

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y métodos de control

Miembros del Comité Científico

Rosaura Farré Rovira, Francisco Martín Bermudo, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Mariano Domingo Álvarez, Antonio Herrera Marteache, Félix Lorente Toledano, M^º Rosario Martín de Santos, Emilio Martínez de Victoria Muñoz, M^º Rosa Martínez Larrañaga, Antonio Martínez López, Cristina Nerín de la Puerta, Teresa Ortega Hernández-Agero, Perfecto Paseiro Losada, Catalina Picó Segura, Rosa María Pintó Solé, Antonio Pla Martínez, Daniel Ramón Vidal, Jordi Salas-Salvadó, M^º Carmen Vidal Carou.

Secretario

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AESAN-2011-005

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 18 de mayo de 2011

Grupo de Trabajo

Rosa M. Pintó Solé (Coordinadora)

M^º Rosario Martín de Santos

Albert Bosch Navarro (Consultor externo)

Resumen

Los principales virus asociados con enfermedades de transmisión alimentaria son los Norovirus humanos (NoV), causantes de gastroenteritis, y el virus de la hepatitis A (HAV) que origina hepatitis aguda. Estos virus no se multiplican *in vitro*, o lo hacen con muchas dificultades, por lo cual su detección en alimentos se basa en técnicas moleculares. Los principales alimentos involucrados en infecciones víricas transmitidas por alimentos son los moluscos bivalvos, las verduras que se consumen crudas y las frutas tipo baya. La estandarización de los métodos moleculares es requisito indispensable para que se puedan adoptar en marcos reguladores e implementar de forma rutinaria en el análisis de alimentos. Un grupo de trabajo del Comité Europeo de estandarización (CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*) ha desarrollado y validado métodos de referencia para la detección de virus en matrices alimentarias. La determinación cuantitativa de virus en alimentos permitiría la predicción del riesgo sanitario asociado a su consumo, puesto que a mayor número de copias genómicas víricas mayor riesgo de infección.

Palabras clave

Norovirus humanos, virus de la hepatitis A, RNA, *Real-time*-RT-PCR, estandarización, copias genómicas.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the viral contamination of foodstuffs, with special emphasis on bivalve molluscs and control methods.

Abstract

The viruses primarily associated with food-borne illness are human Norovirus (NoV), causing gastroenteritis, and Hepatitis A virus (HAV) causing acute hepatitis. These viruses do not grow, or grow

with many difficulties, *in vitro* and thus their detection in food matrices relies on molecular techniques. The major foodstuffs involved in food-borne viral infections are bivalve molluscs, salad vegetables and berries. Standardization of molecular methods is necessary before their adoption within regulatory frameworks and their routinely implementation in food analysis. A European standardization working group (CEN/TC 275/WG6/TAG4-viruses in foods) has developed standard methods for virus detection in foodstuffs. Quantitative determination of viruses in food would allow the assessment of the associated health risk after consumption of bivalves with a given number of virus genome copies since higher number of genome copies correlate with higher risk of infection.

Key words

Human Noroviruses, Hepatitis A virus, RNA, Real-time-RT-PCR, Standardization, Genome copies.

Introducción

Los virus entéricos son aquellos transmitidos por la vía fecal-oral y por ende aquellos que potencialmente pueden estar presentes en alimentos que hayan sufrido contaminación con materia fecal.

Entre los virus entéricos humanos destacan diversos agentes productores de gastroenteritis como los Norovirus, Sapovirus, Astrovirus, Rotavirus y Adenovirus del grupo F, así como los agentes de las hepatitis entéricas (A y E). Atendiendo al número de brotes alimentarios asociados a estos agentes, los más importantes desde la perspectiva de seguridad vírica de los alimentos son: Norovirus genogrupo I (NoV GI) y II (NoV GII) y el virus de la hepatitis A (HAV). No obstante, no hay que menospreciar la posibilidad de que se originen futuros brotes alimentarios de gastroenteritis por Sapovirus, debido a su creciente incidencia en la población, así como de hepatitis E que aun siendo una hepatitis de baja incidencia en nuestras latitudes es muy común en China y sudeste asiático y, en el contexto actual de comercio global de alimentos, representa un riesgo potencial. Cabe destacar que algunos animales, como el cerdo y el jabalí, pueden también ser infectados por el virus de la hepatitis E y actuar como reservorio del virus, puesto que se han documentado algunos casos de infección en humanos por consumo de hígado poco cocinado proveniente de animales infectados.

Entre los alimentos que presentan un mayor riesgo de estar contaminados por virus entéricos destacan los moluscos bivalvos por su alta capacidad de filtración y de concentración de los virus potencialmente presentes en el agua de cultivo, así como las verduras que se consumen en ensalada y las frutas tipo baya irrigadas con aguas con aportes fecales. Este tipo de alimentos suelen consumirse crudos o poco cocinados incrementando al máximo el riesgo de infección. Asimismo, es posible la contaminación de los alimentos por una manipulación higiénica deficiente por parte de los manipuladores, tanto sintomáticos como asintomáticos, excretores de virus.

Un importante factor que contribuye a la transmisión de los virus entéricos a través de alimentos es su elevada estabilidad extracorpórea o ambiental que en algunos casos, como por ejemplo en el HAV, es extrema.

Debido a que los alimentos son una de las fuentes de transmisión de los virus entéricos, a que, en ocasiones, los brotes afectan a comunidades cerradas de poblaciones de riesgo (hospitales, residencias) y a que España es un importante país productor y consumidor de moluscos bivalvos, que son uno de los principales alimentos potencialmente involucrados en la transmisión de estos virus, la Dirección Ejecutiva de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha solicitado al Comité Científico la elaboración de un informe que valore el estado del conocimiento respecto a la contaminación vírica de los alimentos, con especial énfasis en moluscos bivalvos, y sus métodos de control.

