 17 (95% interval: 4-45) PDU. The estimated probability of HuNoV infection and illness using these RT-qPCR data ranged from 0.47 to 0.54 and 0.21 to 0.36 per consumption event (1 to 20 oysters), respectively. The developed model could be used to set health targets for the contamination of shellfish with HuNoVs. Furthermore, RT-qPCR data from other batches of oysters can be implemented in the model to estimate the associated public health risks.

INTRODUCTION

Noroviruses (NoVs) are members of the Norwalk-like virus genera within the *Caliciviridae* family. The virus is 27 nm in diameter, non-enveloped and contains a positive sense, single-stranded RNA genome of 7.8 Kb to 8.3 Kb in length, excluding the polyA tract (16). Five genogroups (GI-GV) and 29 genotypes are distinguished, and human NoV (HuNoV) infections are known to be caused by genogroups GI, GII and GIV (41).

Human NoV, together with hepatitis A virus, are currently considered as two of the most important human foodborne pathogens with regard to the number of outbreaks and people affected in the Western world (7, 23). In the US, HuNoVs have been estimated to cause 23 million of human cases and 50,000 hospitalizations annually (32). In The Netherlands, HuNoVs were found to be the causative agent for 78% of 941 investigated gastroenteritis outbreaks in

the period 1994 - 2005 (42).

Human NoV infections have been attributed recurrently to the consumption of raw molluscan shellfish (2, 36). Oysters become virally contaminated by filtering faecally contaminated (*e.g.* by sewage discharge) water and thereby concentrating viruses (45). Oysters can retain those viruses throughout the depuration process (29). About 5% of oysters harvested in Japan and The Netherlands, and 10.5% of oysters imported into Hong Kong from 11 countries were found to contain HuNoVs (4, 6, 35). Furthermore, oysters that are considered safe to consume due to compliance with the European microbiological safety legislation (based on *Escherichia coli* levels) can be contaminated by HuNoVs and may cause infection in humans after consumption (27). The magnitude of adverse public health effects caused by the presence of HuNoVs in oysters is currently unknown. This ignorance hampers the meaningful interpretation of results from screening programs focused on the detection of HuNoVs in oysters.

Quantitative microbial risk analysis is an emerging component of the field of microbial food safety and it is rapidly accumulating recognition as the most practical method for assessing the risks associated with microbial contamination of foodstuffs (48). Quantitative risk assessment today is applied for establishing standards, guidelines and other recommendations regarding food safety and consumer health. Risk assessment is a valuable tool for yielding information about probabilities of infection and illness, and possible reduction thereof by intervention. Thus quantitative risk assessment models can support the health protection of shellfish consumers. The aim of the current study was to develop and apply such a model for norovirus infection and illness due to oyster consumption. To this end, oysters that were harvested in The Netherlands in 2008 were examined quantitatively for HuNoV and the data were used to predict the associated risk of infection and illness due to consumption.

MATERIAL AND METHODS

Oysters from Oosterschelde Estuary (screening). In 2008, a total of 63 Japanese oysters (*Crassostea gigas*) were collected by monthly sampling from a commercial harvesting area in the Oosterschelde Estuary, located in the southwest of The Netherlands. The oysters were tested individually for the presence of HuNoVs by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Oysters from household outbreak (outbreak case). Nine oysters from the same batch of

oysters that was associated with a small household outbreak of HuNoV in The Netherlands, in December 2004, were obtained at the same local store as a household member did. The oysters were tested individually by RT-qPCR. Two persons in a household of three became ill after consumption of six oysters. After an incubation period of 24 h, the woman experienced mostly nausea and vomiting, whereas the male patient had abdominal cramps and diarrhea. The child had not eaten any oysters and did not get ill (10).

Oyster processing. Oyster shells were opened manually using a sterile oyster knife. After opening, the oyster was transferred to a Petri dish. The digestive glands were chopped with a razor blade and transferred into a centrifuge tube. An equivalent volume of Proteinase K solution (30u/mg) (Roche Diagnostics Netherlands, Almere, The Netherlands) was added followed by incubation at 37°C for 60 min. A second Proteinase K incubation was carried out at 65°C for 15 min prior to centrifugation at 3,000 *g* for 5 min as described previously (21). From the supernatant, 500 µL was subjected to magnetic RNA extraction.

RNA extraction and HuNoV (GI and GII) RT-qPCR. RNA was extracted using NucliSens magnetic silica particles (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) according to the instructions of the manufacturer. Nucleic acids were recovered from the particles during a 5 minute incubation period at 60°C, using 50µL elution buffer (37). HuNoV GI RNA was tested using a RT-qPCR with the primers QNIF4 and NV1LCR, and probe NVGG1p (9, 42) and HuNoV GII RNA was detected using the primerset QNIF2/COG2R and probe QNIFS (22, 28). The detection of RNA was performed on neat RNA samples and 10-fold serially diluted RNA samples.

Virus. As a positive extraction control 100 µL of HuNoV GII.4, obtained from a fecal sample, was used. RNA was extracted from a 10% fecal suspension that tested positive up to the 10⁵ tenfold dilution using RT-qPCR.

Risk Assessment

The risks of infection (invasion by and multiplication of pathogenic microorganisms in a bodily part or tissue) and risk of illness (the condition of being sick) were assessed for two scenarios, the first being based on the HuNoV-concentration from the cross-sectional screening of oysters, and the second on data from a small family outbreak with two cases that occurred in 2004 in The Netherlands.

Exposure assessment. Exposure to HuNoV due to oyster consumption depends on (i) the number of infectious HuNoVs in the oysters at the time of consumption (C_{cons}) and (ii) the number of oysters consumed per person (N) according to equation (1):

$$D = C_{cons} \times N \quad (1)$$

The C_{cons} depends on (i) the number of infectious HuNoVs per oyster at the moment of harvest (C_{harv}), (ii) the removal of HuNoVs during depuration (s_{dep}), (iii) the decimal inactivation rate of HuNoVs per day (δ), (iv) the time period between harvest and consumption (t), (v) the efficiency of the recovery procedures for HuNoV (R), (vi) the detection limit of the RT-qPCR (λ), and (vii) the fraction of infectious HuNoVs per oyster (φ) as described by equation (2):

$$C_{cons} = \frac{C_{harv} \times s_{dep} \times 10^{-\delta \times t} \times \lambda \times \varphi}{R} \quad (2)$$

Estimates of C_{cons} were obtained by taking 10,000 Monte Carlo samples from a gamma distribution in the model using Mathematica 6 (Wolfram Inc.).

Estimation of HuNoV genome concentration at harvest (C_{harv}). The dichotomous outcome of the RT-qPCR (positive/negative) of each sample (neat and 10-fold diluted) was used to estimate by means of maximum likelihood the shape and scale parameter of a gamma distribution. This gamma distribution described the estimated concentration of HuNoVs in oysters. This approach uses the fundamental concepts of Most Probable Number (MPN) estimation, as described (49). One distribution was created for all oysters, meaning that each oyster was considered to be contaminated albeit the majority at very low levels. This assumption was valid to the authors, because each oyster is exposed to sewage discharge and therefore all the oysters are potentially contaminated in a similar manner. As HuNoV detection in oysters was done on only a small portion of the oyster, low-level contamination may be missed by chance (i.e., virus is present in the oyster, but by chance not in the examined portion).

Efficiency of the recovery methods (R). The recovery values for HuNoV detection in oysters are unknown. These values may be highly variable between oysters from the same location and between oysters from different locations and time periods. Therefore, the recovery value used in the baseline risk assessment was assumed to be 100%, and the effect of lower recoveries was evaluated as part of the sensitivity analysis.

Detection limit (λ). The sensitivity for the RT-qPCR used in the current study is unknown. Reported sensitivities for HuNoV detection in shellfish ranged from 1 up to 10^2 genomes per

gram of sample applying different protocols (24, 34, 47). To estimate the risk for HuNoV infection due to oyster consumption a detection limit of 1 PCR detectable unit (PDU) was used in the current study.

Removal by depuration (S_{dep}). All the oysters used in this study originated from an A-classified area according to European legislation (less than 230 *Escherichia coli* per 100 g of oyster meat and intravalvular liquid, and absence of *Salmonella* in 25 g of mollusc flesh). These oysters can be harvested and marketed directly for human consumption (1). Thus, depuration would not have been applied to the oysters obtained in the screening in the current study and therefore virus reduction by depuration was not considered further.

Inactivation rate of HuNoV (δ). The inability to grow NoV in cultured cells has hampered studies on the inactivation rate (12, 13). However, related caliciviruses, including murine norovirus (MNoV) and feline calicivirus (FCV) can be cultured (5, 50). Studies show an inactivation rate of FCV lower than 1 \log_{10} in two weeks in cell culture medium (12) and <1 \log_{10} reduction for MNoVs after 40 days of incubation in a stool suspension (25), both assays at 4°C. Assuming these rates also apply to HuNoVs, and considering oysters are stored at temperatures of 4°C to 7°C (as advised by Shellfish Control Authorities for a few days because of rapid marketing of harvested oysters), inactivation was assumed not to affect the HuNoV concentration between harvest and consumption.

Fraction of infectious HuNoV per oyster (φ). RT-qPCR detects both infectious and defective virus particles, with the infectious viruses being a fraction of all genomes detected. This fraction, however, is undetermined due to the inability to grow NoV in cell cultures and hampers translation of the number of detected genomes into the number of infectious NoV. However, the dose-response relation that was used to determine the infection risk is also based on RT-qPCR detected genomes (43). Accepting that the fraction of infectious HuNoVs among the HuNoVs PDU are comparable between the studies, which is likely considering the same detection procedure was used, the parameter φ was given the value of unity.

Consumption. The average number of oysters consumed per person in this study was assessed by doing a web survey of 25 menus from different restaurants in The Netherlands regarding the size of oyster servings. The web sites of the restaurants were found via Google. Moreover, previous studies have recorded average numbers of oysters consumed per serving or used

nominal serving sizes of 13.8 oysters, 110 g, 196 g and 240 g (approximately 8 to 10 oysters) (30). As part of the sensitivity analysis, the risk of infection was estimated for consumption of 1 to 20 oysters. Each oyster within a serving was randomly attributed a HuNoV-concentration from the distribution of C_{harv} .

Dose-response relation. Teunis et al. (43) described a dose response relation to estimate the probability of infection and the conditional probability of illness given infection. Both models were applied to the doses estimated in the current study.

The probability of infection per infectious HuNoV particle as a function of the dose can be written as (43):

$$f(D; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta; -D)$$

where D represents the number of viruses ingested during oyster consumption, parameters α and β characterize the infectivity and ${}_1F_1$ represents a confluent hypergeometric function (43).

The dose response relation for the conditional probability of illness in an infected subject was calculating using the next formula (43).

$$h(D | \eta, r) = 1 - (1 + \eta D)^{-r}$$

where η and r were described in a previous study (44).

RESULTS

HuNoVs in oysters. Human NoV GII RNA was detected in four of the 63 oyster samples (6.3%) from the Oosterschelde Estuary by RT-qPCR. Three samples tested positive in the neat RNA solution and negative in the 10-fold dilution. One sample tested positive in the neat and 10-fold diluted RNA solution. These data yielded an estimated average HuNoV concentration in oysters of 7 PDU per oyster (Median = 0; 95% interval: 0 – 77) (Figure 1).

Three out of the nine samples collected retrospectively after a household outbreak was observed tested positive for HuNoV GII RNA. All three oysters tested positive in the neat RNA only. These data yielded an estimated HuNoV concentration in oysters of 17 PDU per oyster (Median = 14; 95% interval: 4 – 45) (Figure 2).

Human NoV GI RNA was not detected in any analyzed oyster, from Oosterschelde Estuary neither household outbreak.

Public health implications. The public health risk estimates are summarized in Table 1. The average size of a serving in the 25 Dutch restaurants was six (range: 5 - 12). The average number of ingested HuNoV PDU for a serving of six oysters was 37 (median: 7, 95% interval: 0 - 252). The associated probability of infection was estimated to be 33% (95% interval: 0 - 74), ranging from 8.4% to 49% for the consumption of 1 - 20 oysters, respectively. The probability of eating a HuNoV-contaminated oyster in a serving of six equalled 29%. The probability of infection conditional on the presence of at least one HuNoV-contaminated oyster within the serving was estimated to be 45% (95% interval: 7 - 75).

For the outbreak scenario, the risk of infection due to the consumption of six oysters was estimated to be 51% (95% interval: 25 - 76). The risk of infection ranged from 47% to 54% for the consumption of either a single or 20 oysters from the batch, respectively. The risk of the two household members becoming infected after consuming six oysters from the respective batch was estimated to be 28%.

The probability of illness given infection was calculated from the estimated HuNoV dose using an illness dose response function (43). For the monitoring data, the probability of becoming ill when individuals are infected after consuming six oysters was 11% (95% interval: 0 - 50), ranging from 0.7% to 27% for the consumption of 1 - 20 oysters. For the outbreak data, the probability of illness upon infection was 31% (95% interval: 23 - 56), ranging from 21% to 36% for the consumption of 1 - 20 oysters (Figure 3 and 4). Comparison of the probabilities of infection between both scenarios is represented in Figure 5.

Sensitivity analysis. The effect of HuNoV recovery for the RNA extraction and HuNoV detection on the probability of infection due to oyster consumption was assessed by considering the ingestion of 6 oysters. The probability of infection varied from 37% (40% of recovery) to 33% (100% of recovery) for the monitoring data, and from 54% (40% of recovery) to 51% (100% of recovery) for the outbreak data.

DISCUSSION

Oysters can be contaminated by HuNoV and thereby pose a foodborne health risk to humans (6). Quantitative Microbial Risk Assessment can be a useful tool to estimate the infection risk from for instance HuNoV counts in oysters (17, 18). In the current study a quantitative risk

assessment model was developed. Cross sectional data on HuNoVs in oysters was obtained, as well as HuNoV counts in shellfish from the same batch of shellfish that was associated with a small ($n=2$) household outbreak.

The risk of infection due to the consumption of six oysters was estimated to be 33% based on the data from oysters harvested in the Oosterschelde Estuary. In the Netherlands, with 16.5 million inhabitants (40), Dutch food consumption survey showed that one individual among 6,270 individuals had consumed oysters on one of the two days of the survey (14). Assuming these two days are representative for an entire year, this finding would indicate a total of about 500,000 consumption events per year. Based on the risk of infection presented in this paper, about 150,000 HuNoV infections per year would be caused by oyster consumption. Of these, about 50,000 are estimated to become ill due to oyster consumption. Data from literature for 1996 to 1999 showed an incidence of around 128,000 gastroenteritis cases per year in the Netherlands (11). Considering that 5% of the total gastroenteritis are originated by HuNoVs (11), 12-17% are foodborne (8) and 12% of these cases are linked to oyster consumption (8), there would be around 90-130 cases of gastroenteritis per year due to oyster consumption in The Netherlands. The difference in outcomes between the two studies may be explained by failure of infected persons to seek medical attention, leading to an underestimate of number of ill persons.

Here, the infection risk was estimated from the ingested HuNoV dose. Heterogeneity among hosts with respect to susceptibility to HuNoV infections was taken into account, because of the probability of individual organism to achieve an infection was modeled as a beta distribution (43). However, genetic susceptibility and acquired immunity for HuNoV infection and illness were not taken into account. Although HuNoV is highly infectious, volunteer studies have shown that some subjects remain uninfected even after challenge with high doses (20, 31). Human ABH histo-blood group antigens and the secretor phenotype may influence susceptibility to HuNoV, although it is not clear whether these volunteers remain disease-free because of innate resistance or because of pre-existing immunity (26). The individuals that experienced a HuNoV-infection acquire short term immunity (51). Previous studies have shown that most raw oyster consumers were male, young or middle-aged adults, persons of high socioeconomic status, and persons from specific ethnic groups are more likely to eat raw oysters than others (3, 38). These considerations may affect the immune response against HuNoV infections of the consumers and therefore, the final risk estimation. If more data become available with respect to distribution of immunities in the population these could be

fed into the risk assessment.

The currently estimated risks based on the environmental survey used data from 63 oysters collected in the Oosterschelde. The HuNoV-findings for these oysters were assumed to represent the level of HuNoV-contamination of all oysters consumed in The Netherlands. However, different harvesting areas exist, likely with different influxes of sewage discharge (46) and thus with different probabilities of HuNoV contamination. Furthermore, oysters consumed by the Dutch population are partly imported and imported oysters were not part of the 63 oysters examined (10). If the variation between harvesting areas is greater than the variation within a single harvesting area, then the distribution of HuNoV concentrations is expected to show more variation. This would have increased the 95% uncertainty intervals of the infection and illness risks thus resulting in more uncertainty in the risk outcomes.

The assessed risks could be underestimated due to the assumption of a 100% recovery. In practice, such a recovery is unlikely to be achieved because viral contamination levels in shellfish are often relatively low and because shellfish contain compounds that interfere with RT-qPCR (33, 39). In addition, it was assumed that 1 PDU represents one infectious unit. However, because of cell culture methods are not available for quantifying infectious HuNoV, one PDU represents an unknown quantity of infectious units. These aspects likely resulted in underestimation of the HuNoV-contamination level of oysters reflected by the relatively low probability of 28% that both individuals in the outbreak setting were infected by HuNoV, and an even lower probability of both individuals becoming ill. Improved diagnostic methods and proper estimates for the recovery and detection limits for HuNoV from oysters could improve the accuracy and decrease the uncertainty of the estimated risks.

The total number of people infected as a result of consuming HuNoV contaminated oysters will likely be increased through secondary person to person transmission (19). When an initial infection occurs in a person eating oysters, secondary and tertiary waves of infection may occur due to interperson transmission. Hence, the total number of infected persons due to consumption of oysters may be larger than estimated in the current study. Such secondary transmission depends strongly on prevailing (hygiene) conditions (19). Consequently, decreasing the HuNoV contamination levels of oysters might have an impact also on individuals that do not consume oysters.

In a recent study (30), the correlation between the extent of HuNoV contamination in oysters and the consequential risk to human health was evaluated by comparing self-reported customer illness with counts of HuNoVs in consumed oysters. The presence of HuNoV PDU showed a statistically significant association with self-reported illness complaints, suggesting that absence of HuNoV RNA in oyster batches can be considered a reliable indicator of low health risk (30). Nevertheless, the current study showed that also when HuNoV PDU is detected, the infection risks will depend on the count of HuNoV and on the number of oysters consumed. Hence, doing quantitative risk estimation after HuNoV detection will give valuable information for the public health risks.

In conclusion, the estimated risk for HuNoV infection when consuming six oysters, the number served in Dutch restaurants was estimated to be 33% for oysters from Oosterschelde Estuary and 51% for oysters from the household outbreak. The associated risks of illness were 11% and 31% for each scenario, respectively. Important data gaps that were identified include the efficiency of recovery of HuNoVs, the detection limit of the RT-qPCR, and the variation in HuNoV concentration between different (national and international) harvesting areas and differently classified harvesting areas (A-C). Filling these data gaps would improve future risk assessments regarding HuNoV. The developed model could be used for setting health targets for contamination levels of shellfish with HuNoVs. Furthermore, RT-qPCR data from other batches of oysters can be easily implemented in the model to estimate the associated public health risks for other countries than The Netherlands.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Ministry of Education and Science of the Spanish Government (project AGL2005-07776-C03-02) and the “Grup de Recerca Consolidat de la Generalitat de Catalunya” (2005SGR00592). During the development of this study, Jesús Rodríguez Manzano received a pre-doctoral fellowship of Ministry of Education and Science.

REFERENCES

1. **Anonymous.** 1991. Council directive laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. 91/492/EEC. *Offic. J. Eur. Communities* **L268**:1–14.
2. **Ahmed, F. E.** 1992. Review: assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with micro-organisms parasites and natural toxins in the US. *International*

- Journal of Food Science Technology **27**:243–260.
3. **Altekruse, S. F., S. Yang, B. B. Timbo, and F. J. Angulo.** 1999. A multi-state survey of consumer food-handling and food-consumption practices. *Am. J. Prev. Med.* **16**:216–221.
 4. **Boxman, I. L., J. J. Tilburg, N. A. Te Loeke, H. Vennema, K. Jonker, E. de Boer, and M. Koopmans.** 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **108**:391–396.
 5. **Buckow, R., S. Isbarn, D. Knorr, V. Heinz, and A. Lehmacher.** 2008. Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1030–1038.
 6. **Cheng, P. K., D. K. Wong, T. W. Chung, and W. W. Lim.** 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J. Med. Virol.* **76**:593–597.
 7. **Cliver, D.O.** 1997. Virus transmission via food. *World Health Stat. Q.* **50**:90-101.
 8. **Codex Alimentarius Commission.** 2005. Discussion paper on the viruses in food. In Codex Committee on Food Hygiene, 37st session, Buenos Aires, Argentina.
 9. **da Silva, A. K., J. C. Le Saux, S. Parnaudeau, M. Pommepeuy, M. Elimelech, and F. S. Le Guyader.** 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7891–7897.
 10. **de Roda Husman, A. M., F. Lodder-Verschoor, H. H. van den Berg, F. S. Le Guyader, H. van Pelt, W. H. van der Poel, and S. A. Rutjes.** 2007. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. *J. Food Prot.* **70**:967–974.
 11. **de Wit, M. A., M. P. Koopmans, L. M. Kortbeek, N. J. van Leeuwen, A. I. Bartelds, and Y. T. van Duynhoven.** 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* **7**:82–91.
 12. **Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. De Groot, F. Twisk, and M. Koopmans.** 2004. Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4538–4543.
 13. **Duizer, E., K. J. Schwab, F. H. Neill, R. L. Atmar, M. P. Koopmans, and M. K. Estes.** 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* **85**:79–87.
 14. **Hulshof, K. F. A. M., C. Kistemaker, and M. Bouman.** 1998. [De consumptie van afzonderlijke producten door Nederlandse bevolkingsgroepen: Voedselconsumptiepeiling 1997–1998] in Dutch. Rep. V 98.812. TNO Voeding, Zeist, The Netherlands.
 15. **Fazil, A. M.** 2005. A primer on risk assessment modelling: focus on seafood products. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Fish. Tech. Pap.* **462**:1–55.
 16. **Green, K., R. Chanock, and A. Kapikian.** 2001. Human caliciviruses, p. 841-874. In D.M. Knipe & M.M. Howeley (ed.), *Fields virology*. 4th ed., vol.1. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
 17. **Haas, C. N.** 1983. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am. J. Epidemiol.* **118**:573–582.
 18. **Haas, C. N., J. B. Rose, C. Gerba, and S. Regli.** 1993. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal.* **13**:545–552.
 19. **Heijne, J. C., P. Teunis, G. Morroy, C. Wijkmans, S. Oostveen, E. Duizer, M. Kretzschmar, and J. Wallinga.** 2009. Enhanced hygiene measures and norovirus transmission during an outbreak. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:24–30.
 20. **Johnson, P. C., J. J. Mathewson, H. L. DuPont, and H. B. Greenberg.** 1990. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis.* **161**:18–21.
 21. **Jothikumar, N., J. A. Lowther, K. Henshilwood, D. N. Lees, V. R. Hill, and J. Vinjé.** 2005. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1870–1875.

22. Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1548–1557.
23. Koopmans, M., and E. Duizer. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* **90**:23–41.
24. Kou, X., Q. Wu, J. Zhang, and H. Fan. 2006. Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification. *J. Microbiol.* **44**:403–408.
25. Lee, J., K. Zoh, and G. Ko. 2008. Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2111–2117.
26. Lindesmith, L., C. Moe, S. Marionneau, N. Ruvoen, X. Jiang, L. Lindblad, P. Stewart, J. LePendu, and R. Baric. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* **9**:548–553.
27. Lodder-Verschoor, F., A. M. de Roda Husman, H. H. van den Berg, A. Stein, H. M. van Pelt-Heerschap, and W. H. van der Poel. 2005. Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. *J. Food Prot.* **68**:1853–1859.
28. Loisy, F., R. L. Atmar, P. Guillon, P. Le Cann, M. Pommepuy, and F. S. Le Guyader. 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods* **123**:1–7.
29. Loisy, F., R. L. Atmar, J. C. Le Saux, J. Cohen, M. P. Caprais, M. Pommepuy, and F. S. Le Guyader. 2005. Use of rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6049–6053.
30. Lowther, J. A., J. M. Avant, K. Gizynski, R. E. Rangdale, and D. N. Lees. 2010. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J. Food Prot.* **73**:305–311.
31. Matsui, S. M., and H. B. Greenberg. 2000. Immunity to calicivirus infection. *J. Infect. Dis.* **2**:331–335.
32. Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:607–625.
33. Mullendore, J. L., M. D. Sobsey, and Y. C. Shieh. 2001. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Methods* **94**:25–35.
34. Muniain-Mujika, I., M. Calvo, F. Lucena, and R. Girones. 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* **83**:75–85.
35. Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, and H. Kimura. 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.* **51**:177–184.
36. Potasman, I., A. Paz, and M. Odeh. 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* **35**:921–928.
37. Rutjes, S. A., R. Italiaander, H. H. van den Berg, W. J. Lodder, and A. M. de Roda Husman. 2005. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3734–3740.
38. Shapiro, R. L., S. Altekruze, L. Hutwagner, R. Bishop, R. Hammond, S. Wilson, B. Ray, S. Thompson, R. V. Tauxe, and P. M. Griffin. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *J. Infect. Dis.* **178**:752–759.
39. Shieh, Y., S. S. Monroe, R. L. Fankhauser, G. W. Langlois, W. Burkhardt, and R. S. Baric. 2000. Detection of norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.* **2**:360–366.
40. Statistics Netherlands. 2009. <http://www.cbs.nl/nl-NL/menu/home/default.htm>
41. Straub, T. M., K. Höner zu Bentrup, P. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A.

