



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Millores en la detecció molecular de virus en aigües i aliments

Noemí Fuster i Rabat



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
Facultat de Biologia

MILLORES EN LA DETECCIÓ MOLECULAR DE VIRUS EN AIGÜES I ALIMENTS

Memòria presentada per Noemí Fuster i Rabat per a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Director i tutor

Dr. Albert Bosch Navarro

Directora

Dra. Susana Guix Arnau

Doctoranda

Noemí Fuster i Rabat

Barcelona, 2021

A la meva mare

“Qui dubta i no investiga, no només esdevé infeliç sinó també injust”

Blaise Pascal

E.O Wilson va dir una vegada: *Cada espècie és una obra mestra.*

Gràcies als virus, que m’han meravellat d’ençà que vaig ser conscient del miracle que suposen. Tant de bo aquesta tesi, o aquesta introducció, despertí la curiositat d’alguna altra persona per endinsar-se en aquest fascinant món.

Agraïments

Per a totes les persones que prediquen sobre els miracles del MMS, les terraplanistes, les creacionistes i les antivacunes i, en general, a totes aquelles persones que posen pals a les rodes a l’evolució de la nostra espècie. Per a totes vosaltres, una mica de llum sota el prisma de la ciència.

Vull agrair especialment:

A la meva mare, aquesta tesi és més seva que meva. Gràcies per no haver desistit.

A l’Ari, companya de viatge, per unir-se a l’últim round i patir-ne les conseqüències.

Al Víctor, per trobar la manera de fer-ho. *Landing with delay*, però aquí hi som. Gràcies per tant.

A l'Helena, per la gran ajuda i per la meravellosa foto en el ferry de Gàmbia. M'ha fet tornar a obrir la tesi algun cop que l'havia tancat abans d'hora.

A la meva germana Carla, que és molt més lluitadora que jo.

Tietes, tiets, cosins, cosines, amics, amigues i al meu pare, que han patit la tesi i que durant molts anys ha estat tema tabú en les nostres converses. I als/les que no hi són, perquè han estat exemple de perseverança.

Gràcies també al Dr. Feliu, per fer-me creure encara a dia d'avui amb la idea romàntica de la recerca en l'àmbit científic.

Creieu-me si us dic que la sola finalització d'aquesta tesi és una celebració familiar.

I entrant de nou al departament, obrint les portes amb els colzes, voldria agrair a:

Dra. Prieto, per ser un oasi en mig del Departament de Micro i responsable de la meva fascinació per Hildegarda Von Bingen.

Dra. Durfort, la meva tutora al llarg de la llicenciatura, gràcies per ser un far i un ideal científic i humà a voler assolir.

Mari (MAI), per advertir-me del que és fer una tesi i per acompanyar-me en els primers passos.

I a totes les dones científiques. No defalliu, encara no som on volem ser.

A l'Albert Blanco (Blanco et al), pels moments friquis que hem tingut i al Dr. Kike Rivadulla, una amistat que ha arribat fins a terres africanes. Per a mi sempre sereu els becaris del lab6.

I molt especialment a l'Albert i la Rosa per obrir-me les portes del Departament abans d'acabar la llicenciatura i per donar-me l'oportunitat de fer una tesi doctoral.

El Dr. Bosch, aquella persona que t'agradaria poder-li treure un microxip del cap, inserir-te'l i obtenir-ne tots els seus coneixements que tant de temps i esforç li deuen haver costat. I obtenir un gran saber sobre virologia, música clàssica i aquelles anècdotes sobre les lleones de no sé quin país africà.

I la Dra. Pintó, sempre envejaré aquest art que tens per explicar de manera entenedora conceptes que de vegades crec que escapen del coneixement humà, si més no, conceptes que per més que els llegeixi no acabo d'entendre, fins que compares l'ús esbiaixat de codons del virus de l'hepatitis A amb l'elaboració d'una amanida de tomàquet de Montserrat i ceba de Coll de Nargó.

I a la Dra. Susanna Guix, pel seu temps, la paciència, empatia i per transmetre tranquil·litat quan més ho he necessitat.

L'ètnia fula té una dita: *"Vés sempre pel camí que té arbres"*, d'aquesta manera sempre et podràs orientar. Gràcies a tots vosaltres per haver estat els meus arbres en aquest llarg camí.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

ABREVIATURES I GLOSSARI	1
INTRODUCCIÓ	5
1. ELS VIRUS ENTÈRICS	7
2. Diagnòstic	15
3. Els secrets millor guardats.....	18
4. Virus de l'Hepatitis A	19
4.1 Història	20
4.2 Descobrint-lo a nivell molecular	28
4.3 El seu cicle biològic	30
4.4 Proteïnes virals: estructurals i no estructurals	31
4.5 La seva estratègia replicativa	32
4.6 Característiques antigèniques	32
4.7 Immunitat i patogènesis	34
4.8 Epidemiologia	34
4.9 Clínica	36
5. Norovirus	37
5.1 Història	38
5.2 Descobrint-lo a nivell molecular	42
5.3 El seu cicle biològic	44
5.4 La seva estratègia replicativa	45
5.5 Característiques antigèniques	46
5.6 Immunitat i patogènesis	47
5.7 Epidemiologia	48

5.8 Clínica	49
6. Vies de transmissió	50
7. Prevenció i control	54
8. Control de la contaminació vírica	56
8.1 Inactivació vírica	57
8.1.1 Inactivació per clor	59
8.1.2 Inactivació tèrmica	62
8.2 La importància d'estandarditzar els processos de detecció: ISO	63
8.3 La gran avantatja de les RTqPCR múltiplex	63
8.4 El repte de la viabilitat	64
OBJECTIUS	70
INFORME DELS ARTICLES	73
PUBLICACIONS	80
DISCUSSIÓ	92
CONCLUSIONS	109
BIBLIOGRAFIA	114

ABREVIATURES I GLOSSARI

5'NCR	Regió no codificant 5' (<i>5' non coding region</i>)
3'NCR	Regió no codificant 3' (<i>3' non coding region</i>)
°C	Graus centígrads
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementari
CEN	Centre Europeu de Normalització
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dsDNA	Àcid desoxiribonucleic de doble cadena (<i>double-stranded DNA</i>)
dsRNA	Àcid ribonucleic de doble cadena (<i>double-stranded RNA</i>)
eHAV	Virus de l'hepatitis A en la seva forma embolcallada
ECDC	<i>European Center for Disease Control</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMA	European Medicines Agency
GI	Genogrup I
GII	Genogrup II
GEA	Gastroenteritis aguda
HAV	Virus de l'hepatitis A
HBGA	Antígens de grup sanguini (<i>Histoblood Group Antigens</i>)
HBV	Virus de l'hepatitis B
HCV	Virus de l'hepatitis C
HDV	Virus de l'hepatitis D
HEV	Virus de l'hepatitis E
HIEs	Enteroids intestinals humans (<i>Human intestinal enteroids</i>)