Este informe permitirá valorar el grado de conocimiento sobre este tema en España y hacer un planteamiento de futuro respecto a las necesidades de información que se suscitan ante la posibilidad de que, por parte de la Comisión Europea, se establezcan límites para determinados virus en alimentos (moluscos bivalvos).

Biología de los Norovirus (NoV)

Los Norovirus (NoV) son miembros de la familia *Caliciviridae* (Fauquet et al., 2005) y como tales son virus no envueltos con cápside icosaédrica de unos 27-40 nm de diámetro en cuyo interior albergan un

genoma RNA de cadena simple de polaridad positiva de unas 7 Kb. Dicho genoma contiene tres pautas abiertas de lectura que codifican respectivamente para las proteínas no estructurales, que incluyen los enzimas requeridos en la replicación y una proteasa, la proteína mayoritaria de la cápside o VP1 y la proteína minoritaria de la cápside o VP2. Una característica muy importante del genoma de los Norovirus es su elevada variabilidad (Domingo y Vennema, 2008).

Por otra parte, hay que destacar que a pesar de inmensos esfuerzos no se ha conseguido replicar estos virus en cultivo celular (Duizer et al., 2004). Aunque existen referencias que indican lo contrario, la falta de reproducibilidad de los resultados descritos pone en duda la veracidad de la adaptación de los Norovirus a multiplicar en cultivo celular (Straub et al., 2007). Se cree que la incapacidad de replicar *in vitro* viene determinada por la falta del receptor(es) adecuados en las líneas celulares testadas puesto que la transfección del RNA vírico da lugar a ciclos infecciosos monocelulares (Guix et al., 2007). En definitiva, todo ello lleva a la utilización de técnicas moleculares para su detección (Kageyama et al., 2003) (Loisy et al., 2005) (Lowther et al., 2008). Ello unido a la alta variabilidad anteriormente citada implica la necesidad de escoger, mediante criterios muy sólidos las regiones mejor conservadas del genoma para el desarrollo de las técnicas moleculares de detección (Pintó y Bosch, 2008).

Los NoV se clasifican en cinco grandes genogrupos. Los NoV humanos pertenecen a los genogrupos I (GI), II (GII) y IV (GIV). Dentro del genogrupo II se encuentran también virus que infectan cerdos y en el genogrupo III virus que infectan bovinos y aunque no se ha demostrado de forma fidedigna se ha sugerido que podría tratarse de agentes zoonóticos. Cada genogrupo contiene múltiples genotipos que emergen y varían temporalmente (Koopmans, 2005) (Siebenga et al., 2007b) (Domingo y Vennema, 2008) (Kroneman et al., 2008). Los genogrupos se denominan por números romanos y los genotipos por números árabes (Atmar, 2010).

La transmisión de los NoV humanos se da, principalmente, vía ingestión de agua o alimentos contaminados así como por contacto persona-persona o por contacto con fomites contaminados. Ciertos genotipos se asocian más a un tipo de transmisión concreto. Así se ha descrito que el genotipo GII.4 se transmite mayoritariamente por contacto persona-persona, mientras que los brotes originados por consumo de bivalvos contaminados se asocian generalmente al genogrupo GI (Le Guyader et al., 2006b) (Siebenga et al., 2007a). No hay que olvidar que se ha demostrado que los Norovirus humanos del genotipo GI.1 se internalizan de forma específica en las células del hepatopáncreas de ostras (Le Guyader et al., 2006a). Además se han descrito diferencias entre los distintos genotipos en cuanto a la interacción con distintos ligandos. Así el genotipo GI.1 usa como ligando un carbohidrato que contiene un antígeno *A-like*, y que está presente sólo en células del hepatopáncreas, mientras que el genotipo GII.4 utiliza además de este carbohidrato otro que contiene ácido siálico y que se halla presente en la gran mayoría de tejidos (Le Guyader et al., 2006a) (Maalouf et al., 2010). Se cree que la unión a ligandos con ácido siálico sería más débil, de forma que los virus del genotipo GII.4 se internalizarían con menor eficiencia que la unión a ligandos con antígeno *A-like* lo cuál contribuiría a una mayor persistencia de los virus del genotipo I.1 y a una menor eficacia de los procesos de depuración.

El período de incubación de la enfermedad oscila de 10 a 51 horas y la dosis infecciosa es baja (Glass et al., 2009). Para el caso concreto del virus Norwalk, Teunis et al. (2008) estimaron una dosis infecciosa al 50% de entre 18 y 1.000 partículas víricas. En cierto tipo de alimentos como el marisco se detectan

habitualmente concentraciones muy superiores a las citadas, quedando patente el riesgo asociado (Le Guyader et al., 2003) (Le Guyader et al., 2010). Por otra parte, estos niveles de virus son excretados por pacientes antes de mostrar ninguna sintomatología e incluso después de que ésta haya cesado, lo cual pone de manifiesto el potencial papel de los manipuladores de alimentos en la transmisión de la gastroenteritis por NoV. Se estima que las gastroenteritis por NoV de origen alimentario representan entre un 12% y un 47% del total de gastroenteritis por NoV y el resto se originaría por contacto persona-persona o contacto con fomites contaminados (FAO/WHO, 2008).

Biología del virus de la hepatitis A (HAV)