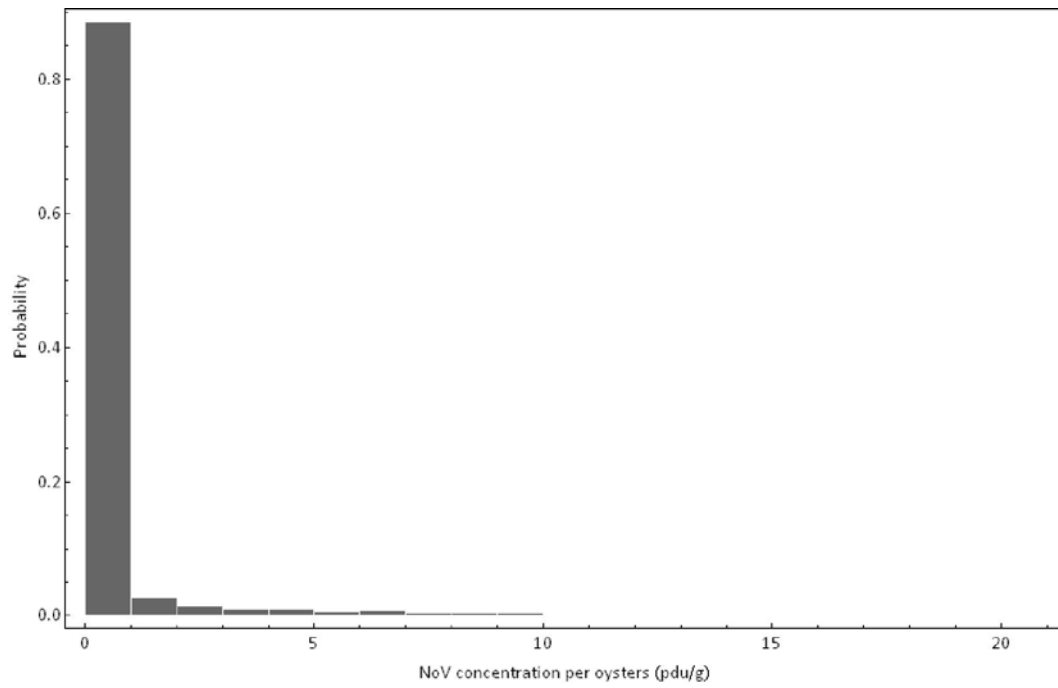
- Bartholomew, C. O. Valdez, C. J. Bruckner-Lea, C. P. Gerba, M. Abbaszadegan and C. A. Nickerson. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:396–403.
42. Svraka, S., E. Duizer, H. Vennema, E. de Bruin, B. van der Veer, B. Dorresteijn, and M. Koopmans. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1389–1394.
43. Teunis, P. F., C. L. Moe, P. Liu, S. E. Miller, L. Lindesmith, R. S. Baric, J. Le Pendu, and R. L. Calderon. 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol.* **8**:1468–1476.
44. Teunis, P. F., N. J. Nagelkerke, and C. N. Haas. 1999. Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk. Anal.* **19**:1251–1260.
45. U.S. Food and Drug Administration. 2001. Pathogens from the harvest area. *In* Fish and fisheries products hazards and controls guidance, 3rd ed. Food and Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, Washington, D.C. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm091606.htm>
46. van den Berg, H., W. Lodder, W. van der Poel, H. Vennema, and A. M. de Roda Husman. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res. Microbiol.* **156**:532–540.
47. Vinjé, J., H. Vennema, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, M. Hoehne, E. Schreier, A. Richards, J. Green, D. Brown, S. S. Beard, S. S. Monroe, E. de Bruin, L. Svensson, and M. P. Koopmans. 2003. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1423–1433.
48. Vose, D. J. 1998. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J. Food. Prot.* **61**:640–648.
49. Westrell, T., P. Teunis, H. van den Berg, W. Lodder, H. Ketelaars, T. A. Stenström, and A. M. de Roda Husman. 2006. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Res.* **40**:2613–2620.
50. Wobus, C. E., S. M. Karst, L. B. Thackray, K. O. Chang, S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, A. Krug, J. M. Mackenzie, K. Y. Green, and H. W. Virgin. 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* **2**:432.
51. Wyatt, R. G., R. Dolin, N. R. Blacklow, H. L. DuPont, R. F. Buscho, T. S. Thornhill, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1974. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J. Infect. Dis.* **129**:709–714.

TABLE 1. Daily risk of human norovirus infection and illness per number of oysters ingested.

		Number of ingested oysters			
		1	6	10	20
Scenario 1	$P_{infection}$	8.4% (0 - 67)	33% (0 - 74)	42% (0 - 75)	49% (13 - 75)
	$P_{illness}$	0.7% (0 - 36)	11% (0 - 50)	18% (0 - 53)	27% (1 - 56)
Scenario 2	$P_{infection}$	47% (12 - 75)	51% (25 - 76)	53% (27 - 76)	54% (30 - 76)
	$P_{illness}$	21% (14 - 46)	31% (23 - 56)	33% (26 - 58)	36% (29 - 61)

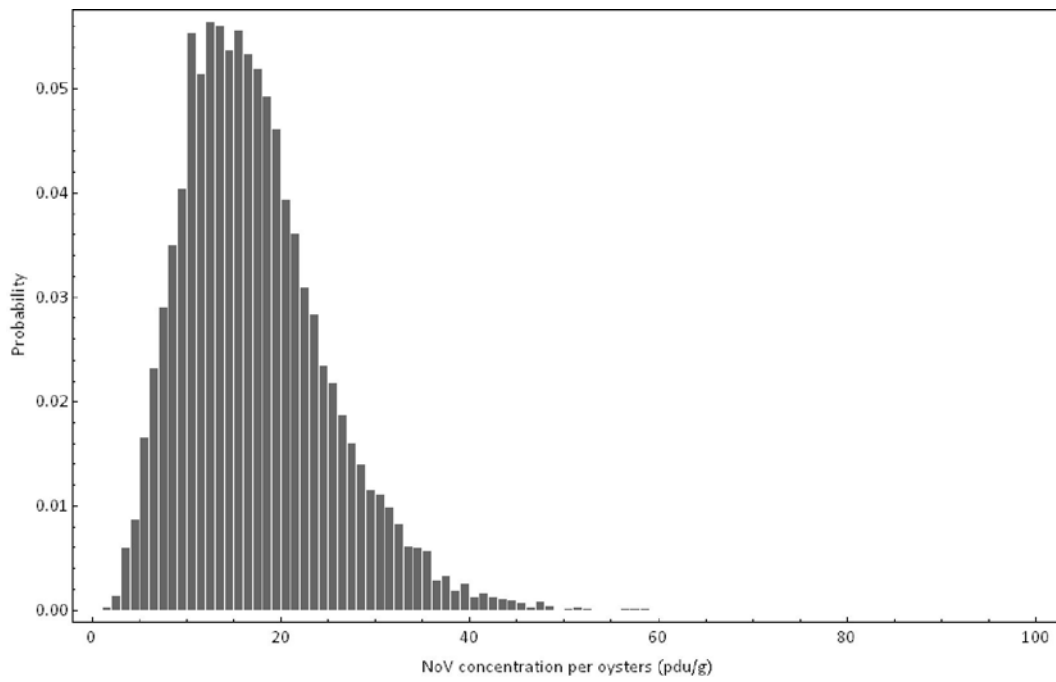
Scenario 1: screening data; Scenario 2: outbreak data. $P_{infection}$: Probability of infection; $P_{illness}$: Probability of illness. Ninety-five per cent confidence intervals are in parentheses.

FIG 1. Distribution of human norovirus PDU concentration per oyster in screening data.



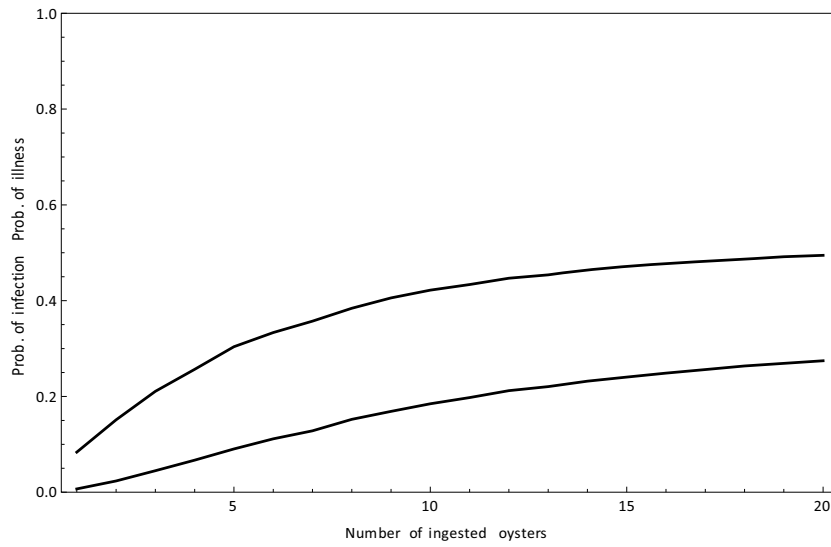
Gamma distribution was assumed for human norovirus concentration in oysters from Oosterschelde Estuary, The Netherlands.

FIG 2. Distribution of human norovirus PDU concentration per oyster in household outbreak case.



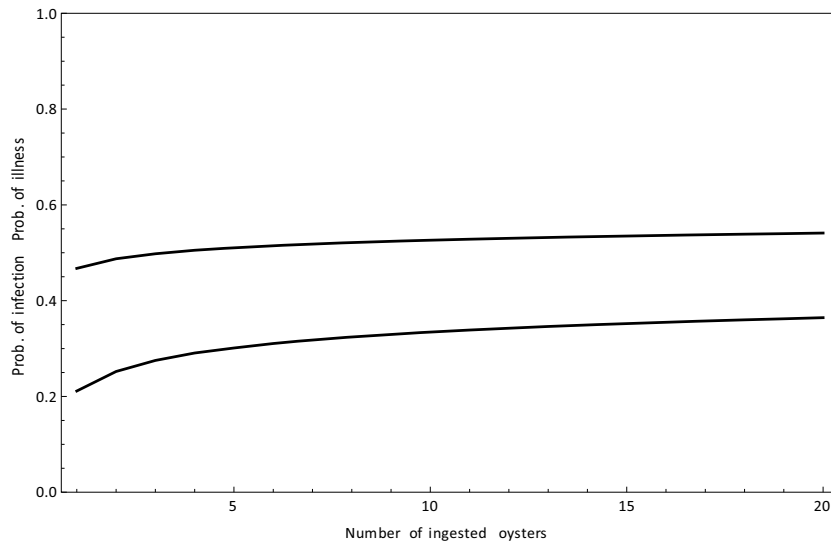
Log-normal distribution was assumed for human norovirus concentration in oysters from household outbreak, The Netherlands.

FIG 3. Risk of human norovirus infection and risk of illness per number of oysters consumed for screening data.



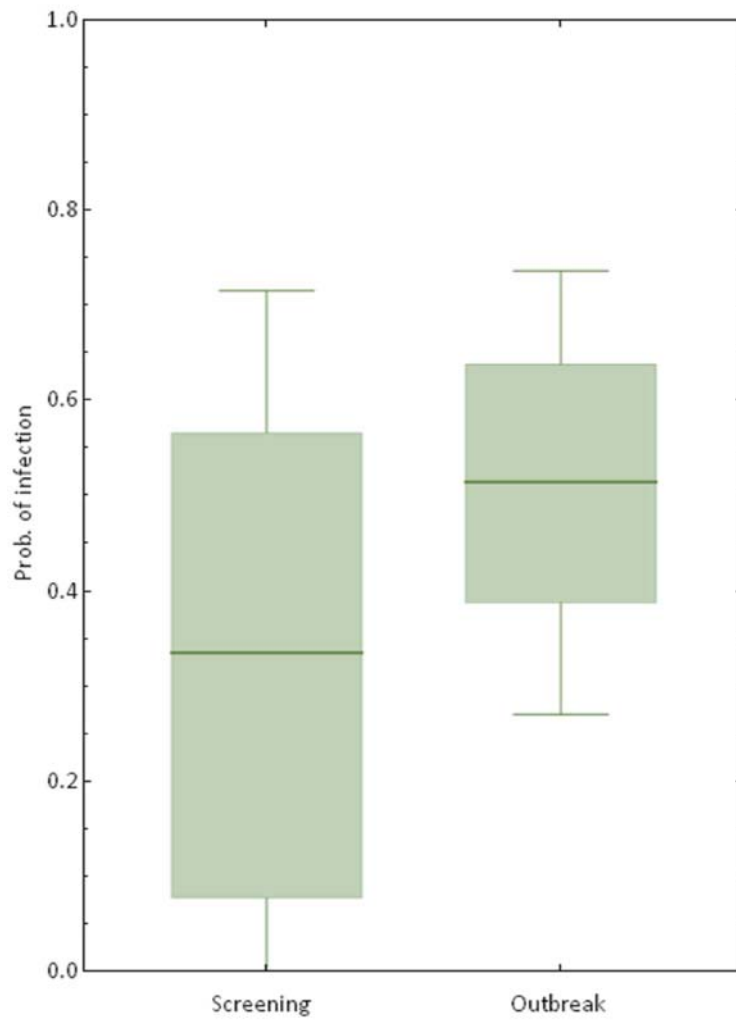
Probability of infection/day (upper line) and Probability of illness/day (downer line). For these estimations was assumed an efficiency of viral particles recuperation of one-hundred per cent.

FIG 4. Risk of human norovirus infection and risk of illness per number of oysters consumed for the household outbreak case in The Netherlands.



Probability of infection/day (upper line) and Probability of illness/day (downer line). For these estimations was assumed an efficiency of viral particles recuperation of one-hundred per cent.

FIG 5. Boxplots of the probability of human norovirus infection based on screening data of oysters from Oosterschelde Estuary and household outbreak.



5. RESUMEN GENERAL

RESUMEN GENERAL

El impacto de la población sobre los sistemas ecológicos del planeta se ha ido haciendo más aparente en los últimos años, poniendo de manifiesto la estrecha relación existente entre los niveles de contaminación ambiental y la salud de la población. Las enfermedades infecciosas representan un gran riesgo y son la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes. Según información facilitada por la Organización Mundial de la Salud, considerando únicamente las enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año, mayoritariamente niños menores de 5 años (WHO, 2009). Dentro de las enfermedades infecciosas, los virus son los principales causantes de brotes relacionados con la contaminación del agua y los alimentos en los países más desarrollados, donde la mejora de los tratamientos de depuración de las aguas residuales ha reducido la transmisión de la mayor parte de los patógenos bacterianos (Craun, 1991; revisado en Godfree y Farrell, 2005).

La contaminación del medio ambiente a partir de aguas residuales se confirma al analizar la presencia de virus en aguas superficiales de ríos y lagos en los que se destacan altos porcentajes de muestras positivas (revisado en Girones *et al.*, 2010), y en los frecuentes casos de infecciones virales asociados al consumo de moluscos bivalvos que se observan cada año en países industrializados (Lees, 2000). Los virus entéricos en agua pueden permanecer estables durante meses o incluso más tiempo si están asociados a sólidos, y pueden acumularse en sedimentos que posteriormente se resuspenderán en la columna de agua por procesos naturales y artificiales, facilitando la diseminación viral (Melnick, 1984; Rao *et al.*, 1984; Rzezutka y Cook, 2004). Se ha observado en algunos casos que los estándares de calidad microbiológica actuales no garantizan la ausencia de virus y se han aislado virus en agua de bebida, aguas superficiales, agua de mar o moluscos bivalvos que cumplen los estándares actuales de índices bacterianos (Vivier *et al.*, 2004; Formiga-Cruz *et al.*, 2002; 2003).

La primera parte de la Tesis (Capítulo I) se diseñó con el objetivo de estudiar la prevalencia de virus emergentes, principalmente el virus de la hepatitis E, mediante un análisis comparativo que nos permitiera evaluar cambios en los patrones de excreción de hepatitis agudas en el este de España y valorar simultáneamente la presencia de nuevos poliomavirus (Estudios 1, 2 y 3). Estudios previos elaborados en nuestro grupo de investigación habían descrito la presencia de HAV y HEV en agua residual recolectada en el periodo 1994 – 2002 (Pina *et al.*, 2001; Clemente-Casares *et al.*, 2003), de manera que la continuación de estos

trabajos nos permitiría evaluar las dinámicas de ambos patógenos. Al mismo tiempo, la caracterización y prevalencia de las distintas cepas circulantes en la población estudiada nos aportarían la información necesaria para dilucidar si HEV continúa siendo un patógeno emergente, y si la disponibilidad de vacuna para HAV y aplicación de planes de vacunación universal están teniendo el efecto esperado frente a las mejoras generales a nivel de saneamiento, implementación de nuevos tratamientos de depuración y a la apertura de nuevas EDAR. Actualmente, HEV se considera la causa más importante de hepatitis clínicas agudas entre adultos en el centro y sudeste asiático, y la segunda causa más importante, detrás de la HBV, en el medioeste y norte de África (Das *et al.*, 2000; Ghabrah *et al.*, 1995; Gomatos *et al.*, 1996). Por otro lado, se considera que HEV es responsable de un número menor de casos de hepatitis en los Estados Unidos y otros países industrializados, recientemente se ha descrito que HAV es el principal agente responsable de estas infecciones (Purcell y Emerson, 2008).

Los datos obtenidos en el Estudio 1 nos muestran que la presencia de HEV en agua residual del noreste español se ha mantenido estable durante la última década (30%), mientras que la presencia de HAV ha caído considerablemente, de un 57% (1994 – 2002) a un 3% (2006 – 2008). Esta observación nos podría hacer concluir que la disminución de la presencia de HAV en el agua residual podría justificarse exclusivamente con la implementación de un plan de vacunación universal obligatorio a menores de 12 años que tiene lugar en la Comunidad Autónoma de Cataluña desde 1999 (Oviedo *et al.*, 2009). Para contrastar esta hipótesis se recolectaron muestras de agua residual de dos regiones geográficas próximas al área estudiada. Se escogió la Comunidad Autónoma Valenciana y dos regiones del norte de Egipto, debido a la ausencia de planes de vacunación de gran cobertura y a la caracterización como área de elevada endemidad para HAV, respectivamente. Los datos observados mostraron que en ausencia de un plan de vacunación y frente a la disponibilidad de un sistema de saneamiento adecuado (Valencia), la presencia de HAV en agua residual mostraba porcentajes similares a los descritos en Cataluña, mientras que las muestras procedentes de Egipto, tal y como se esperaba, presentaban un elevado índice de positividad para HAV. De manera que, la drástica reducción observada para HAV no puede justificarse únicamente debido a la disponibilidad y aplicación de una vacuna eficiente, debemos considerar que la reducción puede deberse también a las mejoras en las condiciones de saneamiento de la región. En el periodo comprendido entre 1992 – 2008, Cataluña ha experimentado un incremento significativo en el número de estaciones depuradoras de agua residual (de 91 a 343) y del volumen total de agua residual depurada (de 991.892 a 2.786.871 m³/día). Todas las

muestras analizadas presentaron valores elevados de HAdV (10^3 GC/mL), lo cual nos indica que los niveles de contaminación fecal son los habituales para este tipo de muestras. El efecto que han tenido las EDAR respecto a la circulación de HAV no se observa de manera equivalente para HEV, probablemente debido a la presencia de un reservorio animal asociado, los cerdos. Las secuencias de HEV descritas nos muestran una elevada similitud entre las cepas identificadas en el agua residual y en las heces de origen porcino, estudiadas mediante muestras procedentes de matadero, hecho que nos demuestra la circulación de los mismos agentes infecciosos entre animales y humanos que habitan zonas próximas. Además de analizar muestras de agua residual, se analizaron 19 muestras de suero procedentes de pacientes con hepatitis agudas negativas para hepatitis B y C (muestras cedidas por el Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona), detectándose 4 muestras positivas para HEV. La detección de pacientes positivos para HEV nos confirma la presencia de estos virus no solo en el ambiente sino también en la población estudiada. Para todas las matrices estudiadas la secuenciación mostró la presencia del genotipo 3 y, esporádicamente, el genotipo 1 (una muestra de agua residual y un suero).

A raíz de la detección esporádica del genotipo 1 no endémico en la región evaluada, se decidió profundizar acerca de su circulación ambiental en el noreste español (Estudio 2). Seis muestras de agua residual urbana, dos muestras de biosólidos urbanos y dos muestras de lodos procedentes de un matadero de ganado bovino y porcino (80% ganado porcino), todas ellas positivas para HEV, fueron analizadas mediante clonación y secuenciación con la intención de obtener información acerca de la potencial diversidad de las cepas de HEV excretadas por la población. Un total de 101 clones fueron secuenciados y los resultados mostraron que la mayoría de cepas identificadas pertenecen al genotipo 3 (74 clones), aunque el genotipo 1 también fue detectado. Dos muestras de agua residual y un biosólido mostraron cepas pertenecientes al genotipo 1, mientras que las dos muestras de lodos de matadero mostraron estar contaminadas únicamente con el genotipo 3, tal y como era de esperar. Las secuencias obtenidas en las muestras de origen animal mostraron una elevada similaridad con cepas de origen humano previamente reportadas en la misma región de estudio. La similaridad de secuencias obtenidas en las diferentes muestras estudiadas (intra-muestra) oscila entre 89% – 99%. La circulación esporádica de este genotipo en áreas industrializadas representa un problema a nivel de salud pública ya que se ha asociado a importantes brotes infecciosos con elevadas tasas de mortalidad. La contaminación de agua y alimentos a través del contacto con agua residual o regenerada, así como biosólidos, representa un riesgo significativo para la población. En definitiva, Los resultados obtenidos demuestran una circulación simultanea de

cepas diversas de HEV entre la población de la región estudiada.

En modo de breve introducción al Estudio 3, debemos considerar que hasta el año 2007 únicamente se conocían dos poliomavirus que fueran capaces de infectar humanos; BKPyV y JCPyV. El poliomavirus BK fue identificado en la orina de pacientes con transplante renal (Gardner *et al.*, 1971), mientras que JCPyV fue encontrado en el cerebro de un paciente con PML (Padgett *et al.*, 1971). Recientemente, tres nuevos poliomavirus han sido descubiertos; los poliomavirus KI y WU fueron identificados en el tracto respiratorio de niños con afecciones en éste (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007) y MCPyV fue encontrado asociado a un extraño tipo de cáncer nombrado carcinoma de células Merkel (Feng *et al.*, 2008). Además, dos distintos poliomavirus de simio, LPyV y SV40 se han relacionado con humanos. SV40 ha sido introducido en humanos a través de la vacuna infectada de poliovirus, y su papel en el desarrollo de tumores en humanos ha sido ampliamente estudiado. Estudios previos no han detectado la presencia de SV40 en agua residual urbana, lo que nos indica que si SV40 está infectando a los humanos, no está siendo excretado en el medio ambiente a concentraciones detectables (Bofill-Mas *et al.*, 2000). Por el contrario, anticuerpos contra LPyV han sido detectados en muestras de sangre humana, sugiriéndose que LPyV también infecta a humanos (Viscidi y Clayman, 2006). Además, recientemente se ha descrito la presencia de partículas víricas de LPyV en la sangre periférica de pacientes con PML (Delbue *et al.*, 2008).

Debido a que se ha descrito una elevada prevalencia de JCPyV y BKPyV en agua residual procedente de diferentes áreas geográficas y se sugiere que el agua residual tiene un papel importante en la transmisión de ambos patógenos (Bofill-Mas *et al.*, 2000, 2006), se decidió evaluar los patrones de excreción de KIPyV, WUPyV, MCPyV y LPyV en muestras de agua residual urbana para determinar su prevalencia ambiental y determinar el papel de estos virus como contaminantes ambientales (Estudio 3). También se ha estudiado la presencia de dichos patógenos en muestras de agua de río y en orinas de mujeres embarazadas sanas.