HuNoV	Norovirus humans
ID50	Dosi infecciosa 50
IEM	Microscòpia immuno electrònica (<i>Immune electron microscopy</i>)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Kb	Kilobase
MPN	Nombre Més Probable
MSM	Homes que tenen sexe amb homes (<i>Men who have sex with men</i>)
nM	Nanòmetres
NGS	Tècniques de seqüenciació massiva (<i>Next-generation sequencing</i>)
NoV	Norovirus
OMS	Organització Mundial de la Salut
ORF	Pauta oberta de lectura (<i>Open reading frame</i>)
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PMA	Monoazida de Propidi (Propidium monoazide)
qPCR	PCR quantitativa
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RdRp	RNA polimerasa RNA dependent
RHDV	Virus de la malaltia hemorràgica dels conills (<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i>)
RNA	Àcid ribonucleic
RT	Retrotranscripció
SNC	Sistema nerviós central
SV	Sapovirus
ssRNA	Àcid ribonucleic de cadena senzilla (<i>single-stranded RNA</i>)

TCID ₅₀	Dosi infecciosa 50 en cultiu cel·lular (Tissue culture infectious dose 50)
VLPs	<i>Virus Like Particles</i>

INTRODUCCIÓ

1. ELS VIRUS ENTÈRICS

El terme de virus entèrics defineix qualsevol virus de transmissió fecal-oral que infecta principalment el tracte gastrointestinal (Figura 1). Es diferencien pel que fa a la seva estructura, composició, àcid nucleic i morfologia, però solen tenir càpsides robustes que els permeten sobreviure a condicions desfavorables a l'entorn, a més de permetre el pas a través de les condicions àcides i proteolítiques de l'estómac durant el seu camí cap a la intestí, on en la majoria dels casos entra al cos infectant cèl·lules epitelials susceptibles. La majoria dels virus entèrics tenen el seu genoma format per àcid ribonucleic (RNA), sent una excepció els Adenovirus (Taula 1). Els virus amb RNA són els més abundants en la biosfera i estan associats a un gran nombre de malalties, tant en humans, com en animals i plantes. A més, evolucionen com a distribucions complexes de variants diferents però estretament relacionades genèticament, que es denominen quasiespècies víriques, on no existeix un genoma definit de manera precisa sinó un genoma consens establert mitjançant la mitjana de les diferents variants (1). La dinàmica de quasiespècies és important per entendre l'adaptabilitat dels virus entèrics, així com el disseny d'estratègies de prevenció i el control de la seva transmissió.

Els virus entèrics causen arreu del món en els essers humans majoritàriament gastroenteritis i hepatitis agudes, així com també algunes patologies que afecten altres teixits, com per exemple el tracte respiratori o el sistema nerviós central (Taula 1). Actualment, de tots els virus entèrics que infecten humans, els Norovirus (HuNoV), i els virus de l'hepatitis A (HAV)

i el virus de l'Hepatitis E (HEV) són els més rellevants en salut pública i seguretat alimentària (2).

El terme "gastroenteritis" fa referència a qualsevol procés inflamatori del tracte intestinal tot i que sovint s'utilitza per a descriure quadres clínics de diarrea aguda, acompanyada sovint de vòmits, nàusees i dolor abdominal. Hi ha dos tipus de gastroenteritis: invasiva i no-invasiva. Les bacteries solen ser les causants dels casos més greus de gastroenteritis invasiva però molts virus, en especial els HuNoV i els rotavirus són els agents causants d'un elevat nombre de casos. Segons la Organització Mundial de la Salut (OMS), les malalties diarreiques són la segona causa de mortalitat en infants d'arreu del món, generalment causades pel consum d'aigua i aliments contaminats (3). Tot i que són malalties que es poden prevenir i curar, es situen tant sols per sota de la pneumònia, i passant per davant de malalties com la malària. Les altres causes principals de mort en nens menors de 5 anys són complicacions en parts prematurs i asfixia durant el part. Actualment més de 2000 milions de persones no tenen accés a l'aigua potable i 4200 milions no gaudeixen d'un sistema de sanejament segur. En els països amb pocs recursos econòmics els nens i nenes poden patir de mitja tres episodis de diarrea a l'any. Cada un d'aquests episodis contribueix a la manca d'absorció de nutrients, i per tant, pot comportar malnutrició, iniciant-se un cercle de malaltia i vulnerabilitat difícil de trencar. Aquest fet, a part de posar en risc la vida de milions de persones també contribueix a l'empobriment dels països per l'absentisme escolar i laboral que comporta. Apart de HuNoV i rotavirus, altres virus com els astrovirus, els adenovirus i els sapovirus

s'inclouen entre els més freqüentment associats a gastroenteritis agudes (4), essent els astrovirus humans (HAstVs) uns dels menys estudiats fins ara.

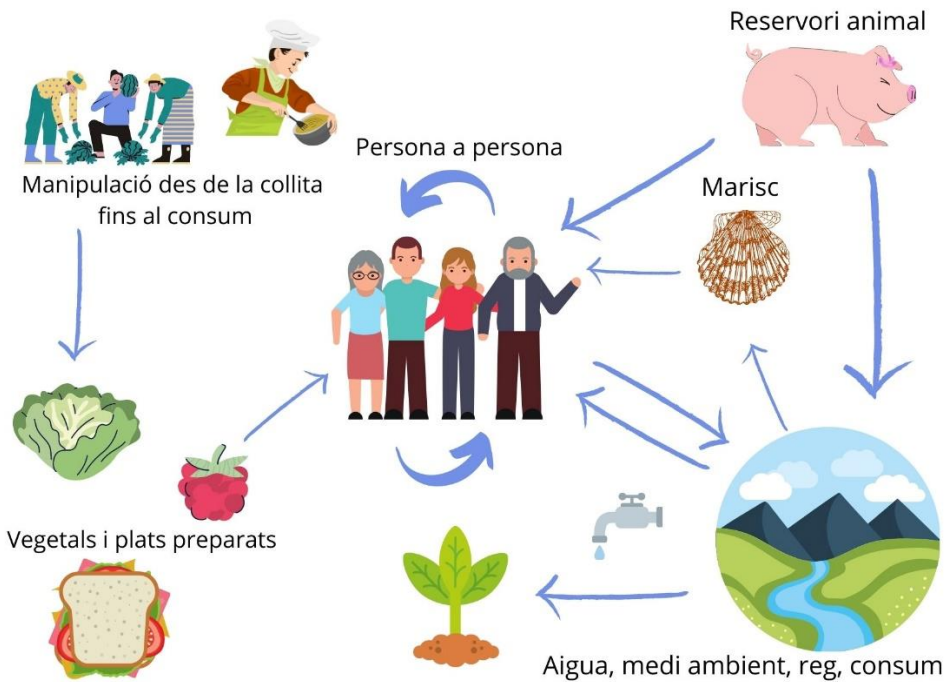


Figura 1. Vies de transmissió dels virus entèrics.