El virus de la hepatitis A (HAV) pertenece a la familia *Picornaviridae* (Fauquet et al., 2005) y como tal es un virus desnudo con cápside icosaédrica de unos 27 nm de diámetro que contiene un RNA de polaridad positiva de unas 7 Kb. A diferencia de los NoV, el genoma de los picornavirus contiene una única pauta de lectura abierta. A nivel genético, el HAV destaca por tener una tasa de mutación alta a nivel de mutaciones sinónimas, dentro del intervalo de otros picornavirus, pero una tasa especialmente baja en cuanto a mutaciones no sinónimas (Sanchez et al., 2003), sobretodo a nivel de la cápside. Esta característica denota fuertes constricciones estructurales que explican la baja variabilidad aminoacídica de la región de la cápside y la existencia de un único serotipo. Sin embargo, bajo presión inmune se pueden seleccionar mutantes de escape a anticuerpos monoclonales *in vitro* (Aragonès et al., 2008) e incluso a las vacunas existentes *in vivo* (Perez-Sautu et al., 2011). La razón última de dichas constricciones estructurales se encuentra a nivel genómico en un uso muy sesgado de codones que es antagónico al de la célula hospedadora y con una localización estratégica de acumulaciones de codones raros en ciertas regiones del genoma codificante de la cápside, con el fin de ralentizar la velocidad de traducción y permitir el plegamiento correcto de la proteína (Aragonès et al., 2010). Ello permite al virus tener una cápside altamente cohesiva, siendo muy destacable la estabilidad del HAV frente a diversos agentes físicos y químicos, como altas temperaturas y bajo pH (Hollinger y Emerson, 2007), a diversas condiciones ambientales extremas, como desecación (Abad et al., 1994), y a desinfección (Abad et al., 1994). La necesidad de mantener estas agrupaciones de codones raros, que jugarían un papel importante en la biología estructural de la cápside del virus, explicaría la baja variabilidad aminoacídica puesto que es infrecuente una mutación que dé lugar a un cambio de aminoácido compatible con la estructura y que además conserve el grado de rareza del codón. Este uso especial de codones se debe además contextualizar con otras características muy particulares de la biología molecular del HAV como son una formación, altamente ineficiente, del complejo de iniciación de la traducción (Brown et al., 1994) (Whetter et al., 1994) y la incapacidad de inducir la inhibición de la síntesis proteica celular (Ali et al., 2001). En conjunto todo ello contribuye a unas tasas de replicación del virus muy bajas y así sólo unas pocas cepas del virus se han podido adaptar a la multiplicación en cultivo celular. Las cepas silvestres del virus se deben detectar por técnicas moleculares basadas en regiones altamente conservadas del genoma.

A pesar de existir un único serotipo del virus, se reconocen seis genotipos (I al VI) de los cuales el I, II y III corresponden a cepas humanas y el IV, V y VI a cepas de simio (Costa-Mattioli et al., 2002). No existen datos que indiquen que unos genotipos se transmitan más de un modo u otro, como se

ha señalado para los NoV, y ni siquiera parece que haya diferencias en cuanto a patogenicidad entre los distintos genotipos (Rezende et al., 2003). Los genotipos más bien denotan distintos orígenes geográficos (Robertson et al., 1992).

La hepatitis A es una hepatitis aguda que nunca cronifica. El período de incubación es de alrededor de tres semanas durante las cuales el virus se excreta asintómicamente en grandes cantidades en las heces de los pacientes. Ello es así porque es durante este período que el virus replica activamente en hígado, pero la sintomatología, que incluye elevación de las transaminasas e inflamación hepática, viene dada más por la respuesta inmune celular adaptativa al cabo de las tres semanas, que por la propia replicación vírica (Hollinger y Emerson, 2007). Otro problema añadido, desde la perspectiva de la contaminación de alimentos, es que en niños menores de 5 años la hepatitis A es mayormente asintomática pero el virus se excreta en grandes cantidades. La dosis infecciosa es muy baja y se ha estimado en 10-100 partículas (FDA/CFSAN, 1992). Como en el caso de los NoV estos bajísimos niveles se superan ampliamente en las heces de los pacientes (10^8 copias genómicas por gramo) y de ahí la importancia de los excretores asintomáticos.

A diferencia de los NoV, que son virus emergentes a escala global, el HAV es sólo endémico en países con condiciones sociosanitarias bajas y de ahí la trascendencia de las importaciones de alimentos contaminados (Costafreda et al., 2006) (Pinto et al., 2009) (Polo et al., 2010). Además, en los países no endémicos, como España, la población no entra en contacto con el HAV en la infancia con lo cual llega a la edad adulta inmunológicamente *naïve* y es precisamente en la edad adulta cuando se manifiesta la infección clínicamente más importante llegando a una mortalidad del 1% en la población de más de 60 años (Hollinger y Emerson, 2007).

Se estima que las hepatitis A de origen alimentario representan sólo alrededor del 5% del total y el resto se originarían por contacto persona-persona o contacto con fomites contaminados (FAO/WHO, 2008).

Detección y cuantificación molecular de NoV humanos y HAV en matrices alimentarias

Como se ha señalado anteriormente, ni las cepas silvestres del HAV ni los NoV humanos replican en cultivo celular lo cual hace necesaria la aplicación de técnicas moleculares para su detección y cuantificación, puesto que alternativas como la detección inmunológica presentan el inconveniente de falta de sensibilidad para la detección de los bajos niveles de contaminación presentes en los alimentos. En los últimos años se han publicado numerosas metodologías basadas en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), concretamente en la combinación de la retrotranscripción de RNA a cDNA y la amplificación del cDNA por PCR (técnica de RT-PCR), para la detección del HAV y NoV en matrices alimentarias. Sin embargo, aunque todas ellas, más o menos correctas dependiendo de una buena selección de *primers* de regiones altamente conservadas de los genomas, adolecen de falta de armonización y estandarización. Es por ello que un Comité de la Dirección General Sanco de la Unión Europea (UE) (CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*) está desarrollando y validando desde 2004 una doble metodología estandarizada (cuantitativa y cualitativa) para la detección del HAV y NoV humanos en matrices alimentarias (verduras de ensalada, superficies alimentarias, frutas tipo

baya, moluscos bivalvos y agua embotellada) con el fin de establecer métodos de referencia. La parte primera del estándar (método cuantitativo) y la segunda parte (método cualitativo) se presentaron en 2009 y 2010, respectivamente, a los países miembros del Comité Europeo de Normalización (CEN) para su valoración técnica y formal. La publicación definitiva de los métodos se espera para 2012.