Todas las muestras analizadas mostraron registros habituales de contaminación fecal de origen humano evaluados mediante la cuantificación de JCPyV (10^2 GC/mL) y HAdV (10^3 GC/mL). Los poliomavirus KI y WU fueron detectados en 1/8 y 2/8 muestras de agua residual, respectivamente, mientras que MCPyV fue detectado en 7/8 muestras de agua residual y fue el único nuevo poliomavirus presente en el agua de río (2/7) y orina (1/4). Aunque la detección realizada fue cualitativa, diluciones seriadas permitieron estimar una concentración de 10 – 100 PDU/mL. Ninguna de las muestras de agua residual ($n = 13$) y biosólidos ($n = 9$) analizadas

fue positiva para LPyV. Los datos obtenidos representan la primera descripción de la presencia de los nuevos poliomavirus KiPyV, WUPyV y MCPyV en el ambiente y confirman que están ampliamente diseminados entre la población humana. La elevada prevalencia de MCPyV sugiere que su patrón de excreción es similar al de JCPyV y BKPyV. La presencia de estos virus en el agua residual representa una potencial vía de infección para humanos y, a nuestro conocimiento, este trabajo representa la primera descripción de un virus relacionado con cáncer presente en el medio ambiente.

Las aguas residuales son la principal fuente de microorganismos patógenos que se transmiten a través del ambiente y que llegan a la población especialmente a causa de la contaminación del agua de consumo, agua utilizada en cultivos de vegetales o en cultivos de moluscos bivalvos, en la preparación de comida, para lavar, en el baño o en los diversos usos recreativos (Cliver, 1984). El tratamiento actualmente aplicado a las aguas residuales procesadas por métodos biológicos y físico-químicos ha reducido significativamente la incidencia de enfermedades entre la población, especialmente las de etiología bacteriana, sin embargo los protozoos y los virus son más resistentes que las bacterias a muchos de estos tratamientos. Concentraciones significativas de virus son detectadas en las aguas vertidas al ambiente y en los biosólidos generados en plantas de tratamiento de agua residual (Girones *et al.*, 2010). Por este motivo, junto con la elevada presencia de patógenos observados en los tres estudios iniciales, en el Capítulo II (Estudio 4) de esta Tesis se analizó la diseminación y eficiencia de eliminación de patógenos e indicadores de contaminación fecal en dos plantas de tratamiento de agua residual donde se aplican tratamientos terciarios.

Los resultados obtenidos nos muestran como existe una elevada presencia de virus, bacterias y protozoos en cada uno de los puntos analizados en las dos EDAR estudiadas. Se analizaron muestras recolectadas quincenalmente durante un periodo de cinco meses (octubre 2009 – febrero 2010) en tres puntos del tratamiento de depuración: a la entrada de la estación depuradora, tras aplicar el tratamiento secundario y tras aplicar el tratamiento terciario (agua regenerada). Ambas plantas depuradoras tienen capacidad para depurar 60.000 y 45.000 m³/día, respectivamente, y reciben aguas fecales de poblaciones próximas a los 250.000 habitantes (situadas en la Comunidad Autónoma de Valencia). Los tratamientos terciarios incluían desinfección por ultravioleta con una dosis media de 100 mWs/cm² y una de las dos plantas, además, combinaba los UV con desinfección por filtro de arena.

Mediante la colaboración entre nuestro grupo de investigación y otros dos grupos con experiencia en bacterias y protozoos, ubicados en Universidad Politécnica de Valencia, se analizaron los siguientes microorganismos: coliformes fecales, HAdV y JCPyV (como indicadores de contaminación fecal), HAV, HEV, NoV GGI, NoV GGII, *Salmonella* spp., *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter* spp., *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Todos los patógenos e indicadores de contaminación fecal analizados fueron detectados en cada uno de los puntos analizados, exceptuando a HEV, *Vibrio vulnificus* y JCPyV, los cuales no fueron detectados en agua regenerada. JCPyV y NoV GGII fueron cuantificados por qPCR, mostrando concentraciones medias de 10^4 y 10^2 GC/mL de agua residual cruda, respectivamente. HAdV y *Arcobacter* spp. también fueron evaluados por ensayos de infectividad, mostrando resultados positivos en los diferentes puntos analizados, incluyendo agua regenerada.

La eficiencia de eliminación de HAdV, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. fue estudiada calculando la reducción logarítmica a través de los tratamientos aplicados en las plantas depuradoras. El tratamiento primario se aplica principalmente para la eliminación de materia de gran tamaño que pueda representar un problema para la maquinaria implicada en el resto de la depuración, de manera que la eliminación esperada para este proceso es despreciable (Fu *et al.*, 2010). Al contrario, el tratamiento secundario juega un papel importante en la reducción de microorganismos y contaminantes químicos. Por las razones aquí expuestas, los tratamientos primarios y secundarios se evaluaron conjuntamente. Tal y como cabría esperar, las muestras recolectadas tras la combinación de los dos primeros tratamientos muestran la reducción más acusada en la concentración de los microorganismos analizados, observándose una reducción de $1,03 - 1,51 \log_{10}$ para HAdV, $1,99 - 2,56 \log_{10}$ para *Giardia* spp. y $1,28 - 1,37 \log_{10}$ para *Cryptosporidium* spp., reducción equivalente al 60% – 89% del total estimado. La aplicación de desinfección por UV mostró unos valores menores a los esperados, concretamente de $0,04 - 0,13 \log_{10}$, $0,30 - 0,34 \log_{10}$ y $0,18 - 0,34 \log_{10}$, para HAdV, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., respectivamente, equivalente a un 2 – 17% del total. Excepcionalmente, una de las plantas depuradoras mostró una reducción del 40% ($0,90 \log_{10}$) para *Cryptosporidium* spp. La utilización de filtros de arena representó una reducción del 4 – 17%. Adenovirus humanos cuantificados por qPCR fueron detectados en un 100% de las muestras, pasando de 10^3 GC/mL en el agua residual cruda a 10^1 GC/mL en el agua regenerada. La aplicación de desinfección por UV y filtros de arena es necesaria para la desinfección y mantenimiento de la calidad del agua, reduciendo la necesidad de cloración. No obstante, los datos obtenidos revelan que debido al elevado coste asociado y al limitado

efecto sobre la reducción de los patógenos evaluados, los tratamientos actualmente empleados deberían perfeccionarse.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la elevada prevalencia y concentración en agua residual y regenerada de un amplio rango de patógenos evaluados representa un riesgo sanitario considerable y un reto actual para el desarrollo de nuevos sistemas de saneamiento. Los tratamientos estudiados reducen la presencia de HAdV, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., patógenos/indicadores de elevada resistencia ambiental y frente a tratamientos, entre 1,2 – 3,0 log₁₀, siendo estos valores insuficientes para garantizar un agua regenerada terciaria con una calidad microbiológica adecuada. La presencia de patógenos viables en agua regenerada que cumple la actual normativa española (Anónimo, 2007) corrobora el riesgo para la salud pública y la necesidad de implementar nuevos indicadores microbiológicos que sean más restrictivos. Por otro lado, mediante regresión logística se estudió la capacidad de predicción que HAdV ofrecía para la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia*, aunque no se observaron buenas correlaciones. De todos modos, a pesar de no poder predecir la presencia de ambos parásitos debido a que HAdV estuvo presente en todas las muestras analizadas, incluso en ausencia de otros patógenos, su elevada prevalencia y concentración sugieren un papel como indicador protector de la contaminación fecal.

Llegados a este punto de la Tesis hemos podido comprobar la elevada presencia de patógenos víricos, bacterianos y protozoos en el agua residual y agua regenerada (secundaria y terciaria), evidenciando que representan la fuente más importante de introducción de patógenos en el medio ambiente, especialmente patógenos víricos. Debido a la laboriosidad y/o elevado coste económico asociado a los actuales métodos de concentración de partículas víricas en agua residual, en el Estudio 5 descrito dentro del Capítulo III, se desarrolló una nueva metodología eficiente y de bajo coste para concentrar partículas víricas. Con el objetivo de encontrar un protocolo que fuera fácilmente estandarizable, económico y eficiente, se abordaron tres estrategias diferentes para concentrar HAdV, JCPyV y NoV GGII (como virus modelo de DNA y RNA) en agua residual.

El primer método descrito (ESMP) consiste en una elución inicial utilizando un tampón glicina 0,25N, pH 9,5 (1:2 v/v). La muestra (50 mL) se homogeniza durante 30 min en hielo y posteriormente se centrifuga a 8.000xg durante otros 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido (150 mL) se transfiere a un nuevo recipiente, se ajusta el pH a 3,5 utilizando HCl 1N y se le añade 1,5 mL de una solución prefloculada de leche descremada (concentración final de 0,01%

(w/v)). La solución de leche descremada prefloculada se prepara de acuerdo con Calgua *et al.* 2008. Después, la muestra se mantiene en agitación durante 8 h a RT para permitir que los virus se adhieran a los flóculos de leche. Posteriormente, los flóculos son precipitados mediante una centrifugación a 8.000xg durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante es eliminado cuidadosamente y el precipitado se resuspende en 500 µL de un tampón fosfato a pH 7,5.

El segundo método desarrollado (UF) utiliza la ultrafiltración como principio básico para la concentración. En primer lugar se lavan 4 filtros (Millipore Ultrafree®-15 filter, 100.000 MW) con agua bi-distilada por muestra a analizar, se centrifugan a 2.000xg durante 10 min y se descarta el filtrado de cada uno de ellos. Para una muestra analizada, 45 mL de agua residual se transfieren a 3 filtros pre-lavados (15 mL por filtro), se centrifugan a 2.000xg durante 1 h a RT y se descarta el filtrado. Los virus se eluyen de cada filtro utilizando 4 mL de tampón glicina 0,25N y pH 9,5. El eluido vírico se traspara a un tubo estéril, se incuba 30 min a 4 °C (homogenizando cada 10 min) y se centrifuga a 3.000xg durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recupera y se añade a un nuevo filtro pre-lavado, se centrifuga a 2.000xg durante 1 h a RT y se recupera el líquido retenido en el filtro (100 µL) que contiene las partículas víricas.

En el último de los métodos desarrollados (LF), 50 mL de agua residual se congelan a una temperatura de -80 °C y se liofilizan durante 24 – 36 h. Una vez se ha liofilizado la muestra, las partículas restantes se resuspenden en 500 µL de tampón fosfato a pH 7,5.

Los nuevos métodos descritos se compararon con un protocolo basado en la ultracentrifugación (UC) para concentrar las partículas víricas presentes en el agua residual. Dicho método ha sido previamente descrito en nuestro laboratorio (Pina *et al.*, 1998a) y se ha utilizado para la detección de partículas víricas en los estudios englobados dentro de los dos primeros capítulos de esta Tesis.

Estos cuatro métodos se utilizaron para cuantificar la presencia de HAdV, JCPyV y NoV GGII en cinco muestras de agua residual urbana recolectada en Barcelona. Los resultados mostraron que para HAdV, el método más eficiente fue ESMP, seguido por LF, UF y UC. Para JCPyV los mejores resultados se obtuvieron con ESMP, seguido por UC, LF y UF. Por último, para NoV GGII las cuantificaciones más elevadas fueron obtenidas mediante ESMP, seguido por UC, LF y UF.

Aunque los cuatro métodos estudiados mostraron un buen comportamiento a la hora de recuperar estas tres especies víricas, incluyendo virus DNA y RNA, en el trabajo presentado nos inclinamos a profundizar en el estudio de ESMP debido a que es el método propuesto que requiere menos equipamiento y presenta una menor inversión económica. El CV ([desviación estándar/media] x 100) se utilizó como estimador de la variabilidad intra-laboratorio y los resultados observados fueron 15,9% para HAdV, 12,2% para JCPyV y 17,4% para NoV GGII. Respecto a la recuperación, ESMP presentó valores entre 30% – 95%, 55% – 90% y 45% – 90% para HAdV, JCPyV y NoV GGII, respectivamente. Finalmente, el método escogido se validó mediante un estudio de campo donde se evaluaron 12 muestras de agua residual compuesta durante 24h. Los resultados obtenidos para los virus estudiados se encontraron dentro de los rangos habituales de detección, tanto en los estudios previos de esta Tesis como en otros trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Bofill-Mas *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos muestran que ESMP puede ser aplicado en estudios a gran escala, es una metodología rápida, económica y fácilmente estandarizable para ser aplicada en laboratorios de rutina y países con poco desarrollo económico. De todos modos, en disposición del equipo necesario (ultracentrifuga y/o liofilizador) y de los recursos económicos suficientes (principalmente para comprar los filtros), el resto de alternativas propuestas pueden suponer ventajas en situaciones determinadas, ya que pueden ofrecer una concentración más rápida o un espectro de virus más generalizado.

El segundo gran bloque de esta Tesis (Capítulos IV y V) está centrado en el estudio de los moluscos bivalvos como potenciales responsables de brotes infecciosos. Tras comprobar la elevada presencia de patógenos en el agua residual y agua regenerada, cabe esperar que los moluscos bivalvos que crecen en estuarios donde son vertidas dichas aguas presenten patógenos humanos.

En el Capítulo IV se ha llevado a cabo un estudio a gran escala donde se ha evaluado la presencia de virus entéricos en muestras de moluscos bivalvos recolectados durante los meses de invierno (2004 – 2008) en mercados de la Comunidad Autónoma de Cataluña a través de un programa de vigilancia gubernamental (Programa de Vigilancia de la Seguridad de los Alimentos). Entre las muestras analizadas podemos diferenciar un total de 151 lotes de moluscos bivalvos de los cuales; (i) 87 lotes de mejillones (*Mytilus galloprovinciales*) y 30 de almejas (*Venus gallina* y *Chamelea gallina*) fueron cultivados en áreas de producción de marisco españolas (comunidades autónomas de Galicia y Cataluña) y (ii) 14 lotes de mejillones y 20 de almejas fueron importados de Italia, Francia y Portugal. La evaluación mediante RT-PCR

muestra la ausencia de NoV GGI y HAV entre las muestras analizadas, mientras que NoV GGII fue detectado en un 13,7% (16/117) de las muestras nacionales y en un 8,8% (3/34) de las muestras importadas de Europa. Durante el periodo de estudio, un 16,8% (17/101) de los mejillones y un 4% (2/50) de las almejas fueron positivos para NoV GGII. Análisis estadísticos posteriores mostraron que no se observan diferencias significativas entre los positivos detectados en función del origen de las muestras, aunque sí se observan diferencias significativas respecto la especie animal analizada, siendo los mejillones los más contaminados por NoV GGII.

Paralelamente al estudio de mercado, diez lotes de tellinas (*Donax trunculus*) congeladas importadas de Perú fueron analizadas para comprobar su potencial vinculación con un brote infeccioso de hepatitis A que tuvo lugar en el este de España en 2008. Los análisis por RT-PCR mostraron que un 50% (5/10) de las muestras analizadas presentaban contaminación por HAV y se estimó mediante RT-qPCR una concentración media de 10^2 GC/g HP. Los análisis de secuenciación describieron la presencia de los subgenotipos IA y IB, genotipos habituales en Europa y Sudamérica. Estudios comparativos posteriores, donde se utilizó una muestra de agua residual positiva para HAV, previamente aislada en la misma zona que el brote durante y el mismo periodo de tiempo (incluida en el Estudio 1), mostraron una similitud respecto esta secuencia del 96% – 98,2%. Las diferencias detectadas entre las secuencias presentes en las tellinas y el agua residual sugieren que ambas contaminaciones tienen diferente origen.

Adicionalmente a los análisis de NoV y HAV, adenovirus humanos fueron cuantificados por qPCR en un grupo de 30 muestras (24 mejillones y 6 almejas), de las cuales diez resultaron ser positivas y veinte negativas para NoV GGII. Los resultados globales muestran que un 43,3% (13/30) fueron positivas para HAdV. Entre las muestras positivas para NoV GGII, un 80% (8/10) fueron HAdV-positivas con una concentración media de 10^3 GC/g HP, mientras que únicamente un 25% (5/20) de las negativas para NoV GGII resultó serlo también para HAdV, con una concentración media de 10^1 GC/g HP. En función de los resultados obtenidos, se estudió una potencial correlación entre HAdV y NoV GGII, con el objetivo de poder predecir la presencia de NoV GGII mediante la detección cuantitativa de HAdV, y se determinaron diferencias significativas entre los dos grupos evaluados. La asociación entre HAdV y NoV GGII refleja una sensibilidad del 100% y una especificidad del 74%.

Para dilucidar porqué muestras de moluscos bivalvos que cumplen con la actual legislación europea presentan patógenos de origen vírico y tratar de entender como los

tratamientos afectan a la carga vírica, se estudió la eficiencia de eliminación de microorganismos que tiene lugar en actuales tratamientos de depuración. Un total de 40 lotes de mejillones y 20 muestras de agua de mar utilizada en el proceso de depuración, ambas matrices recogidas durante Mayo-Junio de 2010, fueron recolectadas en tres empresas productoras de marisco que utilizan sistemas distintos para depurar el marisco cultivado en una área clasificada como tipo B, de acuerdo con la regulación europea. Los tratamientos utilizados para depurar el marisco fueron: (i) ozono, (ii) sistema venturi y (iii) ozono combinado con UV. Se analizaron muestras procedentes de los mismos lotes de moluscos antes y después de aplicar los diferentes tratamientos de depuración (24h) para observar la reducción en la contaminación microbiológica. Se cuantificó la presencia de HAdV entre las muestras seleccionadas, observándose un 70% (14/20) de positivos entre las muestras de mejillones sin depurar y un 60% (12/20) de positivos entre las muestras depuradas, con concentraciones medias de 10^2 GC/g HP para ambos tipos de muestras. Un 42% (5/12) de las muestras de agua de mar utilizada para la depuración y un 50% (6/12) de las muestras de agua de mar tras la depuración, fueron positivas para HAdV, con valores medios de concentración de 10^2 GC/L. Análisis estadísticos muestran que no hay diferencias significativas entre las muestras pre- y post-depuradas, de manera que no podemos considerar que los diferentes tratamientos aplicados tengan efecto alguno en la presencia y concentración de HAdV en las muestras evaluadas. Todas las muestras fueron negativas para NoV, presumiblemente debido al periodo de muestro. NoV es una infección asociada a los meses fríos, de manera que durante Mayo-Junio su incidencia es mínima.

Aunque los análisis por qPCR proporcionan una información cuantitativa precisa, no existe ninguna indicación acerca de la presencia de partículas víricas infecciosas entre los virus contaminantes. Para dilucidar este aspecto se adaptó un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) para HAdV basándonos en trabajos previos de nuestro grupo de investigación. Concretamente, se utilizó el protocolo descrito por Calgua *et al.* (2011). Dos muestras positivas para HAdV procedentes de cada uno de los tratamientos de depuración utilizados fueron seleccionadas, observándose un 50% (3/6) de muestras infecciosas para dicho patógeno.

Los resultados indican que los actuales sistemas de depuración destinados a reducir el número de bacterias no tienen un efecto equivalente para los niveles de contaminación vírica. Estudios previos confirman los resultados aquí obtenidos, indicando que moluscos bivalvos que cumplen con la normativa europea respecto las concentraciones de indicadores de contaminación fecal de origen bacteriano son incapaces de determinar la presencia de

patógenos víricos tales como NoVs (Lees, 2000; Formiga *et al.*, 2002; Romalde *et al.*, 2002; Muniain-Mujika *et al.*, 2003).

En conclusión, el Capítulo IV de esta Tesis describe la presencia cualitativa y cuantitativa de virus entéricos humanos presentes en moluscos bivalvos recolectados en mercados localizados en el noreste de España, definiendo la abundancia de NoVs como contaminantes en mejillón y almejas. Aunque no se han detectado muestras positivas para HAV entre las muestras de mercado, sí se ha descrito la presencia en muestras potencialmente vinculadas a un brote de hepatitis originado a partir del consumo de tellinas congeladas importadas de una región endémica. Los resultados generales indican que la presencia y concentraciones de patógenos humanos en moluscos bivalvos representan un reto para los sistemas de saneamiento. Simultáneamente, se sugiere que los HAdV cuantificados por qPCR pueden jugar un papel de indicadores de contaminación fecal, ofreciendo una nueva herramienta para determinar la calidad microbiológica.

En el último estudio incluido en esta Tesis y descrito en el Capítulo V (Estudio 7) se ha realizado la modelización matemática del riesgo de infección (colonización/invasión de un microorganismo patógeno en una parte determinada del cuerpo o tejido) y enfermedad (estatus consecuente de afección de un ser vivo, caracterizado por una alteración de su estado de salud) asociado al consumo de ostras contaminadas por NoV. Este trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Zoonosis y Microbiología Ambiental (LZO) del Instituto Nacional de Salud Pública y Ambiental (RIVM) holandés, durante una estancia de 6 meses realizada en 2008. Frecuentemente se describen infecciones por NoV asociadas al consumo de moluscos bivalvos (Ahmed, 1992; Altekruze, *et al.*, 1999). Las ostras se contaminan a través del filtrado de agua de mar que contiene partículas víricas (USFDA, 2001), reteniendo los virus incluso después de aplicar los tratamientos de depuración. Tal y como se ha descrito para mejillones y almejas en el Capítulo IV, las ostras que pueden considerarse seguras para el consumo humano ya que cumplen con la actual legislación europea (basada en *E. coli*), presentan concentraciones elevadas de NoV (Cheng *et al.*, 2005; Boxman, *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2007) y representan un riesgo real para la salud del consumidor (Lodder-Verschoor *et al.*, 2005). En la actualidad, la magnitud del efecto adverso originado por dichas infecciones a nivel de salud pública se desconoce por completo, especialmente si queremos considerar las infecciones secundarias que tienen lugar a partir de éstas.

La evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico es un nuevo componente dentro

del campo de la seguridad microbiológica en alimentos y está ganando terreno rápidamente debido a su fácil implementación a la hora de estimar el riesgos asociado a la contaminación microbiana de los alimentos (Vose, 1998). Actualmente, ECRM está siendo aplicada para establecer nuevos estándares, guías y otras recomendaciones respecto la seguridad alimentaria y la salud del consumidor. La evaluación de riesgo es una herramienta de gran utilidad para calcular de forma precisa las probabilidades de infección y enfermedad, y lo que es más importante, establecer los puntos críticos de control para una posterior intervención.

El riesgo de infección fue evaluado en dos escenarios distintos; (i) en el escenario 1 se estudio la concentración de NoV presente en las ostras procedentes del estuario de Oosterchelde (Holanda), zona de producción de moluscos bivalvos clase A según las actuales regulaciones europeas, mientras que en el (ii) escenario 2 se utilizaron datos procedentes de un pequeño brote familiar de gastroenteritis identificado en el 2004, también localizado en Holanda.

La exposición a NoV, o dosis (D) debido al consumo de ostras depende de (i) número de NoV infecciosos en las ostras en el momento del consumo (C_{cons}) y (ii) número de ostras consumidas por persona (N) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D = C_{cons} \times N$$

Al mismo tiempo, C_{cons} depende de (i) número de NoV infecciosos por ostra en el momento de la recolección (C_{harv}), (ii) eliminación de NoV durante los procesos de depuración (S_{dep}), (iii) la tasa de inactivación decimal de NoV por día (δ), (iv) tiempo transcurrido entre la recolección y el consumo (t), (v) eficiencia de recuperación para NoV (R), (vi) límite de detección de la RT-qPCR (λ), y (vii) fracción de NoV infecciosos por ostra (φ) de acuerdo con la ecuación que sigue a continuación:

$$C_{cons} = C_{harv} \times S_{dep} \times 10^{\delta \times t} \times (1/R) \times \lambda \times \varphi$$

Para poder llevar a cabo el modelo desarrollado y obtener resultados que nos hablen de las probabilidades de infección y enfermedad, se tuvo que recopilar información para complementar cada uno de los parámetros descritos. En todo momento, se trató de implementar el modelo de manera equilibrada, pensando en la potencial aplicación para futuros trabajos.

La estimación de C_{cons} se obtuvo mediante una simulación de Monte Carlo (10.000 réplicas) a partir de una distribución gama aplicada al modelo matemático desarrollado. Los resultados obtenidos a partir de la RT-qPCR fueron utilizados para establecer los límites y escalar los parámetros de la distribución gama. Los valores de recuperación (R) de los métodos utilizados se desconocían, de manera que se asumió que la eficiencia fue del 100%, y los efectos sobre las probabilidades finales de infección/enfermedad debido a recuperaciones menos eficientes se evaluaron mediante un análisis de sensibilidad. Por otro lado, el límite de detección (λ) de la RT-qPCR utilizada para el estudio aquí presentado también se desconocía, aunque estudios realizados sobre la detección de NoV en marisco describen concentraciones que oscilan entre 1 – 100 GC/gramo, utilizando diferentes protocolos (Muniain-Mujika *et al.*, 2003; Vinjé *et al.*, 2003; Kou *et al.*, 2006). Para estimar el riesgo de infección asociado a NoV se utilizó un límite de detección de 1 PDU.

Todas las ostras utilizadas en el estudio provienen de áreas de cultivo clase A de acuerdo con la legislación europea, de manera que no existe la aplicación de tratamientos de depuración para tratar de disminuir la carga microbiana antes de introducirse al mercado. Por lo tanto, la eliminación de NoV debida a la utilización de tratamientos de depuración no se consideró (s_{dep}).