Els HAstVs van ser descoberts l'any 1975 en unes mostres de femtes d'infants amb diarrea (5) que van rebre el nom pel seu aspecte quan se'ls observa al microscopi electrònic. Són virus RNA petits, no embolcallats, de cadena senzilla positiva que pertanyen a la família *Astroviridae*. La seva distribució és mundial i la prevalença entre nens i nenes amb gastroenteritis, en estudis emprant el mètode de detecció de PCR en temps real (RT-PCR), és aproximadament un 5% (oscil·la entre 0 i 20%). La Xina o l'Amèrica del Sud encara tenen taxes de positivitat elevada tot i la tendència

a la baixa a nivell mundial (6). L'any 2008 es van identificar dos grups d'astrovirus nous que poden infectar també humans i s'ha suggerit que podrien ser també agents causants de gastroenteritis, tot i que també s'han detectat en infeccions asimptomàtiques.

Els Sapovirus (SV) es van identificar per primera vegada l'any 1977 en un brot de diarrea en un orfenat de Sapporo, Japó,(7) i des de llavors, 15 genotips en quatre genogrups (GI.1 a GI.8, GII.1 a GII.5, GIV i GV) s'han descrit com SVs humans. Els SV han estat detectats en mostres fecals, tant en individus simptomàtics com asimptomàtics, així com en aigua i bivalves, indicant que els SV es poden transmetre per la via fecal-oral a través de l'aigua i dels aliments contaminats, així com a través del contacte de persona a persona (8)(9).

Els SV causen un quadre de gastroenteritis aguda en humans de totes les edats. Els darrers anys s'ha descrit una prevalença creixent de SV en infeccions, destacant el seu paper com a malaltia emergent (10)(11)(12)(13). En general, la gravetat de les gastroenteritis causades per SV és més lleu que no pas les causades per NoV i els símptomes són autolimitats tot i que en individus immunocompromesos, infants o gent gran la gastroenteritis aguda pot conduir a l'hospitalització (12)(14)(15).

Els Rotavirus, són els principals patògens relacionats amb gastroenteritis agudes i esporàdiques en infants, seguits dels HuNoV i els HAstV. Tot i que, amb la implementació de la vacunació s'ha disminuït la seva incidència als països afectats (16).

Apart de gastroenteritis aguda, els virus entèrics també són importants causes d'hepatitis. Cinc virus són responsables de la majoria dels casos d'hepatitis vírica, que és una inflamació del fetge a causa de la infecció. Aquests són el virus de l'hepatitis A (HAV), el virus de l'hepatitis B (HBV), el virus de l'hepatitis C (VHC), virus de l'hepatitis D (HDV) i virus de l'hepatitis E (HEV). De tots ells, l'HAV i l'HEV són entèrics i es transmeten per via fecal oral.

L'hepatitis A segueix sent la causa més freqüent d'hepatitis aguda a tot el món, però la seva incidència varia segons la ubicació geogràfica. Segons les estimacions de l'OMS per al 2010, el VHA va causar 14 milions de casos d'hepatitis aguda, 1,4 milions de DALY i 28.000 morts (17). La infecció per hepatitis A és altament endèmica als països emergents, mentre que és molt menys freqüent als països industrialitzats. Aquest patró epidemiològic té importants implicacions en l'edat mitjana d'exposició i en la gravetat de la malaltia clínica. La infecció és majoritàriament asimptomàtica en nens i nenes menors de sis anys, mentre que la gravetat augmenta després, sent la malaltia molt greu en els majors de seixanta anys. El virus de l'hepatitis E va ser descobert l'any 1978 en un brot d'hepatitis en l'aigua a la Índia, i actualment és el responsable de 20 milions d'infeccions l'any i tot apunta a que serà en un futur una malaltia emergent (18).

L'HEV pertany a la família *Hepeviridae*, és un virus, descrit inicialment com no embolcallat, amb un genoma format per RNA de cadena senzilla i polaritat positiva. Se n'han descrit 4 genotips que infecten humans (19). Al igual que l'HAV, l'HEV es presenta també amb dos morfologies, no

embolcallada i embolcallada, depenent del tipus de mostra biològica on es troba (20).

L'HEV es transmet majoritàriament per la ruta fecal-oral a través d'aigua contaminada. Tot i això, estudis recents, demostren que varies espècies d'animals tenen anticossos per a HEV i alguns casos documentats en humans han estat associats al consum de carn crua o poc cuinada, o de vísceres de senglars i cérvols (21)(22). En aquests casos el genotip 3, i en menor mesura el genotip 4, hi estan involucrats. Aquestes evidències confirmen que l'hepatitis E és una malaltia zoonòtica.

Des del 2012, vuit països de la UE han implementat el cribratge HEV. Les taxes locals de seroprevalença, incidència d'RNA i epidemiologia molecular són variables i no solen ser directament comparables. El ventall de taxes de reactivitat de l'HEV-RNA és des d'1 de cada 744 donacions a França fins a 1 de cada 8.636 donacions a Gal·les amb una taxa global de la UE d'1 de cada 3.109 donacions, d'un total de 3,2 milions de donacions seleccionades (23). Els principals grups de risc per a la infecció per HEV i posteriors complicacions són les persones grans, les dones embarassades, els infants, les persones immunocompromeses o amb malalties hepàtiques preexistents i els treballadors que entren en contacte directe amb animals infectats amb HEV. Mentre que l'HEV provoca principalment infeccions agudes autolimitants, pot evolucionar en hepatitis fulminant en dones embarassades o en pacients amb antecedents clínics al fetge. La taxa de mortalitat és aproximadament del 2%; no obstant això, pot sobrepassar el 20% en dones embarassades (18).

En un principi l'hepatitis E era considerada una malaltia que afectava a les persones que viuen en els països emergents o persones que viatjaven a aquests països, però actualment s'ha vist que la seroprevalença d'HEV en alguns països europeus és superior al 50%. Informes recents de l'OMS han identificat els "hot spots" d'HEV a França, els Països Baixos, Escòcia, Alemanya, República Txeca, Polònia i Itàlia (24). Actualment s'ha desenvolupat una vacuna, HEV 239, per prevenir la infecció pel virus que té llicència a la Xina, però encara no està disponible en cap altre lloc. La vacuna que es considera prometedora i ha demostrat un alt grau d'eficàcia en individus sans de 16 a 65 anys a la Xina (25).