La estandarización de las metodologías se basa en tres puntos:

- En primer lugar, es clave escoger las regiones más conservadas del genoma de los virus a detectar, para que las técnicas sean de amplio espectro. La estructura secundaria del genoma de los virus RNA puede tener en sí misma una función determinante en el ciclo replicativo del virus. Por ello, es evidente que las regiones genómicas involucradas en la formación de dichas estructuras deberán ser altamente conservadas entre cepas y, por lo tanto, que la secuencia de las mismas tenderá a ser menos variable. Diseñar *primers* dirigidos contra dichas regiones es un valor seguro para hacer frente a la alta tendencia a la variación que presentan los virus RNA (Pintó y Bosch, 2008). En el caso del HAV, la región mejor/más altamente conservada se halla en el extremo 5' no codificante del genoma puesto que contiene una estructura secundaria implicada en la formación del complejo de iniciación de la traducción, concretamente la estructura denominada IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Costafreda et al., 2006). En el caso de los NoV no existe una estructura parecida al IRES del HAV y una alternativa es la región comprendida entre el final del ORF1 (pauta de lectura abierta codificante de la polimerasa) y el principio del ORF2 (pauta de lectura abierta que codifica para las proteínas de la cápside) o unión ORF1/ORF2 dónde se ha detectado un alto grado de conservación filogenética y dónde presumiblemente debe de existir una estructura del RNA que permita la síntesis del RNA subgenómico molde para la producción de altas cantidades de proteínas de la cápside (Kageyama et al., 2003).
- En segundo lugar, las reacciones moleculares para la retrotranscripción del RNA (Transcriptasa inversa, RT) hasta cDNA y su posterior amplificación (Polimerasas termoestables) son muy sensibles, particularmente la RT, a diversidad de inhibidores. Es por ello necesario la inclusión de controles exhaustivos que convenientemente adicionados a los tubos de reacción permitan controlar la eficiencia de las actividades enzimáticas.
- En tercer lugar, y de forma muy importante, es necesario controlar el punto más crítico de la detección de virus en alimentos: el proceso de extracción de los virus y sus genomas. Cualquier método molecular, por sensible que sea, será un rotundo fracaso si no se consigue extraer de forma eficiente los ácidos nucleicos a detectar. Por desgracia, no existen métodos milagrosos para la extracción de los ácidos nucleicos víricos a partir de matrices alimentarias y los mejores de ellos ofrecen eficiencias que no suelen superar el 10%. Por ello es de vital importancia controlar la eficiencia de dicho proceso y la mejor alternativa es el uso de un virus modelo añadido a concentraciones conocidas a la muestra, previamente al proceso de extracción. Dicho virus control debe cumplir una serie de requisitos que son: tener una estructura parecida y propiedades fisicoquímicas similares a los virus diana a detectar, que nunca pueda estar presente en las muestras y por supuesto que no tenga potencial patogénico, es decir un virus atenuado (Pintó y Bosch, 2008).

Todas estas premisas se contemplan y cumplen rigurosamente en el protocolo CEN/TC 275/WG6/ TAG4-*viruses in foods*. Además, la inclusión de los controles descritos permite no sólo detectar cualitativamente la presencia de virus en alimentos, sino que disponiendo de sistemas de determinación de las eficiencias de los puntos críticos de la técnica permite cuantificar con buena precisión el número de copias genómicas presentes en la muestra.

Disponer de una metodología estandarizada que permita comparar datos obtenidos por distintos laboratorios y analizar la contaminación de productos de diversas procedencias geográficas representa un valor añadido importantísimo desde la perspectiva de la seguridad vírica de los alimentos. Sin embargo, las técnicas moleculares adolecen de no proporcionar información sobre el potencial infeccioso de los virus presentes en una muestra alimentaria, puesto que lo que se determina es la presencia del genoma de los virus (técnicas cualitativas) o el número de copias genómicas (técnicas cuantitativas) y ello no es sinónimo de infectividad, puesto que podría ser que la cápside del virus estuviera alterada e incapaz de unirse al receptor e iniciar el ciclo biológico, o incluso que el genoma estuviera alterado en otras regiones distintas a la de detección. Es por ello de vital importancia llevar a cabo estudios rigurosos del nivel de contaminación presente en distintos tipos de alimentos y con procedencias distintas y compararlo con los niveles de ataque asociados entre sus consumidores, para intentar determinar el nivel máximo permisible de copias genómicas en dichos alimentos. Es decir, al menos para las técnicas cuantitativas, se trata de establecer unos límites por debajo de los cuales el riesgo de infección tras el consumo de esos alimentos sea muy bajo, teniendo en cuenta que el riesgo cero no existe.

Contaminación por NoV humanos y HAV en moluscos bivalvos: revisión bibliográfica

El tipo de alimento que ha sido analizado de forma más exhaustiva y rutinaria para la detección de virus entéricos es el molusco bivalvo. Por ello, este informe se centra en los datos existentes en este tipo de matriz alimentaria.