La tasa de inactivación de NoV (δ) es un parámetro extremadamente complicado de estimar en ausencia de cultivo celular, tal y como ocurre con NoV (Duizer *et al.*, 2004a; 2004b). No obstante, existen virus de la misma familia, MNoV y FCV, que sí pueden ser cultivados (Wobus *et al.*, 2004; Buckow *et al.*, 2008). Diversos trabajos describen una elevada estabilidad de estos virus en cultivo celular y en suspensiones fecales, evidenciando una inactivación de menos de un logaritmo tras estar 14 y 40 días en dichas matrices, respectivamente, a 4 °C (Duizer *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2008a). Considerando que las regulaciones europeas recomiendan un transporte y almacenaje en temperaturas comprendidas entre los 4 y 7 °C, y que las ostras son un producto con elevado recambio una vez han llegado al punto de venta, en la implementación de este modelo se asumió que no ocurría inactivación para NoV entre el tiempo de recolección y consumo. Respecto la fracción de partículas víricas infecciosas (φ) detectadas mediante la RT-qPCR, se le asignó el valor 1.

El número promedio de ostras consumidas por persona en este estudio fue evaluado mediante la búsqueda a través de internet de 25 menús de restaurantes localizados en Holanda, así como la utilización de material bibliográfico (Lowther *et al.*, 2010). Como parte de

los análisis de sensibilidad, se estimó el riesgo de infección a partir de la ingestión de 1 – 20 ostras. Para cada ostra incluida en el análisis se le asignó aleatoriamente una concentración de NoV procedente de la distribución de C_{harv} .

Teunis *et al.* (2008) describió una relación de dosis respuesta para estimar la probabilidad de infección y la probabilidad condicional de enfermar tras ser infectado. Ambos modelos fueron aplicados en el estudio. La probabilidad de infección por partículas infecciosas de NoV como resultado de la dosis puede ser descrita de la siguiente manera (Teunis *et al.*, 2008):

$$f(D; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta; -D)$$

Donde la D representa el número de virus ingeridos durante un evento de consumo de ostras, los parámetros α y β caracterizan la infectividad y ${}_1F_1$ representa una función hipergeométrica confluyente (Teunis *et al.*, 2008). La relación dosis respuesta para la probabilidad condicional de enfermedad tras que un individuo sea infectado se describe en función de la siguiente fórmula (Teunis *et al.*, 2008). Donde η y r fueron descritos en un estudio previo (Teunis *et al.*, 1999).

$$h(D|\eta, r) = 1 - (1 + \eta D)^{-r}$$

Los resultados obtenidos muestran que NoV GGII fue detectado en un 6,3% (4/63) de las ostras recolectadas en el estuario de Oosterchelde, con una concentración estimada de 7 PDU/ostra, mientras que 33% (3/9) de las ostras procedentes del brote infeccioso fueron positivas, mostrando una concentración de 17 PDU/ostra. El riesgo de infección asociado al consumo de ostras procedentes del escenario 1 fue del 33%, variando entre un 8,4 – 49% en función del número de ostras consumida (1 – 20 unidades). La probabilidad de encontrar una ostra contaminada al consumir 6 ostras es del 29%. Para el escenario 2, el riesgo de infección tras ingerir 6 ostras se estimó en un 51%, oscilando entre un 47 – 54% en relación a una ingestión de 1 – 20 ostras. Para las muestras del estuario, la probabilidad de enfermar tras ser infectado fue de un 11%, oscilando entre 0,7 – 27%, mientras que para el escenario 2, la probabilidad de enfermar se estimó en un 31%, oscilando entre 21 – 36%.

El efecto producido sobre la probabilidad de infección debido a la variabilidad en los procesos de recuperación de partículas víricas, extracción de AN y detección de NoV fue

evaluado mediante análisis de sensibilidad y considerando una ingestión de 6 ostras. Los cálculos muestran que la probabilidad de infección varía de un 37% (40% de recuperación) a un 33% (100% de recuperación) para el escenario 1, y de un 54% (40% de recuperación) a un 51% (100% de recuperación) para el escenario 2.

En conclusión, en el Estudio 7 se ha evaluado el riesgo de infección y enfermedad asociado al consumo de ostras ($n = 6$) contaminadas con NoV. El riesgo de infección para el escenario 1 es del 33% y para el escenario 2 es del 51%. El riesgo de enfermedad asociado a estas infecciones es del 11% y 31% para cada escenario, respectivamente. Durante la elaboración del trabajo se han identificado puntos donde se carece de la información necesaria para poder realizar una evaluación del riesgo precisa, incluyendo la eficiencia de recuperación, el límite de detección de la RT-qPCR y la variación en la concentración de NoV entre zonas productoras de marisco clasificadas en diferentes clases (A – C). La obtención de dicha información mejorará futuras evaluaciones de riesgo para NoV. El presente modelo desarrollado puede utilizarse en otros escenarios donde se quiera estimar los riesgos asociados al consumo de moluscos bivalvos contaminados por NoV, además, información cuantitativa obtenida en otros lotes de marisco puede implementarse fácilmente.

Como conclusión general de esta Tesis podemos decir que existe una elevada prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos. El control de la contaminación viral del medio ambiente requiere la estandarización de técnicas de concentración y detección y el desarrollo de un programa de vigilancia que permita valorar parámetros víricos y reducir la diseminación de las enfermedades establecidas, así como de las infecciones víricas emergentes. Con todo esto, podemos considerar que la presente Tesis ha contribuido al estudio de diferentes virus patógenos humanos que pueden ser transmitidos a la población a través del agua o alimentos contaminados, aportando datos sobre la eficiencia de eliminación de virus en plantas de tratamiento de agua residual que producen agua regenerada (secundaria y terciaria) y en plantas depuradoras de moluscos bivalvos. Se han propuesto mejores metodologías y un nuevo método de concentración de virus en agua residual. Finalmente, se ha desarrollado un modelo matemático para la evaluación del riesgo de infección/enfermedad vírica por consumo de moluscos bivalvos contaminados.

OVERVIEW

The population impact on the planet's ecological systems has been becoming more apparent in recent years, highlighting the close relationship between environmental pollution levels and population health. Infectious diseases pose a great risk and are the leading cause of death in children and young adults. According to information provided by the World Health Organization, considering only diarrheal diseases often associated with consumption of contaminated food or water, about 2 million people die each year, mostly children under 5 years (WHO, 2009). Among infectious diseases, viruses are the main cause of outbreaks related to contaminated water and food in the majority of developed countries where the improvement of sewage treatments has reduced the transmission of most of bacterial pathogens (Craun, 1991; reviewed in Godfree and Farrell, 2005).

Environmental pollution from sewage is confirmed by analyzing the presence of viruses in surface waters (rivers and lakes), in which high percentages of positive samples are noted (reviewed in Girones *et al.*, 2010), and in the frequent cases of viral infections associated with consumption of molluscan shellfish that are observed every year in industrialized countries (Lees, 2000). Enteric viruses in water can remain stable for months or even longer if they are associated with solids, and can accumulate in sediments subsequently resuspended in the water column by natural and artificial processes, facilitating viral spread (Melnick, 1984; Rao *et al.*, 1984; Rzezutka and Cook, 2004). It has been observed in some cases that the current microbiological quality standards do not guarantee the absence of viruses, being isolated in drinking water, surface water, seawater or bivalve molluscan which meet the current bacteriological standards (Vivier *et al.*, 2004; Formiga-Cruz *et al.*, 2002, 2003).

The first part of this Thesis (Chapter I) was designed to aim the study of the prevalence of emerging viruses, mainly hepatitis E virus, through a comparative analysis that allowed us to evaluate changes in excretion patterns of acute hepatitis in eastern Spain and simultaneously assess the presence of new polyomaviruses (Studies 1, 2 and 3). Previous studies developed in our research group had reported the presence of HAV and HEV in sewage collected in the period 1994 – 2002 (Pina *et al.*, 2001; Clemente-Casares *et al.*, 2003), thus, the continuation of these studies would let us determine the dynamics of both pathogens. At the same time, the characterization and prevalence of different circulating strains in the studied population would provide us with the information needed to determine whether HEV is still an emerging pathogen, and if the availability of HAV vaccine and implementation of universal vaccination

programs are having the expected effect compared to the overall improvements at the level of sanitation, implementation of new depuration treatments and sewage treatment plants (STPs). Currently, HEV is considered the most important cause of acute clinical hepatitis among adults in central and south-east Asia, and the second leading cause, behind the HBV, in the middle-west and north Africa (Das *et al.*, 2000; Ghabrah *et al.*, 1995; Gomatos *et al.*, 1996). On the other hand, it is considered that HEV is responsible for fewer number of cases of hepatitis in the United States and other industrialized countries, however, it has recently been reported that HAV is the main agent responsible for these infections (Purcell and Emerson, 2008).

Data from Study 1 show that the presence of HEV in sewage from north-eastern Spain has remained stable over the last decade (30%), while the presence of HAV has dropped considerably, from 57% (1994 – 2002) to 3% (2006 – 2008). This observation would lead to prompt that the decrease in the presence of HAV in sewage could be justified solely for the implementation of an universal vaccination program for children under 12 years, which takes place in Catalonia since 1999 (Oviedo *et al.*, 2009). To test this hypothesis, sewage samples from two geographic regions near the area of study were collected. The Autonomous Community of Valencia and two regions of northern Egypt were selected due to the absence of vaccination programs with high coverage and the characterization as an area of high endemicity for HAV, respectively. The observed data showed that in the absence of a vaccination plan and with the availability of a sanitation system (Valencia), the presence of HAV in sewage showed rates similar to those described in Catalonia, while samples from Egypt showed a high rate of positivity for HAV. Thus, the drastic reduction observed for HAV cannot be justified solely because of the availability and implementation of an effective vaccine, we must consider that the reduction may also be due to improved sanitary conditions in the region. In the period 1992 – 2008, Catalonia experienced a significant increase in the number of sewage treatment plants (91 to 343) and in the total volume of treated raw sewage (from 991,892 to 2,786,871 m³/day). All samples showed high levels of HAdV (10³ GC/mL), values frequently observed in urban sewage. The observed HAV reduction have not had an equivalent effect on the circulation of HEV genotype 3 in the area. The continued circulation of this genotype would be maintained through animal hosts since HEV infections in swine represent an external source of HEV in the human population. Described HEV sequences show a high similarity between the strains identified in sewage and faeces of pigs in the studied area by using samples from slaughterhouse, fact that demonstrate the circulation of such infectious agents between animals and humans living in surrounding areas. In addition, 19 sera samples from patients with acute hepatitis, negative for hepatitis B and C (samples provided by the

Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona), were analyzed. Four of them were detected positive for HEV. The identification of positive HEV patients confirms the presence of these viruses not only in the environment but also in the human population studied. Most of the HEV strains identified were classified as genotype 3, except for two samples (one sewage and one serum) which fell in the genotype 1 group.

Following with the sporadic detection of the non-endemic genotype 1 in the evaluated region, it was decided to deepen about this environmental prevalence in the north-eastern Spain (Study 2). Six urban sewage samples, two samples of urban biosolids and two samples of sludge from a slaughterhouse for cattle and pigs (80% pigs), all positive for HEV, were studied by cloning and sequencing with the purpose of obtaining information about the potential diversity of HEV strains excreted by the population. A total of 101 clones were sequenced and the results showed that most strains identified belong to genotype 3 (74 clones), although genotype 1 was also detected. Two samples of sewage and one biosolid showed strains belonged to genotype 1, while the two slaughterhouse samples resulted to be solely contaminated with genotype 3, as expected. The sequences obtained in samples of animal origin showed a high similarity with strains of human origin previously reported in this study region. The similarity of sequences obtained in the different samples studied (intra-sample) ranges between 89% – 99%. The sporadic circulation of this genotype in industrialized areas is a problem at the level of public health since it has been associated with large outbreaks with high mortality rates. Contamination of food and water through contact with sewage, reclaimed water and biosolids, represents a significant risk to the population. In short, the results obtained show a simultaneous circulation of several strains of HEV in the population of the studied area.

As a brief introduction to Study 3, we have to consider that until 2007 only two polyomaviruses able to infect humans were known; BKPyV and JCPyV. BK polyomavirus was identified in the urine of renal transplant patients (Gardner *et al.*, 1971), while JCPyV was found in the brain of a patient with PML (Padgett *et al.*, 1971). Recently, three new polyomaviruses have been discovered; the KI and WU polyomaviruses were identified in the respiratory tract of children (Allander *et al.*, 2007, Gaynor *et al.*, 2007) and MCPyV was found associated with a rare type of cancer named Merkel cell carcinoma (Feng *et al.*, 2008). Interestingly, two different simian polyomaviruses (LPyV and SV40) have been associated with humans. SV40 has been introduced to humans through infected vaccine with poliovirus, and its role in cancer development in humans has been extensively studied. Previous studies have

not detected the presence of SV40 in urban sewage indicating that, if SV40 is infecting humans, is not being excreted into the environment at detectable concentrations (Bofill-Mas *et al.*, 2000). By contrast, antibodies against LPyV have been detected in human blood samples, suggesting that LPyV also infects humans (Viscidi and Clayman, 2006). It has been also recently described the presence of LPyV viral particles in the peripheral blood of patients with PML (Delbue *et al.*, 2008).

Due to the fact that it has been described a high prevalence of JCPyV and BKPyV in urban sewage from different geographical areas and that it has been suggested that sewage has an important role in the transmission of both pathogens (Bofill-Mas *et al.*, 2000, 2006), it was decided to evaluate the excretion patterns of KIPyV, WUPyV, MCPyV and LPyV in urban sewage samples to determine their environmental prevalence and the role of these viruses as environmental pollutants (Study 3). It was also studied the presence of these pathogens in river water and urine samples from healthy pregnant women.

All analyzed samples showed frequently detected records of human faecal contamination evaluated by quantifying JCPyV (10^2 GC/mL) and HAdV (10^3 GC/mL). The KI and WU polyomaviruses were detected in 1/8 and 2/8 sewage samples, respectively, while MCPyV was detected in 7/8 sewage samples and was the only new polyomavirus present in river water (2/7) and urine (1/4). Although qualitative detection was performed, serial dilutions allowed estimating a concentration of 10 to 100 PDU/mL. None of the sewage samples ($n = 13$) and biosolids ($n = 9$) was tested positive for LPyV. These data represent the first description of the presence of new polyomaviruses KiPyV, WUPyV and MCPyV in the environment and confirm that these new polyomaviruses are found widespread among human populations. The high prevalence of MCPyV suggests that their pattern of excretion is similar to JCPyV and BKPyV. The presence of these viruses in sewage represents a potential route of infection for humans and, to our knowledge, this work is the first description of a virus isolated from sewage and river water with a strong association with cancer.

Sewage is the main source of pathogenic microorganisms that are transmitted through the environment and reach the population by the contamination of the water used in agricultural, industrial, household, recreational and environmental activities (Cliver, 1984). The treatment currently applied to the processed sewage through biological and physicochemical methods has reduced the incidence of disease among the population, especially those from bacterial etiology, but the protozoa and viruses are more resistant than bacteria to many of

these treatments. Significant concentrations of viruses are frequently detected in sewage discharged into the environment and in biosolids generated in STPs (Girones *et al.*, 2010). For this reason, together with the high presence of pathogens observed in the three initial studies, in the Chapter II (Study 4) of this Thesis it was analyzed the spread and efficiency removal of pathogens and faecal indicators in two tertiary sewage treatment plants.

The obtained results show that viruses, bacteria and protozoa were highly detected in each sampling point from the studied STPs. Water samples were fortnightly collected over a period of five months (October 2009 – February 2010) at three different collection points: at the entry point (raw sewage), at the exit point following secondary treatment and at the exit point following tertiary treatment (tertiary reclaimed water). Both STPs are able to depurate 60,000 (STP1) and 45,000 (STP2) m³/day respectively, and receive sewage from a population of around 250,000 inhabitants (located in the Autonomous Community of Valencia). The tertiary treatments included UV disinfection as a tertiary treatment with a dose average of 100 mWs/cm² and in one of them, combined the UV treatment with sand filtration disinfection as well.

Through collaboration between our research group and two other groups with expertise in bacteria and protozoa, located at Polytechnic University of Valencia, the microorganisms analyzed were faecal coliforms and the following groups of viruses: HAdV and JCPyV (both proposed as indicators of human faecal/urine contamination), HAV, HEV, NoV GGI and NoV GGII. The bacterial pathogens analyzed were: *Salmonella* spp., *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter* spp. The protozoan pathogens analyzed were *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. All analyzed pathogens and faecal indicators were detected in each sampling point, except for HEV, JCPyV and *Vibrio vulnificus* that were not detected in tertiary reclaimed water. NoV GGII and JCPyV were quantified by qPCR, showing average concentrations of 10⁴ and 10² GC/mL of raw sewage, respectively. HAdV and *Arcobacter* spp. were evaluated by infectivity assays, showing positive results in the different sampling points, including tertiary reclaimed water.

The removal efficiency of HAdV, *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. was studied by calculating the log reduction through the treatments applied in STPs. The primary treatment is applied mainly to eliminate large material that may pose a problem for the machinery involved in the rest of the cleaning, so that the removal expected for this process is negligible (Fu *et al.*, 2010). On the contrary, the secondary treatment plays an important role in reducing

microorganisms and chemical contaminants. For the above reasons, the primary and secondary treatments were evaluated together. As expected, the samples collected after the combination of the first two treatments showed the biggest drop in the concentration of microorganisms analyzed, showing a reduction from 1,03 to 1,51 log₁₀ for HAdV, 1,99 to 2,56 log₁₀ for *Giardia* spp. and from 1,28 to 1,37 log₁₀ for *Cryptosporidium* spp., reduction equal to 60% – 89% of the estimated total reduction. The application of UV disinfection showed values lower than expected, particularly from 0,04 to 0,13 log₁₀, 0,30 to 0,34 log₁₀ and 0,18 to 0,34 log₁₀ for HAdV, *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp., respectively, equivalent to 2 – 17% of the total. Exceptionally, one of the treatment plants showed a reduction of 40% (0,90 log₁₀) for *Cryptosporidium* spp. The use of sand filters represented a reduction of 4 – 17%. Human adenoviruses quantified by qPCR were detected in 100% of the samples, from 10³ GC/mL in the raw sewage to 10¹ GC/mL in the tertiary reclaimed water. The application of UV and sand filters is required for disinfection and maintenance of water quality, reducing the need for chlorination. However, the data show that due to the high cost associated and the limited effect on reducing the pathogens tested, the treatments currently used should be improved.

The results obtained in this study indicate that the high prevalence and concentration in sewage and reclaimed water of a wide range of pathogens evaluated represents a significant health risk and a current challenge for the development of new sanitation systems. The treatments reduce the presence of HAdV, *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp., pathogens/indicators with high environmental resistance and against treatments, between 1,2 to 3,0 log₁₀, being not enough to ensure an adequate microbiological quality of reclaimed water. The presence of viable pathogens in tertiary reclaimed water that meets the current Spanish regulations (Anonymous, 2007) corroborates the risk to public health and the need to implement new microbiological indicators that would be more restrictive. Furthermore, using logistic regression it was examined the ability of prediction that HAdV offered for the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia*, although there were no good correlations. Nevertheless, despite not being able to predict the presence of both parasites because HAdV was present in all samples analyzed, even in the absence of other pathogens, its high prevalence and concentration suggest a role as protective indicator of faecal contamination.

At this point of the Thesis we have demonstrated the high prevalence of viral, bacterial and protozoa in sewage and reclaimed water, showing that they represent the largest source for the introduction of pathogens in the environment, particularly viral pathogens. Due to the laboriousness and/or high cost associated with current methodology for viral particles

concentration in sewage, in the Study 5 described in Chapter III, we developed a new cost efficient methodology to concentrate virus particles. In order to find a protocol that was easily standardizable, economical and efficient, three different strategies to concentrate HAdV, JCPyV and NoV GGII (as DNA and RNA model viruses) in sewage were addressed.

The first method described (ESMP) consists of an initial elution using a 0,25 N glycine buffer, pH 9,5 (1:2 v/v). The sample (50 mL) is homogenized for 30 min on ice and then centrifuged at 8.000xg for another 30 min at 4 °C. The obtained supernatant (150 mL) is transferred to a new vessel, the pH adjusted to 3,5 using 1N HCl and 1,5 mL of a pre-flocculated skim milk solution is added (final concentration 0,01% (w/v)). The pre-flocculated skim milk solution is prepared according to Calgua *et al.* 2008. Following, the sample is kept under stirring for 8 h at RT to allow the viruses to adhere to the milk flocs. Subsequently, the flocs are precipitated by centrifugation at 8.000xg for 30 min at 4 °C. The supernatant is carefully removed and the pellet is resuspended in 500 µL of a phosphate buffer at pH 7,5.

The second method developed (UF) uses the ultrafiltration as the basic principle for concentration. First, four filters per sample are washed (Millipore Ultrafree®-15 filter, 100,000 MW) with bi-distilled water, centrifuged at 2.000xg for 10 min and the filtrate is discarded from each one of them. For a tested sample, 45 mL of sewage are transferred to 3 pre-washed filters (15 mL per filter), centrifuged at 2.000xg for 1 h at RT and the filtrate is discarded. The viruses are eluted from each filter using 4 mL of 0,25 N glycine buffer at pH 9,5. The viral eluate is transferred to a sterile tube, incubated 30 min at 4 °C (homogenizing every 10 min) and centrifuged at 3.000xg for 30 min at 4 °C. The supernatant is recovered and added to a new pre-washed filter, centrifuged at 2.000xg for 1 h at RT and the liquid retained in the filter (100 µL) containing the viral particles is recovered.

In the last of the developed methods (LF), 50 mL of sewage are frozen at -80 °C and lyophilized for 24 to 36 h. Once the sample is lyophilized, the remaining particles are resuspended in 500 µL of phosphate buffer at pH 7,5.

The new described methods were compared with a protocol based on ultracentrifugation (UC) to concentrate the viral particles present in the sewage. This method has been previously described in our laboratory (Pina *et al.*, 1998a) and has been used for the detection of viral particles in the studies included within the first two chapters of this Thesis.

These four methods were used to evaluate the presence of HAdV, JCPyV and NoV GGII in five urban sewage samples collected in Barcelona. The results showed that the most efficient method for HAdV was ESMP, followed by LF, UF and UC. For JCPyV the higher quantified values were obtained in ESMP, followed by UC, LF and UF. Finally, for NoV GGII the method with highest obtained quantification was ESMP, followed by UC, LF and UF.

Although the four methods studied showed a good performance for the recovery of these three viral species, including DNA and RNA viruses, in the present work we tend to deepen the study of ESMP because this is the proposed method that requires less equipment and presents a fewer economic investment. The CV ($[\text{standard deviation}/\text{mean}] \times 100$) was used as an estimator of the intra-laboratory variability and the results observed were 15,9% for HAdV, 12,2% for JCPyV and 17,4% for NoV GGII. Concerning recovery, ESMP presented values between 30% – 95%, 55% – 90% and 45% – 90% for HAdV, JCPyV and NoV GGII, respectively. Finally, the chosen method was validated by a field study in which 12 composite 24 h-sewage samples were evaluated. The results obtained for the viruses studied were found to be within normal ranges of detection, both in previous studies of this Thesis and in other studies performed previously in our laboratory (Bofill-Mas *et al.*, 2006). The results show that ESMP can be applied in large-scale studies and is a quick methodology, inexpensive and readily standardizable to be applied in routine laboratories and countries with poor economic development. However, if equipment (ultracentrifuge and/or lyophilizator) and sufficient financial resources (mainly to buy the filters) are available, the other proposed alternatives can offer advantages in certain situations because they can provide a faster concentration procedure or a more generalized viral spectrum.

The second main section of this Thesis (Chapters IV and V) focuses on the study of molluscan shellfish as responsible for outbreaks. After verifying the high presence of pathogens in sewage and reclaimed water, it is expected that the bivalve molluscan growing in estuaries, where such water is discharged, present human pathogens.

In the Chapter IV it has performed a large study for the evaluation of the presence of enteric viruses in molluscan shellfish samples collected in a range of regional markets and grocery stores from September to February of 2004 – 2008, via a surveillance system (Food Safety Plan of Catalonia). Among the collected samples, (i) 87 batches of mussels and 30 batches of clams had been harvested in Spanish shellfish-growing areas (Autonomous Community of Galicia and Catalonia, NW and NE Spain, respectively), whereas (ii) 14 batches

of mussels and 20 batches of clams had been imported and harvested in shellfish-growing areas of the EU (Italy, France and Portugal). The evaluation by RT-PCR shows the absence of NoV GGI and HAV among the analyzed samples, while NoV GGII was detected in 13,7% (16/117) of national samples and in 8,8% (3/34) of the samples imported from Europe. During the study period, 16,8% (17/101) of the mussels and 4% (2/50) of clams were positive for NoV GGII. Subsequent statistical analysis showed no significant differences between positives detected according to the origin of the samples, although significant differences regarding the animal species tested were found, being mussels the most contaminated samples by NoV GGII.