Taula 1: Els virus documentats que es troben al tracte gastrointestinal humà¹

Gènere	Genoma	Nom	Malaltia causada
Enterovirus	ssRNA	Poliovirus	Paràlisi, meningitis, febre
		Coxsackie A, B virus	Herpangina, meningitis, febre, malalties respiratòries, febre aftosa, miocarditis, anomalies cardíques, pressa, pleurodínia, diabetis *
		Echovirus	Meningitis, febre, malalties respiratòries, erupcions cutànies, gastroenteritis
Hepatovirus	ssRNA	Hepatitis A virus	Hepatitis
Kobuvirus	ssRNA	Aichi virus	Gastroenteritis
Parechovirus	ssRNA	Human parechovirus	Malaltia respiratòria, gastroenteritis, infecció del Sistema nerviós central (SNC)
Norovirus	ssRNA	Human norovirus	Gastroenteritis
Sapovirus	ssRNA	Human sapovirus	Gastroenteritis
Hepevirus	ssRNA	Hepatitis E virus	Hepatitis
Mamastrovirus	ssRNA	Human astrovirus	Gastroenteritis, infecció del SNC
Coronavirus	ssRNA	Human coronavirus	Gastroenteritis, malaltia respiratòria, pneumònia, COVID-19, MERS
Henipavirus	ssRNA	Nipah virus, Hendra virus	Encefalitis, malaltia respiratòria
Parvovirus	ssDNA	Human parvovirus	Gastroenteritis
Alphatorquevirus	ssDNA	TT (Torque Teno) virus	Desconeguda, hepatitis *, malaltia respiratòria * hematològica, trastorns *, càncer *
Orthoreovirus	dsRNA segmentat	Human reovirus	Desconeguda
Rotavirus	dsRNA segmentat	Human rotavirus	Gastroenteritis

Orthomyxovirus	dsRNA segmentat	Avian influenza virus	Grip, malaltia respiratòria
Mastadenovirus	dsDNA	Human adenovirus	Gastroenteritis, malalties respiratòries, conjuntivitis
Polyomavirus	dsDNA	Polyomavirus	Leucoencefalopatia multifocal progressiva, malalties del tracte urinari

* no se sap del cert si la malaltia és causada pel virus.

¹ Qualsevol virus del tracte gastrointestinal es podria transmetre per via alimentària.

Taula extreta de Bosch et al., International Journal of Food Microbiology 285 (2018) 110–128 (24)

2. DIAGNÒSTIC

La detecció dels virus entèrics en tant en mostres clíniques com mostres ambientals es pot dur a terme mitjançant PCR i RT-PCR (convencional, a temps real o digital), immunoassajos i microscòpia electrònica i cultiu cel·lular, no en tots els casos.

De tots ells, el cultiu cel·lular és l'únic que permet avaluar infectivitat tot i que no està disponible per a tots els virus entèrics que més preocupen, mentre que els mètodes basats en PCR són els més sensibles i de vegades permeten el genotipat.

Els mètodes d'immunoassaig, com per exemple l'**ELISA** (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), es basen en l'ús d'antígens o anticossos marcats amb un enzim. El compost que estigui marcat amb l'enzim serà immobilitzat a la placa, i mitjançant l'addició d'un substrat específic produirà color en reaccionar amb l'enzim. Aquest color es veurà a simple vista i podrà ser quantificat mitjançant un espectrofotòmetre o un colorímetre.

La **microscòpia electrònica**, és un altre mètode que pot ser emprat per a la detecció de virus entèrics, , però no és gaire pràctic degut a que no presenta una sensibilitat molt elevada, l'equip té un cost econòmic elevat i requereix que el personal que l'utilitzi tingui una formació especialitzada.

Tots els mètodes moleculars basats en la detecció d'àcids nucleics impliquen una purificació i extracció dels virus de la mostra a analitzar per retirar tota la matèria orgànica possible, una extracció dels àcids nucleics normalment mitjançant kits comercials que permeten el lisat de les càpsides, i l'amplificació final d'aquest material genètic purificat (Figura 2). Existeixen nombroses opcions per amplificar, detectar i fins i tot també caracteritzar per seqüenciació els àcids nucleic dels virus diana, incloent per exemple la PCR i RT-PCR quantitativa a temps real (real time qPCR and RTqPCR) ja sigui en format monoplex o múltiplex i la PCR i RT-PCR digital.

En la **PCR i RT-PCR quantitativa a temps real** (*real time* qPCR i RTqPCR) a l'aplicació informàtica podem veure si s'amplifica el fragment de genoma que hem marcat com a diana i en quina quantitat segons la Ct (*cycle threshold*) en la que es comenci a manifestar. A Ct més baixes hi haurà més títol de partícules víriques i a Ct més altes hi haurà menys, la sensibilitat de la màquina anirà disminuint a mesura que hi hagi un número menor de genomes en la mostra. La quantificació es durà a terme mitjançant comparació amb un estàndard amb quantitat genòmica coneguda.