Los moluscos bivalvos son animales filtradores que concentran el material particulado presente en los grandes volúmenes de agua que diariamente filtran con el fin de obtener su alimentación. Entre dicho material particulado se pueden encontrar protozoos, bacterias y virus que infectan humanos si las aguas de cultivo han recibido vertidos fecales. Aunque estos agentes patógenos se encuentran diluidos en el agua de cultivo, después del proceso de filtrado quedan concentrados en los tejidos de los bivalvos, especialmente en el hepatopáncreas. En la actualidad no existen tratamientos de depuración de marisco bivalvo cien por cien efectivos en la eliminación de virus, y los que consiguen mayores eliminaciones son incompatibles con las exigencias organolépticas de este tipo de alimento. Por ello, la prevención de las infecciones asociadas al consumo de bivalvos pasa por el control de las aguas de cultivo. Sin embargo, los criterios microbiológicos clásicos basados en recuentos de *Escherichia coli* en el agua de cultivo o en tejido de bivalvo no garantizan la ausencia de virus en los bivalvos. Por ello, es recomendable la detección y/o cuantificación de virus ya sea en las aguas de cultivo o en el propio marisco bivalvo. El laboratorio de referencia para el control de la calidad vírica del marisco bivalvo de Europa, en colaboración con los laboratorios de referencia de los Estados miembros de la UE, ha optado por el control de virus en producto final.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de muestras positivas para NoV humanos y/o HAV en distintos estudios que analizan la presencia de dichos virus en moluscos bivalvos recolectados y distribuidos en distintos países europeos durante el período 2001-2008. En nueve estudios se analizaron sólo NoV, en dos sólo HAV y en cinco ambos virus. En estos últimos estudios, que comprenden análisis de muestras procedentes de Francia, España e Italia, destaca la mayor frecuencia de detección de NoV humanos. Además, se pone de manifiesto la alta prevalencia de HAV en muestras originarias de Italia, concretamente en los mares Jónico y Adriático que bañan las costas de la región de la Puglia que es endémica para hepatitis A. En el resto de estudios de marisco procedente de otros países europeos destaca la alta frecuencia de detección de NoV humanos que es, por otro lado, independiente de la categoría de la zona de recolección, es decir no existe correlación entre la positividad para NoV humanos y el nivel de contaminación bacteriano de la zona de cultivo. Dicha observación está en concordancia con muchos trabajos publicados con anterioridad (Le Guyader et al., 2000) (Romalde et al., 2002) (Vilarino et al., 2009). Y de ahí un argumento más para el control de la presencia de virus en marisco puesto que no hay garantía de ausencia de virus con las actuales normas de clasificación de las zonas de cultivo. Sin embargo, ello no significa que no deba controlarse el agua de las zonas de cultivo sino todo lo contrario hay que controlarlas según los criterios microbiológicos habituales y además se debe establecer un control de la presencia de virus.

Tabla 1. Porcentaje de muestras de marisco positivas para NoV humanos y/o HAV en distintos estudios de análisis de marisco recolectado en las costas europeas							
País de origen	Punto muestreo	Fecha de recolección	Número muestras	Técnica detección	NoV	HAV	Referencia
Francia	Tienda al detalle	2004-2008	58	<i>Real time</i>	12%	NT ¹	(Boxman, 2010)
	Holanda			RT-PCR			
	Tienda al detalle Suiza	2001-2002	61	RT-PCR	13%	0%	(Beuret et al., 2003)
España							
Galicia	Área B	2005	24	<i>Real time</i> RT-PCR	58%	0%	(Vilarino et al., 2009)
	Área C	2005	17	<i>Real time</i> RT-PCR	53%	0%	(Vilarino et al., 2009)
Italia							
Delta del río Po	Área B	2005-2006	96	RT-PCR y <i>Real time</i>	10%	0%	(Suffredini et al., 2008)
Mar Adriático	Área B	2003-2004	235	RT-PCR	14%	6%	(Crocì et al., 2007)
Puglia	Tienda al detalle Italia	2005-2008	116	RT-PCR	12%	NT	(Terio et al., 2010)
Mar Jónico	Área B	2002	29	RT-PCR	NT	90%	(Di Pinto et al., 2003)
Mar Jónico	Área C	2002	20	RT-PCR	NT	30%	(Di Pinto et al., 2003)
Gran Bretaña/Irlanda							
Gran Bretaña	Área B	2004-2006	237	<i>Real time</i> RT-PCR	57%	NT	(Lowther et al., 2008)
Irlanda	Área A	2005-2007	119	<i>Real time</i> RT-PCR	31%	NT	(Flannery et al., 2009)
Irlanda	Área B	2005-2007	42	<i>Real time</i> RT-PCR	54%	NT	(Flannery et al., 2009)
Irlanda	Área C	2005-2007	6	<i>Real time</i> RT-PCR	33%	NT	(Flannery et al., 2009)
Holanda							
Holanda	Tienda al detalle	2004-2008	126	<i>Real time</i>	9%	NT	(Boxman, 2010)
	Holanda			RT-PCR			
Holanda	Área A	2004-2008	104	<i>Real time</i> RT-PCR	1%	NT	(Boxman, 2010)
Holanda	Área A	2003-2004	21	RT-PCR	5%	NT	(Boxman et al., 2006)
Alemania/Países Nórdicos							
Alemania/ Dinamarca	Área A	2004-2008	36	<i>Real time</i> RT-PCR	11%	NT	Boxman, comunicación personal
Noruega	Área A	2000-2003	681	<i>Real time</i> RT-PCR	7%	NT	(Myrnel et al., 2004)

¹NT: No tratado. **Fuente:** (Boxman, 2010).

Niveles de contaminación por NoV humanos y HAV en moluscos bivalvos distribuidos en España

Distintos laboratorios españoles están ya implementando las metodologías desarrolladas en el CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods* para el control y cuantificación de virus en marisco.

En la Tabla 2 se muestran los niveles de contaminación para NoV humanos GI y GII y HAV de distintos tipos de marisco de diversa procedencia. Los resultados mostrados son las medias de las copias genómicas crudas por gramo de hepatopáncreas, sin aplicar los factores de corrección de eficiencia de extracción y amplificación, puesto que la metodología CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods* establece que las muestras con eficiencias de extracción y/o amplificación <1% no son cuantificables y deben considerarse simplemente positivas. Mientras la eficiencia de la técnica de RT-PCR suele ser muy buena, un porcentaje considerable de los análisis adolece de una extracción ineficiente. Es por ello que la Tabla 2 sólo incluye valores crudos puesto que la eficiencia de extracción de muchas muestras es inferior al 1% de corte. Que la eficiencia de extracción es el paso más crítico en la detección y particularmente en la cuantificación de virus en muestras de moluscos bivalvos es un hecho ampliamente descrito (Costafreda et al., 2006) (Pintó y Bosch, 2008) (Le Guyader et al., 2009). Pero además, la eficiencia de la extracción depende en gran medida de la experiencia y familiarización de los laboratorios en las metodologías empleadas. La Tabla 3 refleja la alta variabilidad entre laboratorios, hecho que de nuevo justifica la necesidad de incluir controles de extracción en los ensayos.