Parallel to the market study, ten batches of imported coquina clams (*Donax trunculus*), suspected to be linked to the cases of an HAV outbreak reported in eastern Spain in 2008, were collected from Spanish markets and groceries. The RT-PCR showed that 50% (5/10) of the samples were contaminated with HAV. One of the HAV-positive coquina samples was also positive by qPCR, with an estimated concentration of 10^2 GC/g HP. Sequencing analyses identified the presence of subgenotypes IA and IB, genotypes usually detected in Europe and south America. Subsequent comparative studies, using a positive sewage sample for HAV previously isolated in the same area during the outbreak and in the same period of time (included in Study 1), showed a similarity over 96% – 98,2%. The differences detected between the sequences isolated from the coquina clams and the sewage suggest that both contaminants have different origins.

In addition to the analysis of NoV and HAV, human adenoviruses were quantified by qPCR in a group of 30 samples (24 mussels and 6 clams), ten of which were positive and twenty negative for NoV GGII. The overall results show that 43,3% (13/30) were positive for HAdV. Among the positive samples for NoV GGII, 80% (8/10) were HAdV-positive with an average concentration of 10^3 GC/g HP, while only 25% (5/20) of negative NoV GGII resulted to be also negative for HAdV, with an average concentration of 10^1 GC/g HP. According to the obtained results, a potential correlation between HAdV and NoV GGII was analyzed in order to predict the presence of NoV II by quantitative detection of HAdV, and significant differences between the two groups evaluated were also assessed. The association between HAdV and NoV GGII reflects a sensitivity of 100% and a specificity of 74%.

To elucidate why samples of molluscan shellfish which meet the current European legislation have viral pathogens and to understand how treatments affect the viral load, it was studied the efficiency of microorganism's removal that takes place in current purification

treatments. A total of 40 batches of mussels and 20 samples of seawater used in the purification process, both matrices collected during May-June 2010, were collected from three seafood companies that perform different systems for the purification of shellfish grown in an area classified as type B, according to the European regulations. The treatments used to purify shellfish were: (i) ozone, (ii) venturi system and (iii) ozone combined with UV. Shellfish samples collected before and after depuration were taken from the same batch (24 h) to observe the reduction of microbiological contamination. The presence HAdV was quantified between the selected samples, showing a 70% (14/20) of positives among samples from untreated mussels and 60% (12/20) of positives among the purified ones, with average levels of 10^2 GC/g HP for both types of samples. A 42% (5/12) of samples of seawater used for purification and 50% (6/12) of seawater samples after purification were positive for HAdV, with average concentration values of 10^2 GC/L. Statistical analyses showed no significant differences between samples pre- and post-purified, suggesting that we cannot consider that the different treatments applied have any effect on the presence and concentration of HAdV in the evaluated samples. All samples were negative for NoV, presumably due to the sampling period. NoV infection is associated with the colder months, having a minimal impact during May – June.

Although the analyses by qPCR provide accurate quantitative information, there is no indication about the presence of infectious viral particles among the contaminating viruses. To elucidate this aspect an immunofluorescence assay (IFA) for HAdV based on previous work by our research group was adapted. Specifically, it was performed following the protocol described by Calgua *et al.* (2011). Two HAdV-positive samples from each developed purification treatments were selected, showing a 50% (3/6) of positive samples for this pathogen.

The results indicate that current shellfish depuration systems applied to reduce bacterial indicators do not affect levels of viral contamination and are unable to inform about the presence of food-borne viral pathogens such as HAV and NoV. It also confirms previous studies showing that shellfish complying with EU regulations may be contaminated by viral pathogens such as NoVs (Lees, 2000; Formiga *et al.*, 2002; Romalde *et al.*, 2002; Muniain-Mujika *et al.*, 2003).

In conclusion, the Chapter IV of this Thesis describes the quantitative and qualitative presence of viral contaminants in shellfish from north-east Spanish markets, defining the

abundance of NoVs as contaminants in mussels and clams, as well as the absence of HAV in the common market and the presence in samples potentially related to an outbreak originated from the consumption of frozen clams imported from endemic areas. The overall results indicate that the presence and concentrations of human pathogens in bivalve molluscan represent a challenge for sanitation systems. Simultaneously, it is suggested that HAdV quantified by qPCR may play a role as indicators of faecal contamination, providing a new tool for determining the microbiological quality.

In the latest study included in this Thesis and described in Chapter V (Study 7) it was performed mathematical modeling of the risk of infection (colonization/invasion of a pathogen in a particular body part or tissue) and disease (consequent status of a condition in a living being, characterized by impaired health status) associated with the consumption of oysters contaminated with NoV. This work was done in collaboration with the Department of Zoonoses and Environmental Microbiology (LZO), National Institute of public health and Environment (RIVM), Netherlands, during a 6 month stay in 2008. NoV infections associated with consumption of bivalve molluscan are often described (Ahmed, 1992; Altekruise, *et al.*, 1999). The oysters are contaminated through the filtration of seawater containing viral particles (USFDA, 2001), retaining the virus even after applying the purification treatments. As described for mussels and clams in Chapter IV, oysters that can be considered safe for human consumption as they comply with current European legislation (based on *E. coli*), have high concentrations of NoV (Cheng *et al.*, 2005; Boxman *et al.*, 2006, Nishida *et al.*, 2007) and represent a health risk for the consumer (Lodder-Verschoor *et al.*, 2005). At present, the magnitude of the adverse effect caused by these infections at the level of public health is completely unknown, especially if we consider the secondary infections that occur consequently.

Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) is a new component within the field of food microbiological safety and is quickly increasing interest because of its easy implementation at estimating the risks associated with food microbial contamination (Vose, 1998). Today, QMRA is being applied to set new standards, guidelines and other recommendations for food safety and consumer health. Risk assessment is a useful tool to accurately calculate the probability of infection and disease, and most importantly, establish critical check points for further intervention.

The risk of infection was evaluated in two different scenarios: (i) in the scenario 1 it

was studied the NoV concentration present in oysters from the Oosterchelde estuary (Netherlands), area of production of bivalve molluscan under the current Class A European regulations, while in the (ii) scenario 2 it was used data from a small family outbreak of gastroenteritis identified in 2004, also located in the Netherlands.

The exposure to NoV, or dose (D) due to consumption of oysters depends on (i) the number of infectious NoV in oysters at the time of consumption (C_{cons}) and (ii) the number of oysters consumed per person (N) according with the following equation:

$$D = C_{cons} \times N$$

At the same time, the C_{cons} depends on (i) the number of infectious NoVs per oyster at the moment of harvest (C_{harv}), (ii) the removal of NoVs during depuration (S_{dep}), (iii) the decimal inactivation rate of NoVs per day (δ), (iv) the time period between harvest and consumption (t), (v) the efficiency of the recovery procedures for NoV (R), (vi) the detection limit of the RT-qPCR (λ), and (vii) the fraction of infectious NoVs per oyster (φ) as described by following equation:

$$C_{cons} = C_{harv} \times S_{dep} \times 10^{\delta \times t} \times (1/R) \times \lambda \times \varphi$$

To carry out the developed model and obtain results that tell us about the probabilities of infection and disease, it was needed to collect data to fill the identified gaps. At all times, we tried to implement the model in a balanced manner, considering the potential application for future works.

Estimates of C_{cons} were obtained by taking 10,000 Monte Carlo samples from a gamma distribution applied to the developed mathematical model. The obtained results from RT-qPCR were used to establish the limits and scale the parameters of the gamma distribution. The recovery values (R) of the methods used were unknown, thus it was assumed that the efficiency was 100%, and the effects on final probabilities of infection/illness due to less efficient recoveries were evaluated by a sensitivity analysis. Furthermore, the detection limit (λ) of the RT-qPCR used for the study presented here was also unknown, although studies on the detection of NoV in shellfish describe concentrations ranging 1 – 100 GC/gram, using different protocols (Muniain-Mujika *et al.*, 2003; Vinje *et al.*, 2003; Kou *et al.*, 2006). To estimate the risk of infection associated with NoV it was used a detection limit of 1 PDU.

All oysters used in the study come from class A growing areas according to European legislation, hence, there is no application of purification treatments to try to reduce the microbial load before entering the market. Therefore, the elimination of NoV due to the use of purification treatments is not considered (s_{dep}).

The inactivation rate of NoV (δ) is an extremely difficult parameter to estimate in the absence of cell culture, as it occurs with NoV (Duizer *et al.*, 2004a, 2004b). However, there are viruses of the same family, MNoV and FCV, which can be cultured (Wobus *et al.*, 2004; Buckow *et al.*, 2008). Several studies describe a high stability of these viruses in cell culture and in faecal suspensions, showing inactivation of less than one log after being 14 and 40 days in these matrices at 4 °C, respectively (Duizer *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2008a). Considering that the European regulations recommend a transport and storage temperatures from 4 to 7 °C and that oysters are a product with high turnover once they have reached the point of sale, for the implementation of this model it was assumed that inactivation did not happen for NoV between the time of collection and consumption. Regarding the fraction of infectious viral particles (φ) detected by RT-qPCR, this was assigned with the value 1.

The average number of oysters consumed per person in this study was assessed by doing a web survey of 25 menus from different restaurants in The Netherlands regarding the size of oyster servings, as well as the use of bibliographic material (Lowther *et al.*, 2010). As part of sensitivity analysis, we estimated the risk of infection from the ingestion of 1 to 20 oysters. For each oyster included in the analysis it was randomly assigned a concentration of NoV from the C_{harv} distribution.

Teunis *et al.* (2008) described a dose-response relationship to estimate the probability of infection and the conditional probability of becoming ill after being infected. Both models were applied in the study. The likelihood of infection by infectious particles of NoV as a result of the dose can be described as follows (Teunis *et al.*, 2008):

$$f(D; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta; -D)$$

Where D represents the number of viruses ingested during an event of oyster consumption, α and β parameters characterize the infectivity and ${}_1F_1$ is a confluent hypergeometric function (Teunis *et al.*, 2008). The dose-response relationship for the conditional probability of disease when an individual is infected is described in terms of the

following formula (Teunis *et al.*, 2008). Where η and r were described in a previous study (Teunis *et al.*, 1999).

$$h(D|\eta, r) = 1 - (1 + \eta D)^{-r}$$

The results obtained show that NoV GGII was detected in 6,3% (4/63) of the oysters harvested in the Oosterchelde estuary, with an estimated concentration of 7 PDU/oyster, while 33% (3/9) of the oysters from the disease outbreak were positive, showing a concentration of 17 PDU/oyster. The risk of infection associated with consumption of oysters from the scenario 1 was 33%, ranging from 8,4 to 49% depending on the number of oysters consumed (1 – 20 units). The probability of finding one contaminated oyster after eating 6 oysters is a 29%. For scenario 2, the risk of infection after the ingestion of 6 oysters was estimated at 51%, ranging from 47 to 54% in relation to an intake of 1 to 20 oysters. For estuary samples, the likelihood of becoming ill after being infected was 11%, ranging from 0,7 to 27%, while for scenario 2, the probability of illness was estimated at 31%, ranging between 21 – 36%.

The effect caused on the probability of infection due to variability in the recovery processes of viral particles, nucleic acids extraction and detection of NoV was evaluated by a sensitivity analysis and considering an intake of 6 oysters. The calculations show that the probability of infection varies from 37% (40% recovery) to a 33% (100% recovery) for the scenario 1, and 54% (40% recovery) to a 51% (100% recovery) for scenario 2.

In conclusion, in the Study 7 it was evaluated the risk of infection and disease associated with the consumption of oysters ($n = 6$) contaminated with NoV. The risk of infection for scenario 1 is 33% and for scenario 2 is 51%. The risk of illness associated with these infections is 11% and 31% for each scenario, respectively. During the elaboration of this study it has been identified points that lack necessary information to make an accurate risk assessment, including the recovery efficiency, the detection limit of RT-qPCR and the variation in the concentration of NoV among seafood producer zones classified in different classes (A – C). Obtaining such information will improve future risk assessments for NoV. The present developed model can be used in other scenarios that are willing to estimate the risks associated with consumption of bivalve molluscan contaminated with NoV, besides, quantitative information obtained from other batches of seafood can be easily implemented.

As a general conclusion of this Thesis we can say that there is a high prevalence of virus in the environment, causing a major public health impact and economic losses mainly through the transmission of viruses by water and food. The control of environmental viral contamination requires the standardization of concentration and detection techniques and the development of a monitoring program designed to assess viral parameters and reduce the spread of established diseases and emergent viral infections. With all this, we can consider that the present Thesis has contributed to the study of different human pathogenic viruses that can be transmitted to population through contaminated food or water, providing data on the efficiency of virus removal in sewage treatment plants that produce reclaimed water and in bivalve molluscan treatment plants. Improved methodologies and a new method for viral concentration from sewage have been proposed. Finally, we have developed a mathematical model to predict the associated risk of infection and illness due to consumption of NoV-contaminated bivalve molluscan shellfish.

6. CONCLUSIONES

Los objetivos desarrollados en esta Tesis han dado lugar a una serie de resultados publicados o en fase de publicación, concluyendo los siguientes puntos:

- 1) La prevalencia de HEV en muestras de agua residual se ha establecido en un 30% (22/73) en los últimos años, demostrando que HEV está circulando entre la población de España y que el agua residual representa un foco de infección para este patógeno.
- 2) La presencia esporádica del genotipo 1 de HEV, no endémico y patógeno humano exclusivo, reafirman la hipótesis de la amplia distribución de los genotipos de HEV. Este genotipo representa un riesgo importante para salud pública ya que es responsable de brotes epidémicos con tasas de mortalidad elevadas, especialmente para mujeres embarazadas.
- 3) No se observan diferencias significativas en el patrón de excreción de HAV al comparar las aguas residuales de dos áreas geográficas limítrofes dónde existen planes de vacunación distintos y niveles de saneamiento equivalentes, de manera que se presume que la reducción drástica en los niveles de HAV observada durante la última década no se debe a la aplicación de un programa de vacunación de amplia cobertura sino a la implementación de tratamientos de agua residual y estaciones depuradoras, así como a las mejoras en sanidad.
- 4) Los resultados obtenidos sugieren que HEV ha reemplazado a HAV como la hepatitis vírica transmitida a través agua contaminada más abundante en nuestra área.
- 5) Los nuevos poliomavirus KI (1/8), WU (2/8) y MC (7/8) han sido detectados en agua residual, MCPyV (2/7) también en agua de río, indicando que pueden ser diseminados a través de la contaminación por heces/orina del agua y potencialmente transmitidos por la ruta fecal-oral. A nuestro conocimiento, este trabajo representa la primera descripción de virus en agua residual y agua de río asociado con cáncer.
- 6) A pesar de la actual implementación de normativa específica que regula a la calidad microbiológica del agua regenerada y sus potenciales usos, la prevalencia y concentraciones de patógenos humanos (virus, bacterias y protozoos) en agua regenerada es elevada y representa un reto para los sistemas de saneamiento.
- 7) Las estaciones depuradoras de agua residual estudiadas reducen significativamente la presencia de HAdV ($1,03 - 1,51 \log_{10}$), *Cryptosporidium* ($1,99 - 2,56 \log_{10}$) y *Giardia* ($1,28 - 1,37 \log_{10}$), evaluados como indicadores de contaminación fecal de elevada resistencia. No obstante, el hecho que la reducción debida exclusivamente a los tratamientos terciarios sea poco significativa y que se hayan detectado patógenos viables en el agua regenerada, sugiere consistentemente que los tratamientos aplicados deben perfeccionarse.
- 8) Mediante diferentes aproximaciones técnicas (ultrafiltración, floculación orgánica y liofilización), se han desarrollado tres nuevos métodos para concentrar partículas víricas en agua residual. El método seleccionado presenta un reducido coste económico, buena repetitividad (CV = 12 – 16%) y alta eficiencia de recuperación (30 – 95%). El método propuesto se basa en la floculación orgánica y es fácilmente estandarizable en laboratorios de rutina y países de reducido desarrollo económico.

- 9) Se ha descrito la presencia cualitativa y cuantitativa de NoV GGII (19/151) y HAV (5/10) en muestras de moluscos bivalvos de mercado recolectados a través de un programa de vigilancia epidemiológica y muestras vinculadas a un brote de hepatitis A, respectivamente. Reafirmando la presencia de patógenos víricos en muestras que cumplen las normativas vigentes.
- 10) Se ha evaluado la eficiencia de tres tratamientos de depuración de moluscos bivalvos (UV, venturi y Ozono-UV) utilizando a HAdV como indicador de la contaminación fecal, y se ha comprobado que son ineficientes a la hora de reducir la presencia de partículas víricas. Se ha detectado la presencia de HAdV infecciosos (3/6) en muestras depuradas mediante los distintos tratamientos evaluados, evidenciando el potencial riesgo asociado al consumo de moluscos bivalvos crudos o poco cocinados.
- 11) Se ha descrito una correlación estadísticamente significativa entre la identificación de muestras de moluscos bivalvos positivos para HAdV y para NoV GGII, mostrándose valores elevados de sensibilidad (100%) y especificidad (74%) de HAdV respecto la presencia de NoV GGII.
- 12) Los adenovirus humanos cuantificados por qPCR representan una herramienta rápida y efectiva para identificar la presencia de contaminación fecal de origen humano en muestras de agua y alimentos (moluscos bivalvos). Los datos obtenidos muestran que los indicadores bacterianos clásicos no reflejan la presencia de virus entéricos humanos.
- 13) Utilizando modelos de dosis-respuesta se ha modelizado matemáticamente el riesgo de infección y enfermedad por NoV asociado al consumo de ostras crudas. El modelo se evaluó con datos obtenidos a partir de muestras procedentes de áreas de cultivo holandesas (4/63) y vinculadas a un pequeño brote de gastroenteritis (4/9) que tuvo lugar también en Holanda. Los resultados muestran elevadas probabilidades de infección (8 – 54%) y enfermedad (1 – 36%) en función del número de ostras ingeridas (1 – 20), aunque se desconoce el impacto que puedan llegar a tener a nivel de salud pública debido a las infecciones secundarias producidas a partir de aquí. El modelo elaborado puede ser implementado fácilmente con otros patógenos o especies de moluscos bivalvos.

The objectives developed in this Thesis have led to obtain results already published or under publication, concluding the following points:

- 1) The prevalence of HEV in sewage samples has been established by 30% (22/73) in recent years, demonstrating that HEV is circulating among the population of Spain and that sewage is a source of infection for this pathogen.
- 2) The occasional presence of HEV genotype 1, non-endemic and exclusive human pathogen, confirm the hypothesis about the wide distribution of the HEV genotypes. This genotype represents a significant risk to public health and is responsible for outbreaks with high mortality rates, especially for pregnant women.
- 3) No significant differences in the excretion patterns of HAV by comparing sewage from two areas with different vaccination programs and equivalent levels of sanitation were observed, thus, the drastic reduction observed in the levels of HAV during the last decade is suggested not to be due to the implementation of a universal vaccination program but due to the implementation of sewage treatment and sewage treatment plants, such as to improvements in healthcare.
- 4) The obtained results suggest that HEV has replaced HAV as the viral hepatitis transmitted through contaminated water more frequently detected in our area.
- 5) The new polyomaviruses KI (1/8), WU (2/8) and MC (7/8) have been detected in sewage, MCPyV (2/7) also in river water, indicating that they can be potentially spread through faecal/urine contaminated water and through the faecal-oral route. To our knowledge, this work represents the first description of a virus isolated from sewage and river water strongly associated with cancer.
- 6) Despite the current implementation of specific regulations governing the microbiological quality of regenerated water and its potential uses, the prevalence and concentrations of human pathogens (viruses, bacteria and protozoa) in reclaimed water is high and represents a challenge for sanitation.
- 7) The studied sewage treatment plants significantly reduced the presence of HAdV (1,03 – 1,51 \log_{10}), *Cryptosporidium* (1,99 – 2,56 \log_{10}) and *Giardia* (1,28 – 1,37 \log_{10}), evaluated as indicators of faecal contamination of high resistance. However, the exclusively observed reduction due to the tertiary treatment is not significant and viable pathogens were detected in the tertiary reclaimed water, strongly suggesting that treatments should be improved.
- 8) By different technical approaches (ultrafiltration, lyophilization and organic flocculation), three new methods for concentrating virus particles from sewage have been developed. The selected method is a low-cost procedure and shows reproducible results (CV = 12 – 16%) and efficient recovery values (30 - 95%). The selected method is based on organic flocculation and is easily standardizable in routine laboratories and countries with poor economic development.
- 9) The qualitative and quantitative presence of NoV GGII (19/151) and HAV (5/10) have been described in market bivalve molluscan shellfish samples through an epidemiological surveillance program and linked to an outbreak of hepatitis A, respectively. Reaffirming the presence of viral pathogens in samples that meet the current regulations.

- 10) The effectiveness of three depuration treatments of bivalve molluscs were evaluated using a HAdV as an indicator of faecal contamination and were proven to be inefficient in reducing the presence of virus particles. It has been detected the presence of infectious HAdV particles (3/6) in depurated samples applying the different evaluated treatments, demonstrating the potential risk associated with consumption of raw molluscan shellfish or undercooked.
- 11) It has been described a statistically significant correlation between the identification of bivalve shellfish samples positive for HAdV and NoV GGII, showing high levels of sensitivity (100%) and specificity (74%) of HAdV respect to the presence of NoV GGII.
- 12) Human adenoviruses quantified by qPCR are a quick and effective tool to identify the presence of faecal pollution of human origin in samples of water and food (bivalve molluscan). The data obtained show that the classical bacterial indicators do not reflect the presence of human enteric viruses.
- 13) Using dose-response models, the risk of NoV infection and disease associated with consumption of raw oysters has been modeled mathematically. The model was evaluated with data obtained from samples from Dutch farming areas (4/63) and linked to a small outbreak of gastroenteritis (4/9) that occurred also in the Netherlands. The results show high probabilities of infection (8 – 54%) and disease (1 – 36%) depending on the number of ingested oysters (1 – 20), although it is unknown at what extent they may have reached the level of public health due to secondary infections produced from here. The model developed can be implemented easily with other pathogens or species of bivalve molluscan.

7. REFERENCIAS

REFERENCIAS

-A-

Abad FX, Pinto RM, Gajardo R, Bosch A. Viruses in mussels: public health implications and depuration. *J. Food Prot.* 1997a; 60(6):677-81.

Abad FX, Pintó RM, Villena C, Gajardo R, Bosch A. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1997b; 63(8):3119-22.

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(3):447-75.

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.* 1969; 119(6):668-73.

AESAN [Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición]. Retirada de coquinas/tellinas procedentes de Perú. 2008. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/retirada_coquinas.shtml

Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15:9-20.

Aggarwal R, McCaustland KA, Dilawari JB, Sinha SD, Robertson BH. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Res.* 1999; 59(1):35-48.

Agnès F, Crance JM, Lévêque F. Separate detection of the two complementary RNA strands of hepatitis A virus. *J Virol Methods.* 1994; 49(3):323-30.

Ahmed, F.E. Review: assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with micro-organisms parasites and natural toxins in the US. *Food Sci Technol Int.* 1992; 27:243-260.

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol.* 2006; 40(23):7416-22.

Albinana-Gimenez N, Miagostovich MP, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 2009; 43(7):2011-9.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007; 81(8):4130-6.

Altekruse SF, Yang S, Timbo BB, Angulo FJ. A multi-state survey of consumer food-handling and food-consumption practices. *Am J Prev Med.* 1999; 16(3):216-21.

Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer.* 2008; 113(9):2549-58.

Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000; 181(2):336-48.

Anónimo, 1991. Council directive of 22nd July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). *Off. J. Eur. Communities L*, 268:1-13.

Anónimo, 1992. B.O.E. 288/1992: Real Decreto 1315/1992, de 30 de octubre por el que se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril. Pp. 40563-40565.

Anónimo, 1993. Real Decreto 308/1993, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. B.O.E. nº 74:9386- 9394.

Anónimo, 1999. Real Decreto 571/1999, de 9 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. B.O.E. Nº 86:13522-1353.

Anónimo, 2000. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

Anónimo, 2003. Decisión de la Comisión de 30 de octubre de 2003 por la que se aprueban algunos tratamientos para inhibir la proliferación de microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos y los gasterópodos marinos. DO L283:78-80.

Anónimo, 2004a. Regulation (EC) 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. Eur. Communities L*, 226:22-82.

Anónimo, 2004b. Regulation (EC) 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. Eur. Communities L*, 226:22-82.

Anónimo, 2004c. Regulation (EC) 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities L*, 226:83-127.

Anónimo, 2005. Ley 11/2005 de 22 de junio publicada en el BOE número 149 de 23/06/2005 en la que se exponen las deficiencias ambientales y económicas del proyecto y mediante la cual se modifica la ley 10/2001 de 5 de julio del Plan Hidrológico Nacional

Anónimo, 2006. Commission Regulation (EC) nº 1666/2006 amending Regulation (EC) nº 2076/2005 laying down transitional arrangements for the implementation of Regulations (EC) nº 853/2004, (EC) nº 854/2004 and (EC) nº 882/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Communities L*, 320:47-49 18.11.06.