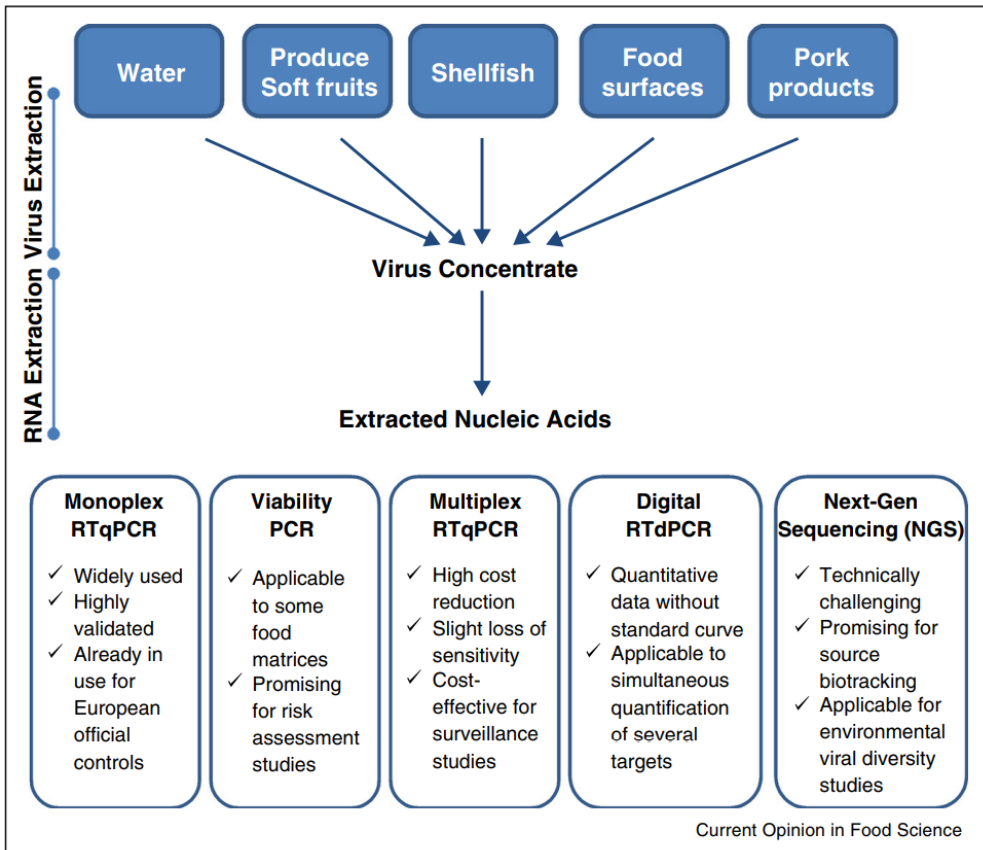


Figura 2. Diagrama de flux general de les opcions analítiques disponibles i en desenvolupament per a la detecció i caracterització de virus entèrics en aliments i aigua. La majoria de protocols impliquen dos passos per a la purificació del virus a partir d'aliments o aigua. El primer pas extreu i / o concentra virus de mostres d'aliments o d'aigua i el segon pas purifica i concentra els genomes virals. Es resumeixen diversos enfocaments moleculars que permeten la detecció, quantificació i / o caracterització de virus, així com els trets més destacats de cada enfocament metodològic. Extreta de Bosch et al., Foodborne viruses. Curr Opin Food Sci. 2016; 8:110–9. (26)

Els mètodes moleculars tenen l'avantatge de poder detectar baixes concentracions de virus presents en aliments contaminats. A més, el baix nombre de partícules pot no estar distribuït uniformement i alguns dels components de la matriu alimentària poden ser inhibidors potents de assajos moleculars (26).

Una de les principals dificultats en l'ús de mètodes moleculars en l'àmbit de la seguretat alimentària és que no discerneixen entre virus infecciosos i no infecciosos. La proporció de virus inactivats en mostres d'aliments i aigua pot variar depenent del temps que hagin persistit aquests virus l'entorn i / o a les mostres. Els àcids nucleics vírics (intactes o fragmentats) poden suportar alguns dels tractaments d'inactivació aplicats a l'indústria alimentària, la manca de correlació entre el genoma les còpies i els títols infecciosos també dificulten la valoració de l'eficàcia dels procediments d'inactivació (27).

3. ELS SECRETS MILLOR GUARDATS

Les tècniques de detecció de virus en mostres desinfectades sempre han estat acompanyades de la incògnita de quins són els mecanismes implicats en la inactivació del virus. Sovint mitjançant mètodes moleculars podem saber quina és la regió del genoma que ha estat afectada per l'agent desinfectant però no obtenim informació de perquè unes regions són més susceptibles que d'altres a ser malmeses. Un coneixement més profund del virus a nivell de composició, estructura i funció biològica ens ajudaria a millorar la nostra comprensió d'aquests mecanismes, així com a predir la susceptibilitat del virus al agent desinfectant i a la identificació de les regions més vulnerables (28).

La estructura terciària del virus determinaria que algunes regions estiguessin més exposades i fossin més susceptibles a ser malmeses per l'agent desinfectant, altres en canvi quedarien més protegides i podrien romandre inalterades més temps. Dianes dissenyades en aquests fragments podrien donar falsos positius en la detecció de virus per mètodes moleculars.

4. VIRUS DE L'HEPATITIS A

El virus de l'hepatitis A és el principal causant de hepatitis aguda del món. HAV es transmet principalment a través de exposició a aliments o aigües contaminades, o a través de l'exposició a persones infectades. L'OMS estima que a tot el món, l'HAV va causar aproximadament 7134 morts el 2016 (que representen el 0,5% de la mortalitat de l'hepatitis viral) tot i que hi ha disponibles vacunes segures i eficaces.

La infecció per HAV és altament endèmica en països emergents on les condicions sanitàries no són les òptimes i on els infants hi entren en contacte a edats primerenques obtenint immunitat de per vida.

La infecció és normalment asimptomàtica en nens i nenes menors de 6 anys no obstant, la severitat augmenta en persones més grans de 60 anys. En països no-endèmics el contacte amb el virus es dona majoritàriament en l'etapa adulta, normalment pel consum d'aigua o aliments contaminats, viatges a regions endèmiques o per tenir pràctiques sexuals no segures, això fa que la malaltia cursi de manera simptomàtica i més severa.

4.1 Història

El Talmud descriu la icterícia com un signe d'odi sense causa. També se'n troben referències anteriors al papir d'Ebers, redactat a l'antic Egipte als voltants del 1500 a.C, i als escrits antics sobre medicina índia ayurvedica (29).

Hipòcrates (460-375 aC) va ser el primer metge en descriure una malaltia que presentava episodis d'icterícia molt semblants al que podria ser una hepatitis viral a la seva obra *De Morbus Internis*.

Durant molt de temps, l'hepatitis, va ser reconeguda com una malaltia infecciosa associada a les guerres. Grans epidèmies esdevenien en els principals conflictes des de la guerra civil americana, la batalla de Gallipoli, durant la primera guerra mundial i al llarg de la segona guerra mundial on s'estima que uns 5 milions d'alemanys la van patir.

L'any 1855 el doctor Bamberger inferí de les seves observacions que la causa de l'hepatitis era una inflamació del conducte biliar. L'any 1865 el metge Rudolf Ludwig, considerat el pare de la patologia cel·lular, es sumà a aquesta opinió en descriure en el seu article "Sobre l'aparició i detecció d'hepatogens, especialment la icterícia catarral" un cas d'un pacient que patia icterícia epidèmica, en la qual el conducte biliar es trobava inflammat i obturat en l'extrem inferior degut a una substància mucosa. Aquest quadre va donar lloc al terme icterícia catarral i va fer més mal que bé, en retardar l'enteniment de la malaltia (30).

Però tot i que molts metges van donar per vàlida aquesta teoria, diversos científics coetanis van suggerir que la icterícia epidèmica i esporàdica tenia

una etiologia comuna, que la causa de les dues malalties era la inflamació aguda del fetge i que eren causades per un agent infecciós.

L'any 1885 el doctor Lürman va ser testimoni d'un brot "de icterícia catarral" en centenars de treballadors d'una drassana a Bremen. I aquell mateix any, el metge Jehn va informar d'un brot molt similar en persones internes d'un centre psiquiàtric, també a Alemanya. Tots dos grups havien estat recentment vacunats contra la verola. Tot i que Lürman va voler ser molt prudent en les seves declaracions, tot apuntava com a possible causa dels brots la vacuna preparada amb limfa humana glicerificada. Després d'aquells fets, episodis d'icterícia van anar apareixent, especialment en pacients tractats amb l'antisifilic Salvarsan i en pacients amb diabetis insulodepenents, però es continuava pensant que els causants eren coadjuvants o la pròpia insulina.