Tabla 2. Análisis de los niveles de contaminación vírica de marisco distribuido en España. Los virus testados son NoV humanos GI y GII y HAV. La concentración vírica se expresa como media \pm SD de las copias genómicas brutas por gramo de hepatopáncreas, es decir sin aplicar correcciones debidas a las eficiencias de los procesos de extracción y/o amplificación. En aquellos casos dónde se dispone de una única muestra se indica el resultado puntual. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias

Alimento	País origen	NoV GI	NoV GII	HAV
<i>Meretrix lyrata</i>	Corea del Sur/Vietnam	$2,5 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$	<1	$1,9 \times 10^3$
<i>Tapes decussatus</i>	España	$4,5 \times 10^3 \pm 4,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2 \pm 9,9 \times 10^1$	$4,5 \times 10^2 \pm 2,7 \times 10^2$
<i>Transennella pannosa</i>	Perú	$6,5 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^3 \pm 8,7 \times 10^2$	<1
<i>Ensis</i> spp.	Marruecos	$1,1 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	<1	<1
<i>Mytilus edulis</i>	España	<1	$3,4 \times 10^2 \pm 4,2 \times 10^2$	<1
<i>Callista chione</i>	Marruecos	$5,3 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^4$	<1	<1
<i>Ostrea edulis</i>	Desconocido	$4,4 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2 \pm 7,6 \times 10^1$	<1
<i>Donax</i> spp.	Marruecos/Perú	$8,8 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3 \pm 6,4 \times 10^3$

Datos proporcionados por: Dra. Susana Guix del Laboratorio de Virus Entéricos, del Departamento de Microbiología y el Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Barcelona; Dr. Jesús López-Romalde del Departamento de Microbiología y Parasitología y Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS)-Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela; Dra. Joana Pardos de la Agència de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Girona; Dr. David Tomás de AINIA Centro Tecnológico, Valencia.

Tabla 3. Porcentaje de muestras de marisco con eficiencias de extracción de virus y ácidos nucleicos consideradas malas (<1%), y que requieren repetir el análisis, aceptables (1%-10%) y buenas (>10%)

Eficiencia Extracción	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Media±SD
<1%	0	3	100	23	31±47
1%-10%	95	45	0	59	50±39
>10%	5	52	0	18	19±23

En la Tabla 4 se muestran los valores corregidos de todas aquellas muestras para las que se obtuvieron eficiencias de extracción por encima del nivel de corte del 1% propuesto por la metodología CEN/TC 275/WG6/TAG4-*viruses in foods*. Como puede observarse los niveles de copias genómicas por gramo de hepatopáncreas aumentan de forma significativa debido a los factores de corrección.

Tabla 4. Análisis de los niveles de contaminación vírica de marisco distribuido en España. Los virus testados son NoV humanos GI y GII y HAV. La concentración vírica se expresa como media ± SD de las copias genómicas por gramo de hepatopáncreas corregidas teniendo en cuenta las eficiencias de extracción y/o amplificación. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias. En aquellos casos dónde se dispone de una única muestra se indica el resultado puntual. Las muestras negativas no se incluyen en el cálculo de las medias

Alimento	NoV GI	NoV GII	HAV
<i>Meretrix lyrata</i>	$2,6 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$	<1	ND*
<i>Tapes decussatus</i>	ND	$7,7 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^3$	ND
<i>Ensis</i> spp.	$6,7 \times 10^5 \pm 8,9 \times 10^3$	ND	ND
<i>Mytilus edulis</i>	ND	$8,4 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^2$	ND
<i>Donax</i> spp.	$2,2 \times 10^4$	ND	$2,5 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$

*ND. No determinado por falta de datos sobre las eficiencias de extracción y/o amplificación o por ser eficiencias inferiores al 1%.

En cualquier caso es destacable la mayor frecuencia de detección de NoV que de HAV y los mayores niveles de NoV GI que GII. Estos resultados están en concordancia con la bibliografía (Le Guyader et al., 2006b).

Seguridad vírica de los alimentos

Como se indicaba anteriormente, no existen datos que permitan confirmar que todo el marisco contaminado con virus se asocie a patología en el consumidor. Que se dé una infección vírica tras el consumo de un alimento contaminado va a depender de una serie de factores, entre ellos: 1) del número de virus presentes en el alimento, 2) del procesado del alimento que podrá contribuir a inactivar el virus, 3) de la estabilidad del virus frente a ese procesado, 4) de la dosis infecciosa del virus y evidentemente 5) de la susceptibilidad del individuo consumidor. Este último punto es individual e incontrolable, la dosis infecciosa de NoV humanos y particularmente del HAV es muy baja, como ya se ha indicado anteriormente, en cuanto al procesado la mayoría de alimentos se van a consumir crudos o poco hechos y además hay que tener en cuenta que estamos frente a agentes altamente estables y, por lo tanto, el punto más controlable es el nivel de contaminación.

Por todo ello y para hacer compatibles la seguridad vírica de los alimentos y la economía del sector productivo, de aquellos alimentos contaminados en origen, no es suficiente con detectar virus sino que es recomendable cuantificar los títulos de copias genómicas de forma estandarizada y establecer niveles de permisibilidad por encima de los cuáles el alimento testado sea considerado no apto para el consumo, al menos mientras no existan sistemas de inactivación vírica efectivos que no afecten las propiedades organolépticas de los alimentos en cuestión.