Anónimo, 2007. B.O.E. 294/2007: Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Pp. 50639-50661.

Anónimo, 2008. Commission regulation (EC) nº 1021/2008 of 17 October 2008 amending Annexes I, II and III to Regulation (EC) nº 854/2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption and Regulation (EC) No 2076/2005 as regards live bivalve molluscs, certain fishery products

and staff assisting with official controls in slaughterhouses. *Off. J. Eur. Communities L*, 277: 15-17.

Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis.* 1991; 13(3):448-61.

Arankalle VA, Chobe LP. Hepatitis E virus: can it be transmitted parenterally? *J Viral Hepat.* 1999; 6(2):161-4.

-B-

Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol.* 2011; 34(1):1-8.

Bader TF, Krawczynski K, Polish LB, Favorov MO. Hepatitis E in a U.S. traveler to Mexico. *N Engl J Med.* 1991; 325(23):1659.

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983; 20(1):23-31.

Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 1997; 4:155-65.

Barbuddhe SB, Chakraborty T. Listeria as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 337:173-95.

Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *Hosp Infect.* 2004; 58(1):42-9.

Bavaro MF. Escherichia coli O157: what every internist and gastroenterologist should know. *Curr Gastroenterol Rep.* 2009; 11(4):301-6.

Baylis SA, Finsterbusch T, Bannert N, Blümel J, Mankertz A. Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine.* 2011; 29(4):690-7.

Becker JC. Merkel cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2010; 21(7):81-5.

Berger JR, Kaszovitz B, Post MJ, Dickinson G. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. A review of the literature with a report of sixteen cases. *Ann Intern Med.* 1987; 107(1):78-87.

Berke T, Matson DO. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol.* 2000; 145:1421-36.

Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *J Food Prot.* 2012; 75(2):408-18.

Bialasiewicz S, Lambert SB, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(3):492-4.

Bishop NE, Anderson DA. Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch Virol.* 1997b; 142(11):2161-78.

Bishop NE, Anderson DA. Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids. *Arch Virol.* 1997a; 142(11):2147-60.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2(7841):1281-3.

Black PH, Rowe WP, Turner HC, Huebner RJ. A specific complement-fixing antigen present in sv40 tumor and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1963; 50:1148-56.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(12):7894-6.

Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol.* 2001; 75(21):10290-9.

Bofill-Mas S, Hundesa A, Calgua B, Rusiñol M, de Motes CM, Girones R. Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. *J Vis Exp.* 2011; (58):2820

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(1):238-45.

Boher S, Piclet G, Beril-Stien S, Masson D, Delonce R, Biziagos E, Schwartzbrod L. Viral contamination and depuration of oysters under field conditions. Conference Internationale sur la Purification des Coquillages, Rennes (France), 6-8 Apr. 1992. Disponible en: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1615/>

Borchardt MA, Bradbury KR, Gotkowitz MB, Cherry JA, Parker BL. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ Sci Technol.* 2007; 41:6606-12.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19(3):295-301.

Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pintó RM. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci Technol.* 2001; 43(12):61-5.

Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MC, de Roda Husman AM, Poel WH. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res.* 2009; 4:5-7.

Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108(3):391-6.

Bradley DW, Balagan MS. Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* 1988; 1(8589):819.

Bradley DW, Krawczynski K, Cook EH, McCaustland KA, Humphrey CD, Spelbring JE, Myint H, Maynard JE. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease associated 27 to 34 nm virus like particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(17):6277-81.

Bradley DW. Hepatitis E: epidemiology, aetiology and molecular biology. *Rev Med Virol*. 1992; 2(1):19-28.

Breitenmoser A, Fretz R, Schmid J, Besl A, Etter R. Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater-contaminated water supply, Switzerland, 2008. *J Water Health*. 2011; 9(3):569-76.

Brodsky JL, Pipas JM. Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol*. 1998; 72(7):5329-34.

Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol*. 1975; 102(4):331-40.

Brownell MJ, Harwood VJ, Kurz RC, McQuaig SM, Lukasik J, Scott TM. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. *Water Res*. 2007; 41(16):3747-57.

Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL, Caul EO, Mukerjee AK. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol Infect*. 1999; 122(1):145-54.

Buckow R, Isbarn S, Knorr D, Heinz V, Lehmacher A. Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(4):1030-8.

Buti M, Domínguez A, Plans P, Jardí R, Schaper M, Espuñes J, Cardeñosa N, Rodríguez-Frías F, Esteban R, Plasència A, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(12):1328-32.

Buti M, Jardí R, Cotrina M, Rodríguez-Frías F, Troonen H, Viladomiu L, Esteban JI, Esteban R, Guardia J. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Methods*. 1995; 55:49-54.

-C-

Cacciò SM. Molecular techniques to detect and identify protozoan parasites in the environment. *Acta Microbiol Pol*. 2003; 52:23-34.

Calci KR, Meade GK, Tezloff RC, Kingsley DH. High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(1):339-43.

Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J Virol Methods*. 2011; 171(1):1-7.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones

AP, López-Pila JM, Girones R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods*. 2008; 153(2):79-83.

Candela L, Fabregat S, Josa A, Suriol J, Vigués N, Mas J. Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: application in a golf course (Girona, Spain). *Sci Total Environ*. 2007; 374(1):26-35.

Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio*. 2011, 4:2(5).

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Appl Microbiol*. 2005; 98(6):1354-80.

CCA [Comisión del Codex Alimentarius]. Principios y Directrices para la Aplicación de la Evaluación de Riesgos Microbiológicos. Documento CAC/GL-30. 1999. Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf

CDCP [Center for Disease Control and Prevention]. Licensure of inactivated hepatitis A vaccine and recommendations for international travelers' use. *JAMA*. 1995; 274(8):603.

Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, Curry A, O'Brien S, Quigley K, Sellwood J, Westmoreland D. Management of hospital outbreaks of gastroenteritis due to small roundstructured viruses. *J Hosp Infect*. 2000; 45(1):1-10.

Charles MD, Holman RC, Curns AT, Parashar UD, Glass RI, Bresee JS. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25(6):489-93.

Cheng PK, Wong DK, Chung TW, Lim WW. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol*. 2005; 76(4):593-7.

Christensen BF, Lees D, Wood KH, Bergskow T, Green J. Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 19996/97. *J Shellfish Res*. 1998; 17(5):1633-35.

Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martín M, Bofill-Mas S, Girones R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(4):448-54.

Cliver DO. Significance of water and the environment in the transmission of virus disease. En: Melnick JL, eds. Monographs in Virology, 15. Nueva York: Karger Basel, 1984:30-42.

Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987a; 84(8):2497-501.

Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol*. 1987b; 61(1):50-9.

Cole CN, Conzen SD. Polyomaviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001; 2141-74.

Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis.* 1980; 142(1):1-8.

Colford JM Jr, Wade TJ, Schiff KC, Wright CC, Griffith JF, Sandhu SK, Burns S, Sobsey M, Lovelace G, Weisberg SB. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology.* 2007; 18(1):27-35.

Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Croonenberghs R, O'Keefe S, Lindsay DS. The effect of high-pressure processing on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally exposed Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Eukaryot Microbiol.* 2005; 52(6):500-4.

Cooper PF. Historical aspects of wastewater treatment. En: Decentralized sanitation and reuse concepts, systems and Implementation. Lens P, Zeeman G, Lettinga G, eds. IWA Publishing. London (UK). 2001;11-38.

Corbo MR, Bevilacqua A, Campaniello D, D'Amato D, Speranza B, Sinigaglia M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review. *Int J Food Sci Technol.* 2009; 44(2):223-41.

Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casane D, Colina R, Garcia L, Vega I, Glikman G, Romanowsky V, Castello A, Nicand E, Gassin M, Billaudel S, Ferré V. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol.* 2002; 76(18):9516-25.

Costa-Mattioli M, Ferre V, Monpoeho S, Garcia L, Colina R, Billaudel S, Vega I, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *J Gen Virol.* 2001a; 82(11):2647-52.

Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Schvoerer C, Besse B, Aleman MH, Billaudel S, Cristina J, Ferré V. Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *J Med Virol.* 2001b; 65(2):233-40.

Craig AS, Schaffner W. Prevention of hepatitis A with the hepatitis A vaccine. *N Engl J Med.* 2004; 350(5):476-81.

Craun GF. Waterborne disease outbreaks in the United States of America: causes and prevention. *World Health Stat Q.* 1992; 45(2-3):192-9.

Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007; 127(2):151-7.

Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Divizia M, Donia D, Cosentino AM, Moretti P, Costantini G. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(2):293-8.

Croci L, De Medici D, Franco E, Gabrielli R, Dipasquale S, Toti L. Viral depuration of *Mytilus galloprovincialis* in ozone treated water. 2. Conference Internationale sur la Purification des Coquillages, Rennes (France), 6-8 Apr 1992. Disponible en: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1610/>

-D-

Das K, Agarwal A, Andrew R, Frösner GG, Kar P. Role of hepatitis E and other hepatotropic virus in aetiology of sporadic acute viral hepatitis: a hospital based study from urban Delhi. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(10):937-40.

David ST, McIntyre L, MacDougall L, Kelly D, Liem S, Schallié K, McNabb A, Houde A, Mueller P, Ward P, Trottier YL, Brassard J. An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne Pathog Dis.* 2007; 4(3):349-58.

Dawson GJ, Mushahwar IK, Chau KH, Gitnick GL. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveler to Pakistan. *Lancet.* 1992; 340 426-27.

de Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D, Ruiz-Fons F, Martín M, Gortázar C, Segalés J. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol.* 2008; 129(1-2):163-70.

de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martín M, Segalés J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol.* 2007; 119(2-4):105-14.

Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med.* 1967; 125(4):673-88.

Delbue S, Tremolada S, Branchetti E, Elia F, Gualco E, Marchioni E, Maserati R, Ferrante P. First identification and molecular characterization of lymphotropic polyomavirus in peripheral blood from patients with leukoencephalopathies. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(7):2461-2.

Di Girolamo R, Liston J, Matches J. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl Environ Microbiol.* 1977; 33(1):19-25.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972; 140(2):578-83.

Dominguez A, Vidal J, Bruguera M, Salleras LI. Epidemiología de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995; 13 (Supl. 1):50-61.

Doorn MRJ, Towprayoon S, Maria S, Vieira M, Irving W, Palmer C, Pipatti, R, Wang C. Wastewater treatment and discharge. En: IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories volume 5. (Waste). WMO, UNEP. 2006; 1-6, 28.

Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect.* 1999;41 (1):51-7.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2004a; 70(8):4538-43.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol.* 2004b; 85(1):79-87.

-E-

EFSA [European Food Safety Authority]. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*. 2011; 9(7):2190-96. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2190.htm>

Elimelech M. The global challenge for adequate and safe water. *J. Water. Suppl.: Res. Technol.-AQUA*. 2006; 55:3-10. Disponible en: http://www.yale.edu/env/elimelech/Research_Page/sanitation/Sanitation_Presentation_1.pdf

Emerson SU, Huang YK, Purcell RH. 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology*. 1993; 194(2):475-80.

Emerson SU, Purcell RH. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med*. 2001; 7(10):462-6.

Enders JE, Bell JA, Dingle JH, Francia T, Hillemann RJ, Huebner RJ, Payne AMM. "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 1956; 124(3212):119-20.

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res*. 2008; 42(10-11):2618-28.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989; 53(4):410-49.

Evans MR, Meldrum R, Lane W, Gardner D, Ribeiro CD, Gallimore CI, Westmoreland D. An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiol Infect*. 2002; 129(2):355-60.

-F-

FAO/OMS [Food and Agriculture Organization/Organización Mundial de la Salud]. Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua: directrices. 2003. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/spanish.pdf>

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol*. 2000; 30(12-13):1305-22.

Fayer R. Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*. 2004; 126(1-2):37-56.

Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol*. 2008; 123(1-2):32-7.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973; 182(116):1026-8.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel

cell carcinoma. *Science*. 2008; 319(5866):1096-100.

Fiore AE, Shapiro CN, Sabin K, Labonte K, Darling K, Culver D, Bell BP, Margolis HS. Hepatitis A vaccination of infants: effect of maternal antibody status on antibody persistence and response to a booster dose. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(4):354-9.

Fix AD. Prevalence of antibodies to hepatitis e virus in rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 62:519-523.

Fluck MM, Schaffhausen BS. Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73(3):542-63

Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(3):1556-63.

Formiga-Cruz M, Tofiño-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Conden-Hansson AC, Hernroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones MD, Girones R. Distribuion of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweeden and the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68(12):5990-5998.

Fu CY, Xie X, Huang JJ, Zhang T, Wu QY, Chen JN, Hu HY. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Sci Technol*. 2010; 61(6):1589-99.

Fumian TM, Guimarães FR, Pereira Vaz BJ, da Silva MT, Muylaert FF, Bofill-Mas S, Gironés R, Leite JP, Miagostovich MP. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 2010; 8(3):438-45.

Fumian TM, Leite JP, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res*. 2011; 45(17):5755-63.

-G-

Galmés Truyols A, Duran JG, Riutort AN, Cerdá GA, Isabel CB, Arbona MP, Berga JV. Norovirus outbreak in Majorca (Spain) associated with oyster consumption. *Gac Sanit*. 2011; 25(2):173-5.

Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*. 1998; 12(15):2293-304.

Gantzer C, Maul A, Audic JM, Schwartzbrod L. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and Bacteroides fragilis phages in treated wastewater. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(11):4307-12.

Gard S. Method for detecting poliomyelitic virus in sewage and stools. *J Exp Med*. 1940; 71(6):779-85.

- Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B.** New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971; 1(7712):1253-7.
- Gauss-Müller V, Kusov YY.** Replication of a hepatitis A virus replicon detected by genetic recombination in vivo. *J Gen Virol*. 2002; 83(9):2183-92.
- Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D.** Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 2007; 3(5):64.
- Gerba CP, Farrah SR, Goyal SM, Wallis C, Melnick JL.** Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Appl Environ Microbiol*. 1978; 35(3):540-8.
- Gerba CP, Haas CN.** Assessment of Risks Associated with Enteric Viruses in Contaminated Drinking Water 976. ASTM Special Technical Publication, 1988; 489-94.
- Ghabrah TM, Stickland GT, Tsarev S, Yarbough P, Farci P, Engle R, Emerson S, Purcell R.** Acute viral hepatitis in Saudi Arabia: seroepidemiological analysis, risk factors, clinical manifestations, and evidence for a sixth hepatitis agent. *Clin Infect Dis*. 1995; 21(3):621-7.
- Gibson CJ, Haas CN, Rose JB.** Risk assessment of waterborne protozoa: current status and future trends. *Parasitology*. 1999; 117:205-12.
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S.** Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res*. 2010; 44(15):4325-39.
- Glass RI, Noel J, Mitchell D, Herrmann JD, Blacklow NR, Pickering LK, Dennehy P, Ruiz-Palacios G, de Guerrero ML, Monroe SS.** The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol Suppl*. 1996; 12:287-300.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK.** Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2009; 361(18):1776-85.
- Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T.** Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(3):489-91.
- Goldstein ST, Alter MJ, Williams IT, Moyer LA, Judson FN, Mottram K, Fleenor M, Ryder PL, Margolis HS.** Incidence and risk factors for acute hepatitis B in the United States, 1982-1998: implications for vaccination programs. *J Infect Dis*. 2002; 185(6):713-9.
- Godfree A, Farrell J.** Processes for managing pathogens. *J Environ Qual*. 2005; 34(1):105-13.
- Gomatos PJ, Monier MK, Arthur RR, Rodier GR, el-Zimaity D, Hassan NF, Quinti I, el-Sahly AD, Sultan Y, Hyams KC.** Sporadic acute hepatitis caused by hepatitis E virus in Egyptian adults. *Clin Infect Dis*. 1996; 23(1):195-6.
- González A, Botella S, Montes RM, Moreno Y, Ferrús MA.** Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain. *J Food Prot*. 2007; 70(2):341-7.

Goudsmit J, Baak ML, Sletterus KW, Van der Nooraa J. Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 283(6303):1363-4.

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Nooraa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. 1982; 10(2):91-9.

Graff J, Normann A, Feinstone SM, Flehmig B. Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol*. 1994; 68(1):548-54.

Grassi T, Bagordo F, Idolo A, Lugoli F, Gabutti G, De Donno A. Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. *Environ Monit Assess*. 2010; 164(1-4):199-205.

Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, Lin FY. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis*. 2002; 185(2):133-46.

Green M, Pina M. Biochemical studies on adenovirus multiplication, IV. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Virology*. 1963; 20:199-207.

Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953; 83(2):414-21.

Guerin JL, Gelfi J, Dubois L, Vuillaume A, Boucraut-Baralon C, Pingret JL. A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *J Virol*. 2000; 74(10):4523-9.

Guillois-Bécel Y, Couturier E, Le Saux JC, Roque-Afonso AM, Le Guyader FS, Le Goas A, Pernès J, Le Behec S, Briand A, Robert C, Dussaix E, Pommepuy M, Vaillant V. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. *Euro Surveill*. 2009; 14(10). pii:19144.

Guimarães FR, Ferreira FF, Vieira CB, Fumian TM, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(8):819-23.

Gutierrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernandez-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311(3):759-66.

-H-

Haas CN. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am J Epidemiol*. 1983; 118:573-82.

Haas CN, Rose JB, Gerba CP. Quantitative microbial risk assessment. Nueva York, NY: John Wiley and Sons. 1999

Häfliger D, Hübner P, Lüthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol*. 2000; 54(1-2):123-6.

- Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY, Huang YS, Hu SL.** An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis.* 1991; 164(5):852-9.
- Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G.** Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(5):3284-90.
- Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ.** Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol.* 2001; 82(10):2449-62.
- Harrison TJ.** Hepatitis E virus- an update. *Liver.* 1999; 19(3):171-6.
- Hart CA, Cunliffe NA, Nakagomi O.** Diarrhoea caused by viruses. En; Cook GC, Zumla AI, eds. *Manson's tropical diseases*, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA. 2009; 815–24.
- Harwood VJ, Gandhi JP, Wright AC.** Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *J Microbiol Methods.* 2004; 59(3):301-16.
- Havelaar AH, Hogeboom WH.** A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J Appl Bacteriol.* 1984; 56(3):439-47.
- Havelaar AH, Hogeboom WH.** F-specific RNA bacteriophages as model viruses in water hygiene: ecological aspects. *Water Sci Technol.* 1988; 20(11-12):399-407.
- Havelaar AH.** A bacteriophage standard for bathing waters. Final report, Commission of the European Communities. 1993; B4:3040/92/012609.
- He J, Innis BL, Shrestha MP, Clayson ET, Scott RM, Linthicum KJ, Musser GG, Gigliotti SC, Binn LN, Kuschner RA, Vaughn DW.** Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3):1208.
- Hedberg CW, Osterholm MT.** Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(3):199-210.
- Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ.** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 2006; 40(1):3-22.
- Hillerman MR, Werner JH.** Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954; 85(1):183-8.
- Ho HT, Lipman LJ, Gaastra W.** Arcobacter, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet Microbiol.* 2006; 115(1-3):1-13.
- Hochstrat R, Wintgens T, Melin T, Jeffrey P.** Wastewater reclamation and reuse in Europe: a model-based potential estimation. *Water Supply.* 2005; 5(1):67-75.
- Hollinger FB, Emerson SU.** Hepatitis A virus. En: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001; 799-840.
- Homma A, Sobsey MD, Wallis C, Melnick JL.** Virus concentration from sewage. Volume 7,

Issue 7. 1973; 945-8.

Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, Moore PS, Becker JC. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol.* 2010; 84(14):7064-72.

Hsieh S, Meng X, Wu Y, Liu S, Tam A, Lin D, Liaw Y. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(12):3828-34.

Hsu BM, Chen CH, Wan MT. Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52(2):253-9.

Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, Yun KY, Fry KE, Bradley DW, Tam AW, Reyes GR. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology.* 1992; 191(2):550-8.

Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4):1326-32.

Hughes MS, Hoey EM, Coyle PV. Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. *Epidemiol Infect.* 1992; 108(3):529-36.

Hunter PR. Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology. Ed.: J. Wiley & Sons. 1997.

-I-

IAWPRC [International Association on Water Pollution Research and Control]. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat Res.* 1991; 25:529-545.

Igbinosa EO, Obi LC, Okoh AI. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *Res Microbiol.* 2009; 160(8):531-7.

ISO [International Organization for Standardization]. Water Quality-Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages. ISO 1075-2, Geneva, Switzerland. 2000.

-J-

Jacobsen KH, Koopman JS. The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *Int J Epidemiol.* 2005; 34(3):600-9.

Jacobsen KH, Koopman JS. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiol Infect.* 2004; 132(6):1005-22.

Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* 2010; 28(41):6653-7.

Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med.* 1999; 1-16.

Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(8):2867-71.

Jofre J, Blasi M, Bosch A, Lucena F. Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteriodes fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Water Sci Technol.* 1989; 21(3):15-19.

Johne R, Enderlein D, Nieper H, Müller H. Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR. *J Virol.* 2005; 79(6):3883-7.

Johne R, Wittig W, Fernández-de-Luco D, Höfle U, Müller H. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol.* 2006; 80(7):3523-31.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990; 161(1):18-21.

Jyoti A, Ram S, Vajpayee P, Singh G, Dwivedi PD, Jain SK, Shanker R. Contamination of surface and potable water in South Asia by Salmonellae: culture-independent quantification with molecular beacon real-time PCR. *Sci Total Environ.* 2010; 408(6):1256-63.

-K-

Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol.* 1999; 73(10):8848-50.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; 10(5):1075-81.

Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, Greenberg HB. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med.* 1982a; 96(6 Pt 1):756-61.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. En: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001; 1787-1833.

Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol.* 1982b; 116(6):940-8.

Karaganis JV, Larkin EP, Melnick JL, Sarpino PV, Schaub SA, Sorber CA, Sullivan R, Wellings FM. Research priorities for monitoring viruses in the environment. EPA-600/9-83-010. U.S. Environment Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati. 1983.

Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009; 5(3):e1000363.

Khuroo MS. Study of an epidemic non-A, non-B hepatitis: possibility of another human virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med.* 1980; 68(6):818-24.

Kingsley DH, Calci K, Holliman S, Dancho B, Flick GJ. High pressure inactivation of HAV within oysters: comparison of shucked oysters with whole-in-shell meats. *Food Environ Virol.* 2009; 1(3-4):137-40.

Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(2):581-5.

Koff RS. Hepatitis A. *Lancet.* 1998; 351(9116):1643-9.

Koonin EV, Dolja VV. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implication of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1993; 28(5):375-430.

Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov M, Reyer GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(17):8259-63.

Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26(2):187-205.

Kott Y, Roze N, Sperber S, Betzer N. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Wat Res.* 1974; 8(3):165-77.

Kou X, Wu Q, Zhang J, Fan H. Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification. *J Microbiol.* 2006; 44(4):403-8.

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* 1997; 29(4):415-8.

Kumar M, Sharma BC, Sarin SK. Hepatitis E virus as an etiology of acute exacerbation of previously unrecognized asymptomatic patients with hepatitis B virus-related chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23(6):883-7.

Kural AG, Shearer AE, Kingsley DH, Chen H. Conditions for high pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127(1-2):1-5.

-L-

Lai MM. Genetic recombination in RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 176:21-32.

Landry EF, Vaughn JM, Thomas MZ, Vicale TJ. Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. *Appl Environ Microbiol.* 1978; 36(4):544-8.

Langford, M. The United Nations Concept of Water as a Human Right: A New Paradigm for Old Problems? *Water Resources Development.* 2005; 21 (2):273–282.

Larsdotter K, Jansen JC, Dalhammar G. Phosphorus removal from wastewater by microalgae in Sweden--a year-round perspective. *Environ Technol.* 2010; 31(2):117-23.

- Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferré V.** Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol.* 2004; 155(1):11-5.
- Le Guyader F, Neill FH, Estes MK, Monroe SS, Ando T, Atmar RL.** Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(11):4268-72.
- Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM.** Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11):3878-82.
- Lee J, Zoh K, Ko G.** Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2008a; 74(7):2111-7.
- Lee R, Lovatelli A, Ababouch L.** Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. FAO Fisheries Technical Paper. No. 511. Rome, FAO, 2008b; 139. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/i0201e/i0201e00.html>
- Lee SH, Kim SJ.** Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water res.* 2002; 36(1):248-56.
- Lees D.** Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2000; 59(1-2):81-116.
- Lemon SM, Jansen RW, Brown EA.** Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine.* 1992; 10(1):40-4.
- Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, Jansen RW.** Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol.* 1991; 65(4):2056-65.
- Levine AD, Asano T.** Recovering sustainable water from wastewater. *Environ Sci Technol.* 2004; 38(11):201A-208A.
- Li Q.-G.** Molecular epidemiology and genetic variability of certain human adenoviruses. Tesis Doctoral. 1988.
- Li R, Mannon RB, Kleiner D, Tsokos M, Bynum M, Kirk AD, Kopp JB.** BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation.* 2002; 74(11):1497-504.
- Linemeyer DL, Menke JG, Martin-Gallardo A, Hughes JV, Young A, Mitra SW.** Molecular cloning and partial sequencing of hepatitis A viral cDNA. *J Virol.* 1985; 54(2):247-55.
- Lipp EK, Rose JB.** The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech.* 1997; 16(2):620-40.
- Lochridge VP, Jutila KL, Graff JW, Hardy ME.** Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol.* 2005; 86(10):2799-806.
- Lodder-Verschoor F, de Roda Husman AM, van den Berg HH, Stein A, van Pelt-Heerschap HM, van der Poel WH.** Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for

the presence of human pathogenic viruses. *J Food Prot.* 2005; 68(9):1853-9.