Així doncs l'any 1908, S. McDonald postula, per primer cop, al seu article "Acute yellow atrophy" que en la icterícia també hi podria estar implicada un virus (31). L'any 1912, l'any de la primera guerra balcànica i de l'enfonsament del Titànic, el metge anglès Edward Alfred Cockayne va publicar una revisió en què suggeria que les formes esporàdiques i epidèmiques d'icterícia eren probablement manifestacions de la mateixa malaltia. Tot i que Blumer es va fer ressò d'aquest punt de vista, no va tenir gaire repercussió dintre de la comunitat mèdica.

El 1922, el metge austríac Hans Eppinger, prominent especialista del fetge tot i estar relacionat amb experiments en presoners del camp de concentració de Dachau, va afirmar que la lesió primària no era l'obstrucció, sinó la necrosi hepatocel·lular, una visió que va rebre el suport de patòlegs

de Gran Bretanya, Escandinàvia i els Estats Units. Tot i que Eppinger apuntava com a causa més probable una toxina hepàtica, els seus coetanis van proposar que la malaltia era infecciosa, una visió que va obtenir suport quan el doctor Ryokichi Inada i els seus col·legues van publicar l'article "The etiology, mode of infection, and specific therapy of well's disease (spirochetosis icteroh/emorragica)" demostrant que alguns brots d'icterícia al Japó es devien a una infecció pel bacteri *Leptospira*. Si bé és cert que es van aïllar una sèrie de bacteris entèrics de les femtes de pacients amb "icterícia catarral", no es va implicar cap soca en particular, i va ser llavors quan les hipòtesis tornaven a rondar al voltant del que ja havia descrit en S. McDonald, l'any 1908 (32).

L'any 1926 el doctor Alfred Flaum va detectar el que es va anomenar "Schnepper Ikterus" o icterícia Schnepper a una clínica per a persones amb diabetis a Suècia on els pacients anaven a mesurar-se el sucre, que en aquella època, es feia a través d'una mostra de sang extreta mitjançant una punxada al lòbul de l'orella. Flaum i el seu equip es van adonar que aquella agulla tant sols es netejava de tant en quant i va concloure que l'epidèmia d'icterícia va ser causada per una infecció vírica transmesa de pacient a pacient per l'agulla contaminada.

Gradualment es van anar aportant proves sobre la transmissió parenteral d'hepatitis sèrica per agulles contaminades amb sang o mitjançant l'administració de vacunes d'origen humà o de productes sanguinis (32).

El 1931, Findlay, Dunlop i Brown publicaven un article titulat "Observacions sobre epidèmia de icterícia catarral" a la Reial Societat de Medicina Tropical i Higiene (33) Findlay va estudiar la història de l'hepatitis epidèmica i un brot

que es va donar a Surrey, Anglaterra, on va arribar a la conclusió que es tractava d'un "virus ultra-microscòpic patogènic només per a l'esser humà".

H. C. Brown, co-autor de l'article "Observacions sobre epidèmia de icterícia catarral" es va infectar durant la manipulació de sèrums, procedents d'un brot d'hepatitis a Yorkshire, Anglaterra, i va desenvolupar els símptomes d'una hepatitis epidèmica. La convalescència es va allargar fins a 5 setmanes després de la manipulació dels sèrums. Aquest és, potser, el primer cas documentat d'un període d'incubació d'hepatitis A i potser també de la seva transmissió a través de sèrum.

L'any 1939 esclata la segona guerra mundial i la infecció per hepatitis es converteix en un problema creixent entre víctimes de la guerra que necessiten transfusions de sang. Això va dur a fer grans avenços sobre l'estudi d'aquesta malaltia a les etapes finals de la guerra, especialment als Estats Units i Anglaterra.

L'any 1942, 28.585 soldats americans que havien rebut la vacuna de la febre groga van patir hepatitis infecciosa, 62 dels quals van morir (18). Aquest fet va arribar a oïdes del gabinet britànic que va decidir cancel·lar la vacunació que el primer ministre Winston Churchill tenia programada abans de la seva trobada amb Stalin per informar-li dels plans britànics d'atacar a Alemanya a l'Àfrica enlloc d'obrir un segon front en Europa (32).

A finals de la Segona Guerra Mundial ja s'estaven fent estudis amb persones voluntàries que eren infectades d'hepatitis en condicions controlades i van sorgir articles de referència com els publicats a The Lancet (34) i a l'American Journal of the Medical Sciences (35). Per primer cop es parlava de dues

formes d'hepatitis, una de més aguda que causava epidèmies, hepatitis A, amb un temps d'incubació de entre 15 i 43 dies i autolimitada, l'altra forma era més perllongada relacionada amb el sèrum, l'hepatitis B, amb mesos d'incubació i amb un curs més llarg i sovint crònic.

En aquests moments també es va descobrir que l'hepatitis A infecciosa sol transmetre's per excrements humans infectats per virus que contaminen l'aigua o els aliments, mentre que l'hepatitis B semblava ser transferida per exposició directa a sang o productes sanguinis que contenen virus o a través de contacte corporal íntim. Un filtrat de material fecal obtingut dels pacients amb hepatitis A va resultar ser infectant, confirmant per fi que l'agent patògen era una partícula vírica, com ja ho havia esmentat McDonald gairebé 40 anys abans (32).

Entre els anys 50 i 60 es va fer un gran esforç per a trobar un model animal que pogués replicar HAV. No va ser una tasca senzilla, a més de les complicacions per l'obtenció d'inòcul amb infectivitat coneguda, també s'hi sumaven la manca de tests diagnòstics per HAV i la baixa sensibilitat de les tècniques per a inferir el dany hepatocel·lular. Primerament els estudis es van centrar en animals que es sabia que es contagiaven de la seva pròpia soca d'hepatitis amb l'esperança que també es poguessin infectar amb les soques humanes d'HAV, però en no donar fruits, les investigacions es van centrar en primats no humans, i cap a finals dels anys 60 es va aconseguir infectar a ximpanzés i titís.

L'any 1973 l'HAV va ser descrit per primer cop. El viròleg Stephen Feinstone, Robert Purcell i Albert Kapikian, van detectar per microscòpia electrònica les

partícules en femtes d'individus que havien estat infectats experimentalment amb HAV.

El microbiòleg Philip J. Provost va ser pioner en la caracterització de l'agent víric de l'hepatitis humana de tipus A, en la realització del primer cultiu de laboratori d'aquest virus i en el desenvolupament de prototips de vacunes tant contra l'hepatitis A com contra la varicel·la (32).