La gran incógnita, sin embargo, sigue siendo la determinación del potencial replicativo de las copias genómicas. Reformulando la pregunta: ¿cuántas copias genómicas han de ingerirse para originar una infección en un individuo susceptible? Esta es la pregunta clave para la cuál todavía no existe una respuesta exacta. Para el caso del HAV se ha descrito que la relación "nativa", es decir sin que medie ningún tipo de mecanismo de inactivación, entre partículas físicas o copias genómicas y virus infecciosos, es de aproximadamente 60:1 (Jansen et al., 1988) (Deng et al., 1994). Por otro lado, un estudio llevado a cabo durante la investigación de un brote de hepatitis A causado por el consumo de tellinas contaminadas (Costafreda et al., 2006) (Pinto et al., 2009) describe la existencia de linealidad entre la dosis infecciosa, calculada en base a la relación anteriormente citada de copias genómicas: virus infecciosos de 60:1 y determinando el título de copias genómicas mediante una metodología estandarizada que incluye factores correctivos para la eficiencia de extracción y amplificación, y el nivel de infección en la población consumidora. Así se estima que $4,3 \times 10^3$ copias genómicas (72 partículas infecciosas) producirían infección en un 11% de los consumidores, $2,5 \times 10^4$ copias genómicas (420 partículas infecciosas) producirían infección en un 36% de los consumidores y $3,5 \times 10^4$ copias genómicas (582 partículas infecciosas) producirían infección en un 41% de los consumidores. En el caso de NoV humanos la relación de copias genómicas: virus infecciosos no se ha podido determinar debido a la falta de cepas que se multipliquen en cultivo celular. No obstante, sí existen estudios que demuestran correlación positiva entre la carga vírica en alimentos y su capacidad para producir infección (Lowther et al., 2010), aunque por falta de aplicación de factores correctivos y la utilización de unidades de PCR en lugar de copias genómicas es difícil comparar los resultados publicados con otros que se puedan generar.

En cualquier caso la implementación de metodologías estandarizadas para la determinación de las copias genómicas de NoV humanos y HAV en alimentos potencialmente contaminados en origen, aunque no defina de forma exacta el potencial de riesgo asociado, sí constituye una aproximación y por ende representa un paso adelante en el control de la seguridad vírica de los alimentos y un valor añadido para aquellos alimentos que se consideren aptos para el consumo.

Sin embargo, es importante enfatizar que sólo un porcentaje pequeño de las gastroenteritis por NoV y hepatitis A están directamente asociadas al consumo de alimentos. La gran mayoría de casos son por contacto persona-persona o por contacto con fomites contaminados y estos casos podrían prevenirse con medidas higiénicas correctas como el lavado de manos frecuente y sobretodo después de usar el baño.

Conclusiones del Comité Científico

1. La presencia de virus entéricos, particularmente Norovirus humanos y el virus de la hepatitis A, en alimentos contaminados con materia fecal es causa de gastroenteritis y hepatitis entéricas de origen alimentario. Así pues se hace necesario controlar su presencia con métodos suficientemente

- sensibles para detectar los bajos niveles de virus presentes en dichos alimentos que sin embargo representan un riesgo sanitario por la baja dosis infecciosa de los virus entéricos. Con todo es necesario destacar que la mayoría de infecciones por Norovirus humanos y el virus de la hepatitis A se originan por contacto persona-persona y por contacto con fomites contaminados y que el porcentaje de casos asociados a consumo de alimentos contaminados es bajo.
2. Los alimentos más frecuentemente asociados a gastroenteritis y hepatitis son los contaminados en origen como moluscos bivalvos, verduras de ensalada y frutos tipo baya que se consumen crudos o poco cocinados y en menor medida alimentos contaminados por manipulación incorrecta después de su cocinado.
 3. Los Norovirus humanos y las cepas silvestres del virus de la hepatitis A no multiplican *in vitro* en cultivos celulares. Por ello, los métodos más adecuados para su detección gracias a su sensibilidad son los basados en la amplificación por PCR y concretamente en la técnica de RT-PCR, ya que se trata de virus RNA.
 4. Las técnicas actuales de RT-PCR a tiempo real permiten detectar y cuantificar la carga viral de una muestra. Sin embargo, requieren de una exhaustiva estandarización y de la inclusión de controles de los pasos críticos de la técnica que son la extracción de virus y ácidos nucleicos y las reacciones moleculares de RT-PCR. La metodología desarrollada por el Comité Europeo de Normalización CEN/TC 275/WG6/TAG4-viruses *in foods*, cumple con estos requisitos y va ser próximamente publicada.
 5. Aunque las técnicas moleculares de cuantificación (copias de genomas víricos) adolecen de falta de información sobre el potencial infeccioso de las muestras analizadas, existen datos que confirman la correlación entre título de copias genómicas y potencial infeccioso de la muestra. A partir de aquí es necesario definir los límites máximos de copias genómicas permisibles presentes en muestras alimentarias a fin de disminuir al máximo el riesgo para la salud teniendo en cuenta que el riesgo cero no existe.

Referencias

- Abad, F.X., Pinto, R.M. y Bosch, A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp: 3704-3710.
- Abad, F. X., Pinto, R. M., Diez, J. M. y Bosch, A. (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp.: 2377-2383.
- Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J. y Jackson, R.J. (2001). Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *The Journal of Virology*, 75, pp: 7854-7863.
- Aragonès, L., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2008). Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *The Journal of Virology*, 82, pp.: 1688-1700.
- Aragonès, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2010). Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathogens*, 6, pp: e1000797.
- Atmar, R. (2010). Noroviruses: State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2, pp: 117-126.
- Beuret, C., Baumgartner, A., y Schluep, J. (2003). Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp.: 2292-2297.
- Boxman, I.L., Tilburg, J.J., te Loeke, N.A., Vennema, H., Jonker, K., de, B.E. y Koopmans, M. (2006). Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108, pp: 391-396.