López-Caballero ME, Pérez-Mateos M, Montero P, Borderías AJ. Oyster preservation by high-pressure treatment. *J Food Prot.* 2000; 63(2):196-201.

Lowther JA, Avant JM, Gizynski K, Rangdale RE, Lees DN. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J Food Prot.* 2010; 73(2):305-11.

Lucena F, Lasobras J, McIntosh D, Forcadell M, Jofre J. Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(7):2272-7.

-M-

Ma L, Su YC. Validation of high pressure processing for inactivating *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Food Microbiol.* 2011; 144(3):469-74.

Maneerat Y, Clayson ET, Myint KS, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1996; 48(2):121-8.

Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect.* 2003; 131(1):727-36.

Mast EE, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview. *Annu Rev Med.* 1996; 47:257-66.

Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. En: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, Wilkins, 2001; 875-93.

Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang.* 1999; 76(2):78-80.

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 1977; 297(22):1197-203.

Melnick JL, Gerba CP, Wallis C. Viruses in water. *Bull World Health Organ.* 1978; 56(4):499-508.

Melnick JL. History and epidemiology of hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1995; 171(1):2-8.

Meng XJ, Purcell RH, Halburg PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(18):9860-5.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silva LA, Leite JP. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(2):375-82.

Mokhtari A, Jaykus LA. Quantitative exposure model for the transmission of norovirus in retail

- food preparation. *Int J Food Microbiol.* 2009; 133(1-2):38-47.
- Molla A, Paul AV, Wimmer E.** Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science.* 1991; 254(5038):1647-51.
- Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO.** Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol.* 1998a; 72(12):9918-23.
- Monaco MC, Shin J, Major EO.** JC virus infection in cells from lymphoid tissue. *Dev Biol Stand.* 1998b; 94:115-22.
- Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI.** Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol.* 1993; 67(6):3611-4.
- Morris R, Sharp DN.** Enteric viruses levels in wastewater effluents and surface waters in the Severn Trent Water Authority 1979-1981. *Water Res.* 1984; 18(8):935-9.
- MPM [Ministère de l'Agriculture, et de la Pêche Maritime].** Bonne Pratiques D'Hygiene Vol. 9 – La Purification et L'Expedition de Coquillages Vivants. Ministere de la Peche Maritime. 2003; 9. Disponible en: http://www.mpm.gov.ma/documentation/pdf/coquillage_hygie.pdf
- Muniain-Mujika I, Calvo M, Lucena F, Girones R.** Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2003; 83(1):75-85.
- Muniain-Mujika I, Girones R, Tofiño-Quesada G, Calvo M, Lucena F.** Depuration dynamics of viruses in shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2002; 77(1-2):125-33.
- Munoz I, Tomas N, Mas J, Garcia-Reyes JF, Molina-Diaz A, Fernandez-Alba AR.** Potential chemical and microbiological risks on human health from urban wastewater reuse in agriculture. Case study of wastewater effluents in Spain. *J Environ Sci Health B.* 2010; 45(4):300-9.
- Murchie LW, Cruz-Romero M, Kerry JP, Linton M, Patterson MF, Smiddy M, Kelly AL.** High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 2005; 6(3):257-70
- N-
- Nagy PD, Simon AE.** New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology.* 1997; 235(1):1-9.
- Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S.** Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res.* 2006; 34(3):137-40.
- NAS [National Academy of Sciences].** Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process National Academy Press, Washington DC. 1983. Disponible en: <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309033497>.
- Nenonen NP, Hannoun C, Olsson MB, Bergström T.** Molecular analysis of an oyster-related

norovirus outbreak. *J Clin Virol.* 2009; 45(2):105-8.

Niemczynowicz J. The water profession and Agenda 21. *Water Quality International.* Volume 1997, Issue 3-4, 1997; 9-11.

Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, Svensson L. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol.* 2003; 77(24):13117-24.

Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(2):177-84.

Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *Clin Virol.* 2007; 40(4):307-11.

Norkin LC. Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol Rev.* 1999; 168:13-22.

Nüesch JP, de Chastonay J, Siegl G. Detection of defective genomes in hepatitis A virus particles present in clinical specimens. *J Gen Virol.* 1989; 70 (12):3475-80.

-O-

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5):1288-93.

Ogorzaly L, Bertrand I, Paris M, Maul A, Gantzer C. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(24):8019-25.

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(5):929-36.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7(6):2620-37.

Oviedo M, Muñoz P, Domínguez A, Carmona G, Batalla J, Borrás E, Jansà JM. Evaluation of mass vaccination programmes: the experience of Hepatitis A in Catalonia. *Rev Esp Salud Publica.* 2009; 83(5):697-709.

-P-

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971; 1(7712):1257-60.

- PAHO [Pan American Health Organization].** Cholera: Number of Cases and Deaths in the Americas (1991–2001). 2001. Disponible en: <http://www.paho.org/English/HCP/HCT/EER/cholera-cases-deaths-91-01.htm>
- Papaevangelou G.** Epidemiology of hepatitis A in Mediterranean countries. *Vaccine*. 1992; 10(1):63-6.
- Papapetropoulou M, Vantarakis AC.** Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *J Infect*. 1998; 36(1):101-3.
- Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, Noel JS, Bulens SN, Beard SR, Li JF, Bresee JS, Glass RI.** "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep*. 2001; 50(RR-9):1-17.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(2):304-6.
- Park SR, Mackay WG, Reid DC.** Helicobacter sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res*. 2001; 35(6):1624-6.
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR.** Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med*. 1977; 297(2):86-9.
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD.** Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*. 2009; 44(1):1-8.
- Paul DA, Knigge MF, Ritter A, Gutierrez R, Pilot-Matias T, Chau KH, Dawson GJ.** Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis*. 1994; 169(4):801-6.
- Payment P, Berte A, Prévost M, Ménard B, Barbeau B.** Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Can J Microbiol*. 2000; 46(6):565-76.
- Percival SL, Thomas JG.** Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms. *J Water Health*. 2009; 7(3):469-77.
- Pereira LS, Cordery I, Iacovides I.** Coping with water scarcity: Addressing the challenges. Berlin, Germany: Springer. 2009.
- Peterson DA, Hurley TR, Hoff JC, Wolfe LG.** Effect of chlorine treatment on infectivity of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*. 1983; 45(1):223-7.
- Petterson SR, Ashbolt NJ.** Viral risks associated with wastewater reuse: modeling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. *Water Sci Technol*. 2001; 43(12):23-6.
- Petterson SR, Ashbolt NJ, Sharma A.** Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water Environ Res*. 2001; 73(6):667-72.
- Petterson U.** Structural and nonstructural adenovirus proteins. En: *The Adenovirus*. H.S. Ginsberg, eds. Plenum Press, New York and London. 1984.

PDB, [Protein data bank], 2012. An Educational Resource for Exploring a Structural View of Biology. 2012. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=132>

Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol.* 2000; 33(5):826-33.

Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol.* 2001; 82(12):2955-63.

Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol.* 1998a; 64(11):4485-8.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998b; 64(9):3376-82.

Pinto RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(23):7350-5.

Polish LB, Robertson BH, Khanna B, Krawczynski K, Spelbring J, Olson F, Shapiro CN. Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11):3615-7.

Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis.* 2002; 35(8):921-8.

Pringle CR. Virus Taxonomy - San Diego 1998. *Arch Virol.* 1998; 143(7):1449-59.

Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979; 160(2):213-21.

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(8):2963-70.

Puig M, Queralt N, Jofre J, Araujo R. Diversity of *Bacteroides fragilis* and their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(4):1772-6.

Pulitzer MP, Amin BD, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: review. *Adv Anat Pathol.* 2009; 16(3):135-44.

Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008; 48(3):494-503.

Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. En: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001:3051-61.

Purdy MA, Khudyakov YE. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res.*

2011; 161(1):31-9.

Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schröter-Bobsin U, Höhne M, Röske I, Schreier E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol.* 2005; 150(5):929-47.

-Q-

Queralt N, Bartolomé R, Araujo R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(4):889-95.

-R-

Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001; 685-722.

Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(16):7742-6.

Rao VC, Melnick JC. Aspects of microbiology. En: *Environmental virology*, American Society for Microbiology, Washington, DC. 1986; 5:18-40.

Rao VC, Seidel KM, Goyal SM, Metcalf TG, Melnick JL. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1984; 48(2):404-9.

Regli S, Rose JB, Haas CN, Gerba CP. Modeling the risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *J Am Water Works Assoc.* 1991; 83(11):76-84.

Rekosh DMK, Rusell WC, Bellet AJD, Robinson AJ. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell.* 1977; 11(2):283-95.

Reyes GR, Huang CC, Tam AW, Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl.* 1993; 7:15-25.

Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B. *Science.* 1990; 247(4948):1335-9.

Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2008; 192:117-58.

Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE, Boland CR. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2000; 119(5):1228-35.

Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DS, Miagostovich MP, Simões CM, Barardi CR. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in

environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(6):1979-87.

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol.* 1992; 73(6):1365-77.

Robertson BH, Khanna B, Nainan OV, Margolis HS. Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis.* 1991; 163(2):286-92.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002; 35(3):246-53.

Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis.* 2005; 191(5):749-54.

Romalde JL, Area E, Sánchez G, Ribao C, Torrado I, Abad X, Pintó RM, Barja JL, Bosch A. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int J Food Microbiol.* 2002; 74(1-2):119-30.

Rose JB, Singh SN, Gerba CP, Kelley LM. Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 1984; 47(5):989-92.

Rose JB, Haas CN, Regli S. Risk assessment and the control of waterborne Giardiasis. *Am J Public Health.* 1991; 81(6):709-13.

Rosenthal P. Hepatitis A vaccine: current indications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27(1):111-3.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore RK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 84(3):570-3.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000; 81(11):2573-604.

Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, Vennema H, Duizer E, Koopmans M, de Roda Husman AM. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(3):381-7.

Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28(4):441-53.

-S-

Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, Younan M, Mohamed AH. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol.* 2007; 7(3):368-73.

Sabath BF, Major EO. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis.* 2002; 186(2):180-6.

- Sahlström L, Aspan A, Bagge E, Danielsson-Tham ML, Albiñ A.** Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 2004; 38(8):1989-94.
- Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S.** Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(9):849-53.
- Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Yamamoto S, Sato H, Kimura H.** Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci.* 2009; 71(1):21-5.
- Sánchez Tapias JM.** Virus de la hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1995; 13(1):3-15.
- SARF [Scottish Aquaculture Research Forum].** Review and cost-benefit analysis for industry of reduced depuration times for the mussel *Mytilus edulis*. 2010.
Disponible en: <http://www.sarf.org.uk/cms-assets/documents/29383-342050.sarf066.pdf>
- Schlauder GG, Mushahwar IK.** Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol.* 2001; 65(2):282-92.
- Schmitt M, Höfler D, Koleganova N, Pawlita M.** Human polyomaviruses and other human viruses in neuroendocrine tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Jul;20(7):1558-61.
- Schmitz H, Wigand R, Heinrich W.** Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol.* 1983; 117(4):455-66.
- Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, Dubois V, Caminade P, Fleury HJ, Lafon ME.** Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol.* 2001; 152(2):179-86.
- Shah KV, Galloway DA, Knowles WA, Viscidi RP.** Simian virus 40 (SV40) and human cancer: a review of the serological data. *Rev Med Virol.* 2004; 14(4):231-9.
- Sharma S, Sachdeva P, Virdi JS.** Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 61(5-6):424-8.
- Sharp IR, Wadell G.** Adenoviruses. En: Principles and Practice of Clinical Virology. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. J. Wiley & Sons. 1995; 7:287-308.
- Shieh YC, Khudyakov YE, Xia G, Ganova-Raeva LM, Khambaty FM, Woods JW, Veazey JE, Motes ML, Glatzer MB, Bialek SR, Fiore AE.** Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak. *J Food Prot.* 2007; 70(1):145-50.
- Shinagawa M, Lida Y, Matsuda A, Tsukiyama T, Sato G.** Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene.* 1987; 55(1):85-93.
- Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP Jr, Thapa GB, Thapa N, Myint KS, Fourneau M, Kuschner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis BL.** Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2007; 356(9):895-

903.

Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(42):16272-7.

Sidhu JP, Toze SG. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environ Int.* 2009; 35(1):187-201.

Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hübinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, Engelhart S, Fleischhack G. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41(6):693-9.

Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(6):1769-80.

Slomka MJ, Appleton H. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiol Infect.* 1998; 121(2):401-7.

Smith EM, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 43(6):1440-50.

Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol.* 2007; 149(1-2):29-40.

Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CR, Veal D, Vesey G. Determination of Cryptosporidium parvum oocyst viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(2):409-17.

Steinert M, Hentschel U, Hacker J. Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26(2):149-62.

Stewart AR, Lednicky JA, Benzick US, Tevethia MJ, Butel JS. Identification of a variable region at the carboxy terminus of SV40 large T-antigen. *Virology.* 1996; 221(2):355-61.

Stine SW, Song I, Choi CY, Gerba CP. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J Food Prot.* 2005; 68(5):913-8.

Sundsfjord A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(5):1390-4.

Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960; 105:420-7.

-T-

Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences

6.

Toze S. Microbial pathogens in wastewater. CSIRO Land and Water Technical report 1/97. 1997. Disponible en: <http://www.clw.csiro.au/publications/technical97/tr1-97.pdf>

Tsai YL, Sobsey MD, Sangermano LR, Palmer CJ. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(10):3488-91.

Tsarev SA, Binn LN, Gomatos PJ, Arthur RR, Monier MK, van Cuyck-Gandre H, Longer CF, Innis BL. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol.* 1999; 57(1):68-74.

Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, Friss HE. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2008; 153(3):339-44.

-U-

UNCSO [United Nations Commission on Sustainable Development]. Comprehensive assessment of the fresh water resources of the world: A report of the Secretary-General. 1997. Disponible en: http://www.feem-web.it/nostrum/db_doc/SEI_1997.pdf

UNEP [United Nations Environment Programme]. Global environment outlook. Water availability by sub-region in 2000 (1 000 m³ per capita/year). 2002. Disponible en: <http://www.unep.org/geo/geo3/english/fig152a.htm>

USEPA [United States Environmental Protection Agency]. Primer for Municipal Wastewater treatment systems. U.S. EPA, Washington DC. 2004.

USFDA [U.S. Food and Drug Administration]. Pathogens From The Harvest Area (A Biological Hazard). Pathogens from the harvest area. 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm091606.html>

Upadhyay AR, Mishra VK, Pandey SK, Tripathi BD. Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in tropical city. *Ecol Eng.* 2007; 30(1)9-15.

-V-

van den Berg H, Lodder W, van der Poel W, Vennema H, de Roda Husman AM. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol.* 2005; 156(4):532-40.

van der Giessen JW, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol.* 2006; 36(7):849-58.

van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an

immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 2010;6(7).

van Heerden J, Ehlers MM, Grabow WO. Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J Appl Microbiol.* 2005a; 99(5):1256-64.

van Heerden J, Ehlers MM, Heim A, Grabow WOK. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *J Appl Microbiol.* 2005b; 99(2):234-42.

Verschoor EJ, Groenewoud MJ, Fagrouch Z, Kewalapat A, van Gessel S, Kik MJ, Heeney JL. Molecular characterization of the first polyomavirus from a New World primate: squirrel monkey polyomavirus. *J Gen Virol.* 2008; 89(1):130-7.

Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010; 8(1):158-65.

VIPERdb [Virus Particle Explorer²]. Database for icosahedral virus capsid structures. 2012. Disponible en: <http://viperdb.scripps.edu>

Virus Taxonomy, seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. van Regenmortel MHS, et al., eds. Virology Division, International Union of Microbiological Societies. Academic press. 241-246.

Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4):1423-33.

Viscidi RP, Clayman B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 577:73-84.

Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, Fulp W, Ajidahun A, Rivanera D. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18(10):1737-43.

Viswanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): A critical study: Epidemiology. *Indian J Med Res.* 1957; 45:1-30.

Vivier JC, Ehlers MM, Grabow WO. Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Res.* 2004; 38(11):2699-705.

Vose DJ. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J Food Prot.* 1998; 61(5):640-8.

-W-

Wald A. Hepatitis E. *Adv Pediatr Infect Dis.* 1995; 10:157-66.

Wallace BJ, Guzewich JJ, Cambridge M, Altekruise S, Morse DL. Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *Am J Prev Med.* 1999; 17(1):48-54.

Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses from sewage by adsorption on millipore membranes. *Bull World Health Organ.* 1967; 36(2):219-25.

Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, van Keulen H. Prevalence of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts and characterization of Giardia spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(8):2789-97.

WHO [World Health Organization]. WHO Position Paper Hepatitis A vaccines. 2000. Disponible en: http://www.who.int/immunization/Refs_Hepatitis%20A_4_Oct_2000.pdf

WHO [World Health Organization]. WHO Report on Diarrhoeal disease. 2009. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>

WHO [World Health Organization]. Guidelines for Drinking Water Quality; Addendum-Microbial Agents in Drinking Water, second ed. Switzerland, Geneva. 2002.

Westrell T, Ciampa N, Boelaert F, Helwigh B, Korsgaard H, Chr iel M, Ammon A, M akel a P. Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill.* 2009; 14(3):19100.

Wiens BL, Bohidar NR, Pigeon JG, Egan J, Hurni W, Brown L, Kuter BJ, Nalin DR. Duration of protection from clinical hepatitis A disease after vaccination with VAQTA. *J Med Virol.* 1996; 49(3):235-41.

Wildy P. Classification and nomenclature of viruses. First report of International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monogr Virol,* 1971; 5.

Wilkes G, Edge T, Gannon V, Jokinen C, Lyautey E, Medeiros D, Neumann N, Ruecker N, Topp E, Lapen DR. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Res.* 2009; 43(8):2209-23.

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004; 2(12):432.

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for non-A/non-B hepatitis virus etiology. *Lancet.* 1980; 2(8200):876-8.

Wong HH, Wang J. Merkel cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(11):1711-6.

Worm HC, van der Poel WH, Brandst atter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect.* 2002; 4(6):657-66.

Worm HC, Wirnsberger G. Hepatitis e vaccines: progress and prospects. *Drugs.* 2004; 64(14):1517-31.

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, H oller C, de Roda Husman AM, Kay D, Kozyra I, L opez-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* 2011; 45(3):1025-38.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(6):945-62.

-X-

Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 1990; 250(4987):1580-3.

Xiao L, Ryan UM. Molecular Epidemiology. En: Fayer R, Xiao L, eds. Cryptosporidium and cryptosporidiosis, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2008; 120-171.

-Y-

Yarborough PO, Tam AW, Fry KE, Krawczynski K, McCaustland KA, Bradley DW, Reyes GR. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J Virol.* 1991; 65(11):5790-7.

Yarborough PO. Hepatitis E virus: Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches. *Intervirol.* 1999; 42(2-3):179-84.

-Z-

Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutation analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol.* 1999; 73(5):4074-82.

Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel, S. The ORF3 protein of hepatitis E is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol.* 1997; 71(12):9045-53.

Zahorsky J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr.* 1929; 46:391-5.

Zhang H, Chao SF, Ping LH, Grace K, Clarke B, Lemon SM. An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology.* 1995; 212(2):686-97.

Zhang W, Shen Q, Mou J, Gong G, Yang Z, Cui L, Zhu J, Ju G, Hua X. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health.* 200; 55(6):291-8.

Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006; 346:312-23.

Zhou H, Smith DW. Advanced technologies in water and wastewater treatment. *J Environ Eng Sci.* 2001; 28(1):49-66.

Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, Wang H, Yang CL, Jiang HM, Cai JP, Wang YJ, Ai X, Hu YM, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian YL, Wu T, Li YM, Miao J, Ng MH, Shih JW, Xia NS. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9744):895-902.

8. ANEXOS

Otras publicaciones no incluidas en esta Tesis (orden cronológico):

1. **Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R.** Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(12):7894-6.
2. **Hundesa A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, Rosina Girones R.** Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods.* 2009; 158(1-2):130-5.
3. **Hundesa A, Bofill-Mas S, Maluquer de Motes C, Rodriguez-Manzano J, Bach A, Casas M, Girones R.** Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods.* 2010; 163(2):385-9.
4. **Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa AA, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S.** Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 2010; 44(15):4325-39.
5. **Navarro JT, Hernández A, Rodriguez-Manzano J, Mate JL, Grau J, Morgades M, Martró E, Tural C, Ribera JM, Matas L.** Plasma Epstein-Barr viral load measurement as a diagnostic marker of lymphoma in HIV-infected patients. *Med Clin (Barc).* 2010; 135(11):485-90.
6. **Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R.** Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J Virol Methods.* 2011; 171(1):1-7.
7. **Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Hundesa A, Girones R.** Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. *J Water Health.* 2011; 9(3):515-24.
8. **Jardi R, Crespo M, Homs M, Van den Eyden E, Girones R, Rodriguez-Manzano J, Caballero A, Buti M, Esteban R, Rodriguez-Frias F.** HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Med.* 2012 [Epub ahead of print].

Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices[∇]

Silvia Bofill-Mas,¹ Nestor Albinana-Gimenez,¹ Pilar Clemente-Casares,¹ Ayalkibet Hundesa,¹
Jesus Rodriguez-Manzano,¹ Annika Allard,³ Miquel Calvo,² and Rosina Girones^{1*}

Department of Microbiology¹ and Department of Statistics,² Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona 08028, Spain, and Department of Clinical Virology, Umeå University Hospital, S-901 85 Umeå, Sweden³

Received 24 April 2006/Accepted 2 October 2006

Human adenoviruses (HAdV) and human polyomavirus JCPyV have been previously proposed as indicators of fecal viral contamination in the environment. Different wastewater matrices have been analyzed by applying real-time quantitative PCR procedures for the presence, quantity, and stability of a wide diversity of excreted HAdV and JCPyV. High quantities of HAdV and JCPyV were detected in sewage, effluent wastewater, sludge, and biosolid samples. Both viruses showed high stability in urban sewage. These results confirm the suitability of both viruses as indicators of human fecal viral pollution.

Two groups of DNA viruses have been proposed as indicators of the presence of human viral pathogens in the environment: human adenoviruses (HAdV) and human polyomaviruses (2, 13, 14). PCR-based procedures have been described for the detection of these viruses in environmental samples (2, 13). The aim of this study was to analyze the presence, quantity, and stability of HAdV and human polyomavirus JCPyV in different wastewater matrices. The applied real-time quantitative PCR (QPCR) procedures showed enough sensitivity to detect not only specific serotypes but also a wide diversity of excreted strains. The presence of hepatitis E virus (HEV), considered an emergent pathogen in developed countries, was also evaluated in this study by conventional nested-PCR techniques (5).

A total of 28 samples were obtained from a wastewater treatment plant located in the south of Barcelona (Spain) which treats the domestic and industrial wastewater from a population equivalent of 400,000 with a capability of 72,000 m³ per day. The treatment includes primary sedimentation and aerobic activated sludge digestion. The samples analyzed consisted of six raw sewage samples, seven treated wastewater samples, eight sludge samples (dry weight, 3.6% to 4%) and, finally, seven biosolid samples (dry weight, 25%).

Recovery of viral particles from sewage was carried out following a previously described procedure (13) presenting an estimated recovery efficiency of 34% for JCPyV. Recovery of viral particles from effluent wastewater was carried out following EPA procedure 600/4-84/013 (N14) (www.epa.gov/microbes/chapt14.pdf) combined with a second concentration procedure (13). The recovery efficiencies observed for this combined procedure were 0.15 to 0.16% for JCPyV and 2 to 25% for HAdV. Recovery of viral particles from sludge and biosolid samples was carried out by applying a method based on EPA 600/4-84/013 (R7) (www.epa.gov/nerlcwww/chap7.pdf)

with minor modifications. Viral nucleic acids were extracted by a procedure described by Boom et al. (3) which have been previously detailed (7).