Posteriorment, Maurice R. Hilleman també va contribuir al desenvolupament de la vacuna. Hilleman era conegut com el "vacunòleg més exitós de la història" que hauria salvat més vides durant el segle XX que qualsevol altre científic.

Actualment els principals agents causants d'hepatitis vírica són els virus de l'hepatitis A, B, C, D i E. El tipus "infecció" s'associa avui en dia a les hepatitis que es contagien per via fecal-oral i la "sèrica" a la que es transmet per via parenteral. Dels 5 tipus de virus de l'hepatitis només dos es transmeten a través d'aliments i aigua: l'hepatitis A i l'hepatitis E (36).

L'HAV és de la família *Picornaviridae*. És un virus petit, en principi no embolcallat, amb una cadena senzilla de RNA. Dintre d'aquesta família també s'hi troben altres patògens humans com els el Enterovirus que inclouen poliovirus, coxsackievirus, echovirus, rinovirus i. Tot i que l'HAV comparteix les característiques principals de la seva família, és un virus prou diferent com per a ser classificat en un gènere apart: *Hepatovirus*.

D'*Hepatovirus* hi ha descrites fins a 9 espècies diferents (A-I) detectades en diferents hostes com els humans, foques, rosegadors, ratpenats, eriçons i musaranyes.

L'any 2015, es va descriure un gènere de picornavirus desconegut fins ara en foques, que ha estat anomenat *Phopivirus*, i que està relacionat amb el virus de l'hepatitis A humana (HAV). A més, comparteixen diverses característiques genètiques i fenotípiques, inclosa la relació filogenètica a través del genoma, un tropisme específic i aparentment en repòs per a hepatòcits, conservació estructural en una regió funcional clau del lloc d'entrada ribosòmica interna de tipus III (IRES) i un biaix en l'ús de codons (37).

Un estudi més general, va identificar múltiples *Hepatovirus* molt diversificats en nombrosos tàxons de petits mamífers, ampliant més enllà dels primats els possibles hostes que es coneixien per a aquest gènere. És probable que l'èxit del manteniment i evolució de l'*Hepatovirus* sigui degut a la inusualment àmplia gamma d'hostes que té al seu abast i a la seva plasticitat genètica. Drexler i col·laboradors també van observar conservació antigènica entre l'HAV i un hepatovirus aïllat de rat-penats, suggerint que aquests virus pertanyen a un mateix serotip i que si s'introduís en la població humana, seria d'esperar que estiguéssim protegits per la immunitat de ramat i la resposta immunitària induïda per la vacuna (38). No obstant, això no podria aplicar-se a totes les noves espècies d'*Hepatovirus* que han identificat, alguns dels quals contenen diferents serotips. Els autors remarquen la importància d'anar més enllà dels criteris filogenètics quan es realitzen avaluacions de risc de virus RNA emergents i la necessitat de incloure anàlisis funcionals, ecològics i patològics de reservoris animals (38).

Posteriorment el grup d'Oliveira Carneiro detectava un nou HAV en marsupials (MHAV), concretament en l'opòssum orellut (*Didelphis aurita*).

La concentració de MHAV al fetge de l'animal era alta, suggerint hepatotropisme. Els avantpassats llunyans dels opòssums moderns es van separar dels ancestres distants dels mamífers placentaris actuals fa uns 160 milions d'anys, durant el període juràssic tardà (quan gairebé tots els mamífers eren la mida dels ratolins), i el primer veritable marsupial va aparèixer durant el Cretaci primerenc, uns 35 milions d'anys després. Per aquest motiu, les troballes fetes en marsupials poden proporcionar una visió important de l'evolució del virus (39).

Una particularitat que té l'HAV i que comparteix amb l'HEV, és que pot presentar-se com a forma pseudo o quasi embolcallada (anomenada eHAV) i nua (o no embolcallada).

L'embolcallament que presenten aquests virus difereix de l'habitual al no tenir glicoproteïnes virals a la seva superfície, no obstant, en el cas d'HAV té una proteïna interna, anomenada VP1pX que es manifesta en la càpsida, però no es troba present en la forma nua dels virions, i que sembla ser que impulsa l'ensamblatge de la càpsida (40).

La replicació del virus dintre de vesícules citoplasmàtiques és lenta i no atura la síntesi proteica cel·lular o shutoff, perquè el virus requereix el factor d'iniciació de la traducció cel·lular eIF4G intacte (41).

En estudis fets amb cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular, s'ha vist com es recuperaven dos tipus diferents de virions, uns de més densos i uns de menys. Les partícules més denses tenien la típica aparença de les càpsides nues, mentre que les més lleugeres eren vesícules més petites de membrana única que contenien entre una i quatre càpsides. Malgrat l'embolcall, les

partícules més lleugeres tenien una infectivitat específica similar als virions nus. No obstant, eHAV només es troba en sèrum i plasma d'humans infectats mentre que en les femtes només s'hi detecten les formes nues. Aquesta combinació de formes sembla ser que es deuria a la via de sortida del virió, si aquest surt per al membrana basolateral de l'hepatòcit arribarà a plasma i sang recobert per un embolcall, però si ho fa a través de la membrana apical, i per tant cap al canalicle biliar, sembla ser que no tindrà embolcall o bé que el perdrà al poc temps (40). Com que els títols virals solen ser unes 100 vegades més gran en femtes que en sang, s'estima que la majoria de virus abandonen l'hepatòcit per la membrana apical.

El fet de tenir embolcall o no, dona certes característiques als virus com per exemple el fet d'estar protegits per la bicapa lipídica i romandre camuflats front els anticossos neutralitzants, però la característica més important és la de facilitar la sortida del genoma fora de la cèl·lula emprant el complex ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), un cop perdut l'embolcall el virus continua sent infectiu en la seva forma nua. Estudis recents demostren com HAV i HEV es beneficien del millor d'aquestes dos formes (42).

4.2 Descobrint-lo a nivell molecular

La variabilitat genètica en els virus RNA és principalment conseqüència de tres mecanismes universals com la mutació, la recombinació i reordenació de fragments genètics que es donen a l'hora que els virus tenen elevades taxes de replicació. Com s'ha esmentat abans, en els virus RNA això condueix a l'aparició del que anomenem quasi-espècies d'un mateix virus, aquelles

distribucions dinàmiques de genomes virals que no són idèntiques però sí que es troben properes genèticament entre elles que infecten un mateix individu (36).