- Boxman, I. (2010). Human enteric viruses occurrence in shellfish from European markets. *Food and Environmental Virology*, 2, pp: 156-166.
- Brown, E.A., Zajac, A.J. y Lemon, S.M. (1994). In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *The Journal of Virology*, 68, pp: 1066-1074.
- 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. y Ferre, V. (2002). Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *The Journal of Virology*, 76, pp: 9516-9525.
- Costafreda, M.I., Bosch, A. y Pinto, R.M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time taqman reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp: 3846-3855.
- Croci, L., Losio, M.N., Suffredini, E., Pavoni, E., Di Pasquale, S., Fallacara, F. y Arcangeli, G. (2007). Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 114, pp: 252-257.
- Deng, M.Y., Day, S.P. y Cliver, D.O. (1994). Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp: 1927-1933.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Tantillo, G.M., Terio, V. y Buonavoglia, C. (2003). Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *Journal of Food Protection*, 66, pp: 1681-1685.
- Domingo, E. y Vennema, H. (2008). Viral evolution and its relevance for food-borne virus epidemiology. En libro: *Foodborne Viruses: Progress and challenges*. M. Koopmans, M., Cliver, D.O. y Bosch, A. Washington DC, ASM Press, pp: 147-169.
- Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P. y Estes, M.K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85, pp: 79-87.
- FAO/WHO (2008). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Virus in food: Scientific advice to support risk management activities. Disponible en: http://www.fao.org/ag/AGN/agns/jemra/Viruses_in_food_MRA.pdf. [acceso: 15-7-11].
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L.A. (2005). Virus taxonomy. En libro: *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, Elsevier Academic Press.
- FDA/CFSAN (1992). Food and Drug Administration/Centre for Food Safety and Applied Nutrition. Hepatitis A virus. Disponible en: <http://seafoodhaccp.com/SeafoodData/BadBugBook/CHAP31.HTML> [acceso: 15-7-11].
- Flannery, J., Keaveney, S. y Dore, W. (2009). Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. *Journal of Food Protection*, 72, pp: 2358-2362.
- Glass, R.I., Parashar, U.D. y Estes, M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 361, pp: 1776-1785.
- Guix, S., Asanaka, M., Katayama, K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Atmar, R.L. y Estes, M.K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *The Journal of Virology*, 81, pp: 12238-12248.
- Hollinger, F.B. y Emerson, S.U. (2007). Hepatitis A virus. En libro: *Fields Virology*. 5th ed. Knipe, D.M. y Howley, P.M. Filadelfia. Lippincott Williams and Wilkins, pp: 911-947.
- Jansen, R.W., Newbold, J.E. y Lemon, S.M. (1988). Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis a virus: Comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology*, 163, pp: 299-307.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. y Katayama, K. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp: 1548-1557.
- Koopmans, M. (2005). Outbreaks of viral gastroenteritis: what's new in 2004? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18, pp: 295-299.

- Kroneman, A., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., Van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Bottiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Koch, J., Szucs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandez-Pezzi, G., Hedlund, K.O. y Koopmans, M. (2008). Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *Journal of Public Health*, 30, pp: 82-90.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. y Pommepuy, M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp: 3241-8.
- Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M. y Atmar, R.L. (2003). A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 87, pp: 107-12.
- Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoen-Clouet, N., Pommepuy, M. y Le Pendu, J. (2006a). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp: 931-936.
- Le Guyader, F.S., 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. y Ruggeri, F.M. (2006b). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp: 3878-3882.
- Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M. y Atmar, R.L. (2009). Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp.: 618-624.
- Le Guyader, F.S., Krol, J., mbert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L. y Le, P.J. (2010). Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, pp: 915-920.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M. y Le Guyader, F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virology Methods*, 123, pp: 1-7.
- Lowther, J.A., Henshilwood, K. y Lees, D.N. (2008). Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 1427-1433.
- Lowther, J.A., Avant, J.M., Gizynski, K., Rangdale, R.E. y Lees, D.N. (2010) Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *Journal of Food Protection*, 73, pp: 305-311.
- Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.C., Atmar, R.L. y Le Guyader, F.S. (2010). Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp: 5621-5630.
- Mymel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E. y Grinde, B. (2004). Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp: 2678-2684.
- Perez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Cayla, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. y Pintó, R.M. (2011). Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp: 734-738.
- Pintó, R.M. y Bosch, A. (2008) Rethinking virus detection in food. En libro: *Foodborne viruses: Progress and challenges*. Koopmans, M., Cliver, D.O. y Bosch, A. Washington DC, ASM Press, pp: 171-188.
- Pintó, R.M., Costafreda, M.I. y Bosch, A. (2009). Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp: 7350-7355.
- Polo, D., Vilarino, M.L., Manso, C.F. y Romalde, J.L. (2010). Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 16, pp: 1036-1038.
- Rezende, G., Roque-Afonso, A.M., Samuel, D., Gigou, M., Nicand, E., Ferre, V., Dussaix, E., Bismuth, H. y Feray, C. (2003) Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*, 38, pp: 613-8.

- Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K., Ishizu, T., Moritsugu, Y. y Lemon, S.M. (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*, 73, pp: 1365-1377.
- Romalde, J.L., Area, E., Sanchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pinto, R.M., Barja, J.L. y 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, pp: 119-130.
- Sanchez, G., Bosch, A. y Pinto, R.M. (2003). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *Journal of Virology*, 77, pp: 452-459.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Duizer, E. y Koopmans, M.P. (2007a). Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp: 144-146.
- Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J. y Koopmans, M. (2007b). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology*, 81, pp: 9932-9941.
- Straub, T.M., Höner zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P.O., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M. y Nickerson, C.A. (2007). In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp: 396-403.
- Suffredini, E., Corrain, C., Arcangeli, G., Fasolato, L., Manfrin, A., Rossetti, E., Biazzi, E., Mioni, R., Pavoni, E., Losio, M.N., Sanavio, G. y Croci, L. (2008). Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. *Letters in Applied Microbiology*, 47, pp: 467-474.
- Terio, V., Martella, V., Moschidou, P., Di Pinto, P., Tantillo, G. y Buonavoglia, C. (2010). Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology*, 27, pp: 29-32.
- Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J. y Calderon, R.L. (2008). Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80, pp: 1468-1476.
- Vilarino, M.L., Le Guyader, F.S., Polo, D., Schaeffer, J., Krol, J. y Romalde, J.L. (2009). Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *International Microbiology*, 12, pp: 145-151.
- Whetter, L.E., Day, S.P., Elroystein, O., Brown, E.A. y Lemon, S.M. (1994). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *Journal of Virology*, 68, pp: 5253-5263.