Two QPCR procedures based on the use of TaqMan probes (8, 9) were evaluated for their suitability in the analysis and quantification of HAdV present in different wastewater matrices (Table 1). After comparing the two QPCR methods by statistically analyzing the results obtained by applying two different analysis of variation (ANOVA) tests, we concluded that assay 1 (9) was significantly different from assay 2 (8) in that it detected a higher number of HAdV ($P = 0.012$ in the repeated measures ANOVA for sewage and effluent wastewater; $P = 0.004$ in the repeated measures ANOVA for sludge and biosolids; $P < 0.001$ for both sewage and effluent wastewater and for sludge and biosolids in the nested hierarchical ANOVA). The specificity of assay 1 for detecting the diverse HAdV serotypes had been previously evaluated, and adenoviruses belonging to all six human species have been detected. However, some strains of animal adenoviruses excreted by farm animals may also be detected with the described protocol (data not shown).

HAdV assay 1 had been performed using probe AdP1. A second probe, AdP2, originally designed to better detect some adenovirus serotype B strains, did not improve the results when added to AdP1 in the analysis of environmental samples (data not shown).

The quantification of JCPyV has been evaluated using a QPCR assay (11) that showed to be specific and highly sensitive for JCPyV, which is a very stable DNA virus presenting a low level of genetic variability. To the best of our knowledge, this is the first attempt to detect JCPyV in treated urban sewage and in the sludge and/or biosolids generated in wastewater treatment plants (Table 1).

The sensitivities of both QPCR assays applied in this study were estimated to be of 1 to 10 genome copies (GC).

High concentrations of HAdV and JCPyV were found in sludge and biosolid samples (Tables 1 and 2). HEV RNA was also detected in 6/12 analyzed samples by seminested reverse transcription-PCR (RT-PCR) with degenerated primers (6) as previously described (5) by use of a one-step RT-PCR proce-

Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona 08028, Spain. Phone: 34 93 402 14 83. Fax: 34 93 4039047. E-mail: rgirones@ub.edu.

[∇] Published ahead of print on 6 October 2006.



Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment

A. Hundesa^a, C. Maluquer de Motes^a, N. Albinana-Gimenez^a, J. Rodriguez-Manzano^a, S. Bofill-Mas^a, E. Suñen^b, R. Rosina Girones^{a,*}

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, Barcelona 08028, Spain

^b Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Paseo de la Universidad 7, Vitoria-Gasteiz 01006, Spain

A B S T R A C T

Article history:

Received 7 November 2008

Received in revised form 2 February 2009

Accepted 5 February 2009

Available online 17 March 2009

Keywords:

PAdVs

qPCR

Adenovirus

Fecal contamination

Environment

Water

Microbial source tracking

The *Adenoviridae* family comprises a wide diversity of viruses that may be excreted for long periods in feces or urine. Previous studies have suggested that the detection of human and animal adenoviruses as well as human and animal polyomaviruses by PCR could be used as an index of fecal contamination of human and animal origin. In this study, quantitative PCR assays targeting specifically porcine adenoviruses have been developed and applied to fecal and environmental samples, including pig slurries, urban sewage, slaughterhouse sewage and river water samples. To develop real-time quantitative PCR for the detection and quantitation of porcine adenoviruses, primers and a TaqMan probe targeting a 68-bp region of the porcine adenovirus hexon gene were designed to amplify specifically porcine adenovirus, and the conditions of the reaction were optimized. The assay detected 1–10 genome copies per test tube and was specific in showing no positive results when samples containing human or bovine adenoviruses were analyzed. Fecal samples contained mean concentrations of porcine adenoviruses of 10^5 GC/g while slaughterhouse wastewater samples showed mean values of 10^3 GC/ml. The assay detected porcine fecal pollution in samples that were highly diluted and had been collected at a considerable distance from the input source, such as river water. In general, the data presented here provide a quantitative tool for the analysis of porcine adenoviruses as indicators of the presence of porcine contamination in the environment, and support the detection of porcine adenoviruses by real-time quantitative PCR as a promising and valuable tool for source-tracking studies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microbial contamination of the environment poses a significant risk to human health through recreational exposure or consumption of water or contaminated food. According to the requirements of the Water Framework Directive and the United States Clean Water Act there has been a major shift from traditional point-source effluent quality regulations towards a catchment-wide approach (Stapleton et al., 2007). Given this new approach there is a need for new information on the microbial dynamics of catchments for the effective control of water quality at the point of use. Bacterial indicators including *Escherichia coli* and fecal coliform bacteria have been used historically to monitor water quality and safety. However, their major shortcoming is that they are often not correlated with viral pathogens or protozoan parasites (Gerba et al., 1979; Griffin et al., 2003; Pina et al., 1998). Fecal contamination may originate from point or nonpoint sources. Generally, point sources of fecal

contamination include discrete sources such as discharges from large animal feeding operations, wastewater treatment outfalls and storms and combined sewers. The nonpoint sources are diffuse and include agricultural sources and livestock waste applied to agricultural land. Identifying the sources of microbial contamination plays a very important role in enabling effective management and remediation strategies and is known as microbial source tracking (MST). MST includes a group of methodologies that aim to identify, and in some cases quantify, the dominant sources of fecal contamination in the environment and, more specifically, in water resources (Field, 2004; Stoeckel and Harwood, 2007). Environmental and water contamination by the waste produced in pig farms is a source of microbiological and chemical contamination. The hepatitis E virus is a human viral pathogen that causes acute hepatitis and is highly prevalent in young pigs and present frequently in fecal samples, as well as in waste water and sludge produced in slaughterhouses dealing with pigs (Clemente-Casares et al., 2003; Pina et al., 1998). The identification of fecal contamination of porcine origin is important to pinpoint the source of contamination for remediation purposes and to evaluate the potential public health impact of fecal contamination in water.

* Corresponding author. Tel.: +34 934021483; fax: +34 934039047.

E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Rosina Girones).



Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool

Ayalkibet Hundesa^a, Silvia Bofill-Mas^a, Carlos Maluquer de Motes^a, Jesus Rodriguez-Manzano^a, Alex Bach^{b,c}, Maribel Casas^d, Rosina Girones^{a,*}

^a Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b ICREA, Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Pg. Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

^c Grup de Recerca en Nutrició, Maneig, i Benestar Animal, Unitat de Remugants, IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries), Torre Marimon, 08140 Caldes de Montbui, Barcelona, Spain

^d Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici CRESA, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Adenoviruses and polyomaviruses are two distinct DNA viral families that are excreted in high concentrations and distributed in human and animal populations. Targeting specific virus included in these families has proved to be a promising and useful tool for tracing specifically sources of environmental contamination. In this study, a quantitative PCR assay that is specific for bovine polyomaviruses was developed and used to determine the excretion level and concentration of bovine polyomaviruses in urine and environmental samples, including urban sewage, slaughterhouse sewage, and river water. A set of primers and a TaqMan probe were designed to target a 77-bp region of the bovine polyomavirus VP1 gene, and the conditions of the reaction were optimized. A detection limit was established at 1–10 genome copies per test tube. The assay was specific and produced negative results when samples containing human or porcine fecal contamination were analyzed. This is, to our knowledge, the first description of bovine polyomaviruses excreted in bovine urine samples (mean values of 10^4 GC/l). Bovine polyomaviruses were also detected and quantified in slaughterhouse wastewater and river waters, which shows the spread of these viruses in many environmental samples containing contamination of bovine origin. The procedure described in this paper provides a quantitative source-tracking tool for the analysis of bovine polyomaviruses as indicators of the presence of bovine contamination in environmental samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 24 July 2009

Received in revised form 26 October 2009

Accepted 27 October 2009

Available online 1 November 2009

Keywords:

Bovine

Polyomavirus

Sewage

Water

Microbial source tracking

1. Introduction

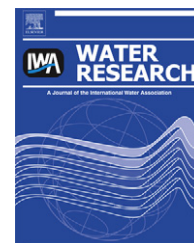
Fecal contamination of water systems may represent a high risk to human health, due to recreational exposure or consumption of fecally polluted water and/or food. Such contamination involves usually significant economic losses and serious disturbances of natural and ecological environments. The origin of fecal contamination must be identified and tracked to monitor water quality, assess potential health risks, and determine optimal remediation strategies. Methods for detecting and identifying the source of fecal pollution in the environment are known as microbial source tracking (Field, 2004; Stapleton et al., 2007; Stoeckel and Harwood, 2007). These methods focus mainly on detecting a microorganism that is related intrinsically to fecal contents and stools, which indicates the presence of contamination and, thus, of potential pathogens, such as bacteria, viruses, and parasites.

A large body of work has been developed in the microbial source-tracking field over the past few years. This research has provided new and valuable information on microbial dynamics and improved considerably the maintenance of water quality and safety (Field, 2004).

Enteric viruses have emerged as a promising tool in efforts to increase water quality standards, due to their high host-specificity, stability in different environments, and prevalence in diverse geographical areas. Polymerase chain reaction (PCR)-based techniques have been used conventionally to monitor the presence or absence of genomic copies of targeted viral indicators. However, the recent development of real-time quantitative PCR (qPCR) techniques allows the specific, sensitive detection and reliable quantitation of small amounts of target molecules. Assessment of health risk associated with fecal pollution requires a reliable fecal indicator and a rapid quantitation method. The development of a quantitative assay for the evaluation of the concentration of a host specific, widely excreted DNA virus, the bovine polyomavirus, provides a quick reliable protocol. The availability of a quantitative assay will also expand the use of PCR indicators for fecal source tracking into a

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4021483; fax: +34 93 4039047.

E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones).

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques

Rosina Girones^{a,*}, Maria Antonia Ferrús^b, José Luis Alonso^c, Jesus Rodriguez-Manzano^a, Byron Calgua^a, Adriana de Abreu Corrêa^{a,d}, Ayalkibet Hundesa^a, Anna Carratala^a, Sílvia Bofill-Mas^a

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^bDepartment of Biotechnology, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

^cInstitute of Water Engineering and Environment, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

^dDepartment of Microbiology and Parasitology, Laboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2010

Received in revised form

10 June 2010

Accepted 14 June 2010

Available online 19 June 2010

Keywords:

Pathogen

Water

Virus

Protozoa

Bacteria

PCR

ABSTRACT

Pollution of water by sewage and run-off from farms produces a serious public health problem in many countries. Viruses, along with bacteria and protozoa in the intestine or in urine are shed and transported through the sewer system. Even in highly industrialized countries, pathogens, including viruses, are prevalent throughout the environment. Molecular methods are used to monitor viral, bacterial, and protozoan pathogens, and to track pathogen- and source-specific markers in the environment. Molecular techniques, specifically polymerase chain reaction-based methods, provide sensitive, rapid, and quantitative analytical tools with which to study such pathogens, including new or emerging strains. These techniques are used to evaluate the microbiological quality of food and water, and to assess the efficiency of virus removal in drinking and wastewater treatment plants. The range of methods available for the application of molecular techniques has increased, and the costs involved have fallen. These developments have allowed the potential standardization and automation of certain techniques. In some cases they facilitate the identification, genotyping, enumeration, viability assessment, and source-tracking of human and animal contamination. Additionally, recent improvements in detection technologies have allowed the simultaneous detection of multiple targets in a single assay. However, the molecular techniques available today and those under development require further refinement in order to be standardized and applicable to a diversity of matrices. Water disinfection treatments may have an effect on the viability of pathogens and the numbers obtained by molecular techniques may overestimate the quantification of infectious microorganisms. The pros and cons of molecular techniques for the detection and quantification of pathogens in water are discussed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: MST, microbial source-tracking; HAdV, human adenoviruses; HAV, hepatitis A virus; HEV, hepatitis E virus; JCPyV, human polyomavirus JC; BKPyV, human polyomavirus BK; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase PCR; NASBA, acid sequence-based amplification; CFU, colony-forming units; mPCR, multiplex PCR; IFAs, immunofluorescent assays; IMS, immunomagnetic separation; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; mRNA, messenger RNA; PAdV, porcine adenoviruses; BPyV, bovine polyomaviruses; EMA, ethidium monoazide; PMA, propidium monoazide; VBNC, viable non-culturable; PBS, phosphate buffered saline; nPCR, nested-PCR.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1483; fax: +34 93 403 9047.

E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones).

0043-1354/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2010.06.030



Original

Plasma Epstein-Barr viral load measurement as a diagnostic marker of lymphoma in HIV-infected patients

José-Tomás Navarro^{a,*}, Águeda Hernández^{b,♦}, Jesús Rodríguez-Manzano^b, José-Luis Mate^c, Javier Grau^a, Mireia Morgades^a, Elisa Martró^b, Cristina Tural^d, Josep-Maria Ribera^a and Lurdes Matas^b

^a Department of Hematology, Institut Català d'Oncologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^b Department of Microbiology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^c Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^d HIV Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2009

Accepted 9 February 2010

Available online 31 July 2010

Keywords:

HIV

Epstein-Barr virus

Viral load

Non-Hodgkin's lymphoma

Hodgkin's lymphoma

ABSTRACT

Background and objectives: To assess the use of the Epstein-Barr virus (EBV) viral load as a marker for lymphoma diagnosis in HIV-infected patients. We also aimed to identify the relationship between EBV viral load in plasma and the presence of EBV in lymphoma cells.

Patients and methods: Retrospective observational study of two HIV-infected populations: one of patients diagnosed with lymphoma and a control group. Thirty-nine patients with AIDS-related lymphoma (ARL) (32 non-Hodgkin's and 7 Hodgkin's lymphomas) and 134 HIV-positive individuals without neoplasia or opportunistic infections were studied. Blood samples were collected before lymphoma treatment in ARL patients. EBV viral load was measured in plasma by real-time quantitative PCR and the presence of EBV-EBER mRNA in lymphoma tumor was investigated by *in situ* hybridization.

Results: Patients with ARL had higher EBV viral loads than those without lymphoma: 24,180.5 ($\pm 73,387.6$) copies/mL versus 2.6 (± 21.6) copies/mL ($p < 0.001$). HIV-infected patients without lymphoma had negative or very low EBV load values. Among ARL patients, no correlation was found between EBV viral loads and CD4+ lymphocyte counts or between EBV and HIV RNA loads, or any other clinical or biological parameter. Cases with an EBV-EBER-positive lymphoma had higher EBV viral loads than those with EBER-negative tumors.

Conclusions: EBV viral load is a useful marker of lymphoma in HIV-infected patients, and may be a useful tool for early diagnosis and treatment.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Carga viral del virus de Epstein-Barr como marcador diagnóstico de linfoma en pacientes infectados por el VIH

RESUMEN

Fundamento y objetivo: Evaluar el uso de la carga viral del virus de Epstein-Barr (VEB) como marcador para el diagnóstico de linfomas en pacientes infectados por el VIH. Identificar la relación entre la carga viral de VEB en plasma y la presencia del virus en las células del linfoma.

Pacientes y método: Estudio observacional retrospectivo de dos poblaciones de pacientes VIH: una de pacientes diagnosticados de linfoma y un grupo control. Se estudiaron 39 pacientes con linfoma asociado a infección por el VIH (32 linfomas no hodgkinianos y 7 de Hodgkin) y 134 individuos con infección por el VIH sin neoplasia ni infecciones oportunistas. Las muestras de plasma de los pacientes con linfoma fueron obtenidas en el momento del diagnóstico. La carga viral en plasma del VEB fue realizada mediante una PCR cuantitativa en tiempo real y la presencia de RNAm VEB-EBER en los tumores fue investigada por hibridación *in situ*.

Resultados: Los pacientes con linfoma asociado a infección por el VIH tenían cargas virales de VEB más elevadas que los pacientes sin linfoma: 24.180,5 ($\pm 73.387,6$) copias/ml frente a 2,6 ($\pm 21,6$) copias/ml ($p < 0,001$). Los pacientes con infección por el VIH sin linfoma presentaron carga viral muy baja o negativa. En los pacientes con linfoma no se halló correlación entre la carga viral del VEB y el recuento de linfocitos

Palabras clave:

VIH

Virus de Epstein-Barr

Carga viral

Linfoma no hodgkiniano

Linfoma de Hodgkin

* Corresponding author.

E-mail address: jnavarro@iconcologia.net (J.-T. Navarro).

♦ Both authors contributed equally to this study.



Protocols

Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay

Byron Calgua^a, Celia Regina Monte Barardi^b, Silvia Bofill-Mas^a, Jesus Rodriguez-Manzano^a, Rosina Girones^{a,*}

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 26 April 2010

Received in revised form 3 September 2010

Accepted 13 September 2010

Available online 21 September 2010

Keywords:

Immunofluorescence assay

Plaque assay

TCID₅₀

qPCR

Cell culture

Adenoviruses

JC polyomavirus

Human adenoviruses (HAdV) and JC polyomaviruses (JCPyV) have been proposed as markers of fecal/urine contamination of human origin. An indirect immunofluorescence assay has been developed to quantify infectious human adenoviruses types 2 and 41 and JC polyomaviruses strain Mad-4 in water samples. The immunofluorescence assay was compared with other quantitative techniques used commonly such as plaque assay, tissue culture infectious dose-50 and quantitative PCR (qPCR). The immunofluorescence assays showed to be specific for the detection of infectious viruses, obtaining negative results when UV or heat-inactivated viruses were analyzed. The assays required less time and showed higher sensitivity for the detection of infectious viral particles than other cell culture techniques (1 log₁₀ more) evaluated. River water samples spiked previously with human adenoviruses and raw sewage samples were also analyzed using the proposed immunofluorescence assay as well as by qPCR. The results show quantitations with 2 log₁₀ reduction in the numbers of infectious viruses compared with the number of genome copies detected by qPCR. The immunofluorescence assay developed is fast, sensitive, specific, and a standardizable technique for the quantitation and detection of infectious viruses in water samples.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Water quality is impaired by the presence of pathogenic microorganisms derived from treated effluent or untreated sewage that is released into the environment. These pathogens include many types of viruses that infect humans and that are excreted in high concentration in the feces of patients with gastroenteritis (Carter, 2005; IAWPRC, 1983). Some viruses, such as polyomaviruses and some strains of human adenoviruses (HAdV), establish persistent infections, and viral particles may be excreted in feces and/or urine for months and even years (Carter, 2005; Crabtree et al., 1997; Imperiale and Major, 2007; Wadell et al., 1988). HAdV and JC polyomavirus (JCPyV) have been reported in high concentrations in sewage (Bofill-Mas et al., 2000, 2006; Katayama et al., 2004; Pina et al., 1998), river and lake water (Albinana-Gimenez et al., 2009a; Wong et al., 2009), seawater (Calgua et al., 2008; McQuaig et al., 2009) and even drinking water (Albinana-Gimenez et al., 2009b; Hamza et al., 2009; Lambertini et al., 2008). Both DNA viruses are highly stable to environmental

conditions (Bofill-Mas et al., 2006; Fong and Lipp, 2005). Several studies have questioned the use of bacterial indicators to predict the occurrence of viruses and have proposed HAdV and JCPyV as indicators of fecal contamination of human origin (Bofill-Mas et al., 2000; Calgua et al., 2008; Formiga-Cruz et al., 2003; Lipp et al., 2001; Pina et al., 1998; Sinclair et al., 2009; Wong et al., 2009).

HAdVs have linear double-stranded DNA and are included in the *Mastadenovirus* genera, in the *Adenoviridae* family (Stewart et al., 1993). HAdVs are grouped in 52 serotypes, which have been divided in 7 species (A–G). Most of the serotypes (main serotypes: 1–7, 14 and 21) cause respiratory diseases, particularly in children. HAdV 40 and 41 are the most important serotypes responsible for gastroenteritis in children (Wold and Horwitz, 2007).

JC polyomavirus is a human virus classified in the *Polyomaviridae* family. This virus produce latent and chronic infections that persist indefinitely in individuals and viral particles are excreted regularly in urine of healthy individuals (Imperiale and Major, 2007). The virus affects a large proportion of the population worldwide; consequently, its presence in water may not represent a significant health risk for most of the population. The pathogenicity of the virus is commonly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in immunocompromised states and

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4021483; fax: +34 93 4039047.
E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones).

Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources

Laura Guerrero-Latorre, Anna Carratala, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Ayalkibet Hundesa and Rosina Girones

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a common cause of water-borne acute hepatitis in areas with poor sanitation. In 2004 an outbreak of HEV infection affected around 2,000 people in Eastern Chad (Dar Sila). This paper describes the decrease in the incidence of acute jaundice syndrome (AJS) from 2004 until 2009 when a mean incidence of 0.48 cases/1,000 people/year was recorded in the region. Outbreaks of AJS were identified in some of the camps in 2007 and 2008. Moreover, water samples from drinking water sources were screened for human adenoviruses considered as viral indicators and for hepatitis A virus and HEV. Screening of faecal samples from donkeys for HEV gave negative results. Some of the samples were also analysed for faecal coliforms showing values before disinfection treatment between 3 and >50 colony forming units per 100 mL. All water samples tested were negative for HEV and HAV; however, the presence of low levels of human adenoviruses in 4 out of 16 samples analysed indicates possible human faecal contamination of groundwater. Consequently, breakdowns in the treatment of drinking water and/or increased excretion of hepatitis viruses, which could be related to the arrival of a new population, could spread future outbreaks through drinking water.

Key words | acute jaundice syndrome, drinking-water, Eastern Chad, HEV, HAdV, humanitarian action

Laura Guerrero-Latorre
Intermon Oxfam Humanitarian Action Program,
C/Roger de Llúria, 15,
08010 Barcelona,
Spain

Laura Guerrero-Latorre
Anna Carratala
Jesus Rodriguez-Manzano
Byron Calgua
Ayalkibet Hundesa
Rosina Girones (corresponding author)
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona,
Avd. Diagonal 645,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: rgirones@ub.edu

ABBREVIATIONS

AJS acute jaundice syndrome
EWARS Early Warning Alert and Response System
GC genomic copies
HAdV human adenoviruses
HAV hepatitis A Virus
HEV hepatitis E Virus
IDPs internally displaced persons
NCBI National Center for Biotechnology Information
nPCR nested PCR
ORF1 open reading frame 1
ORF2 open reading frame 2
PBS phosphate-buffered saline

PCR polymerase chain reaction
qPCR quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR reverse transcription-PCR
SD standard deviation
UV ultraviolet
WaSH water, sanitation and hygiene

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) and hepatitis A virus (HAV) are small, non-enveloped viruses that contain positive sense

SHORT COMMUNICATION

HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain

R Jordi,^{1,2} M Crespo,³ M Homs,^{1,2} E Van den Eyden,³ R Girones,⁴ J Rodriguez-Manzano,⁴ A Caballero,¹ M Buti,^{2,5} R Esteban^{2,5} and F Rodriguez-Frias²

¹Department of Biochemistry, Vall d'Hebron Hospital, University "Autonoma" of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Biomedical Research Network Center, Hepatic and Gastrointestinal Diseases, Carlos III Institut, Spanish Ministry of Health, Barcelona, Spain,

³Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron Hospital, University "Autonoma" of Barcelona, Barcelona, Spain,

⁴Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ⁵Department of Hepatology, Vall d'Hebron Hospital, University "Autonoma" of Barcelona, Barcelona, Spain

Objectives

The aim of the study was to assess the seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in an HIV-infected population, as determined by HEV immunoglobulin G (IgG) antibodies (anti-HEV).

Methods

The design of the study was cross-sectional. Serum anti-HEV IgG was determined by enzyme immunoassay in 238 HIV-infected patients consecutively attending our out-patient clinic between April and May 2011. In HEV-seropositive patients, HEV RNA was analysed by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Associations between anti-HEV and liver cirrhosis, route of HIV infection, hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) serological markers, age, sex and alanine aminotransferase (ALT) levels were examined by univariate and multivariate analysis.

Results

One hundred and forty patients (59%) had chronic liver disease (99% were HBV- and/or HCV-coinfected). Liver cirrhosis was detected in 44 individuals (19%). Two hundred and twelve patients (89%) were on antiretroviral treatment; the median CD4 T-cell count was 483 cells/ μ L [interquartile range (IQR) 313–662 cells/ μ L] and the HIV viral load was < 25 HIV-1 RNA copies/mL. Overall, 22 patients (9%) were anti-HEV positive. Liver cirrhosis was the only factor independently associated with the presence of anti-HEV, which was documented in 23% of patients with cirrhosis and 6% of patients without cirrhosis ($P = 0.002$; odds ratio 5.77). HEV RNA was detected in three seropositive patients (14%), two of whom had liver cirrhosis.

Conclusions

Our findings show a high prevalence of anti-HEV in HIV-infected patients, strongly associated with liver cirrhosis. Chronic HEV infection was detected in a significant number of HEV-seropositive patients. Further research is needed to ascertain whether cirrhosis is a predisposing factor for HEV infection and to assess the role of chronic HEV infection in the pathogenesis of cirrhosis in this population.

Keywords: hepatitis E virus, HIV infection, immunosuppression, liver cirrhosis, prevalence

Accepted 8 November 2011

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is an enterically transmitted RNA virus. It is a major cause of acute hepatitis outbreaks in endemic areas and acute sporadic cases in industrialized

Correspondence: Dr Francisco Rodriguez-Frias, Servicio de Bioquímica, Hospital General Vall d'Hebrón, Paseo Valle Hebrón s/n, Barcelona 08035, Spain. Tel: 34 (93) 2746100; fax: 34 (93) 2746831; e-mail: frarodri@vhebron.net