A nivell genòmic, l'HAV és molt similar als altres picornavirus. Conté un RNA de cadena senzilla amb polaritat positiva de 7.5 kb de llargària amb una regió 5' no codificant (NCR) de 734-740 nucleòtids, una regió codificant de 2225-2227 aminoàcids i una regió 3' no codificant d'uns 40-80 nucleòtids (43). En canvi el seu IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) és únic dintre de la família dels picornavirus i constitueix el model tipus III (44) (45). Aquest tipus de IRES mostra una eficiència molt baixa en la traducció en comparació amb altres picornavirus.

A més, l'HAV tan sols codifica per una proteasa, la 3C, mentre que altres picornavirus ho fan per a més d'una, que alhora estan involucrades en el *shutoff* cel·lular. Com que els picornavirus utilitzen un mecanisme de traducció que es CAP-independent i IRES-depenent, el *shutoff* podria ser avantatjós per als virus ja que permetria que la maquinària cel·lular s'utilitzés gairebé exclusivament per a la producció de proteïnes víriques. No obstant, el HAV necessita d'un factor d'inici de la traducció cel·lular, eIF4G, intacte i aquest s'escindeix a l'inici del *shutoff*, per tant, el fet de no fer *shutoff* seria avantatjós per al virus. Aquesta competició més ineficient amb la maquinària cel·lular li conferiria una estratègia de replicació única a l'HAV.

Una altra característica diferencial en aquest virus és l'ús de codons, que presenta un alt biaix en el seu ús (37). No tant sols utilitza més freqüentment codons rars sinó que a més aquest ús de codons ha evolucionat per a ser complementari al de la cèl·lula, el virus no utilitza de manera freqüent els

codons abundants per a la cèl·lula, i inclús de vegades els utilitza com a rars. Aquesta estratègia exclusiva de l'HAV sembla ser que té com a objectiu evitar competir amb els RNAt de la cèl·lula en una estratègia de replicació que no causa *shutoff* cel·lular que inhibeixi la síntesi de proteïnes cel·lulars, tal i com hem esmentat abans. Aquest ús dels codons rars pot ser la causa de la seva lenta replicació i del seu baix rendiment. Hi ha diversos estudis que apuntarien que aquest fre en la velocitat de traducció podria beneficiar al virus alhora de trobar l'RNAt adequat, present en baixes concentracions, en el pool general de RNAt, i això garantiria un plegament correcte de la proteïna (36).

4.3 El seu cicle biològic

A més dels humans, els ximpanzés (*Pan troglodytes*) i alguns petits primats no humans són susceptibles al HAV. Tot i que la infecció s'adquireix majoritàriament per ingesta del virus, la seva replicació es dona principalment als hepatòcits. A través del torrent sanguini, l'HAV entra a la membrana basolateral de l'hepatòcit. Les cèl·lules epitelials de l'intestí prim semblen ser el primer lloc on replica el virus (40).

En primats no humans que han estat infectats pel virus de manera experimental, s'ha vist com el virus arriba als intestins, provinent de fetge a través de la bilis, i s'acaba excretant en femtes. L'excreció és màxima durant les etapes posteriors del període d'incubació que dura de 3 a 4 setmanes, amb un pic màxim just abans de l'aparició de la lesió hepàtica (46) (47) i disminueix ràpidament amb l'aparició dels símptomes.

Tot i això, es pot detectar RNA viral a les femtes durant diverses setmanes i al fetge durant molts mesos després de la infecció aguda (47).

4.4 Proteïnes virals: estructurals i no estructurals

El genoma de l'HAV està dividit en 3 regions. La regió P1 codifica per les tres proteïnes principals de la càpsida viral, VP1, VP2 i VP3 (Figura 3). Una quarta proteïna de la càpsida viral (VP4), essencial per a la formació de virions, no es detecta en partícules virals madures.

Cadascuna de les proteïnes de la càpsida és escindida de la poliproteïna precursora per la proteasa viral 3C, codificada a la regió P3. La conformació nativa de les proteïnes càpsides VP1 i VP3 forma un únic epítot serològic dominant a la càpsida viral i provoca una resposta d'anticossos neutralitzants. Es preveu que les proteïnes no estructurals codificades a les regions P2 i P3 funcionaran en la síntesi d'RNA i la formació de virions. La VPg, també codificada a la regió P3, està lligada covalentment al terminal 5' genoma i participa en la iniciació de la síntesi d'RNA.

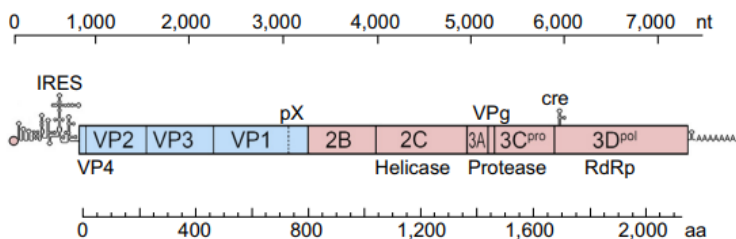


Figura 3 Organització del genoma d'HAV, de 7.5 kb. La ORF es troba flanquejada per l'extrem 5' i el 3'. El 5' està unit covalentment a una petita proteïna viral, VPg (o 3B). La proteïna d'inici de síntesi del RNA es troba a l'extrem 5' i conté l'IRES que

dirigeix la traducció. El 3' UTR finalitza amb una cua de poly(A). Imatge extreta de Lemon SM, et al. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. J Hepatol [Internet]. 2018;68(1):167–84.(40)

4.5 La seva estratègia replicativa

Hi ha evidències que el HAV replica exclusivament en els hepatòcits i en l'epiteli gastrointestinal, tot i que en condicions de laboratori pot també replicar en línies cel·lulars no hepàtiques.

Les proteïnes codificades pel virus repliquen el genoma RNA mitjançant la cadena negativa intermediària i es sintetitzen a partir del RNA de polaritat positiva. Els virions que es troben intactes contenen el genoma de RNA, la proteïna VPg i una càpsida formada per les proteïnes: VP1, VP2, VP3 i VP4 que li donen una simetria icosaèdrica. Les partícules virals són alliberades a la vesícula biliar a través de la membrana apical de l'hepatòcit i al torrent sanguini creuant la membrana baso-lateral d'aquest.

L'alliberament dels virus no va lligat a la destrucció cel·lular ja que es detecten elevats títols de virus en femtes molt abans de que hi hagi evidències de necrosis en els hepatòcits (48).

4.6 Característiques antigèniques

L'HAV té dues formes infectives, la nua i l'embolcallada (Figura 4). En la forma nua, és excretada en femtes per individus infectats. L'estructura antigènica de la càpsida es troba altament conservada i tots els hepatovirus humans formen un sol serotip (49). Aquesta conservació antigènica també

s'estén a la resta de nous virus identificats en rat-penats que comparteixen els epítops antigènics del HAV humà (38). La forma eHAV es secretada per les cèl·lules sense causar lisi. Aquests virions, que són detectats a la sang i en el sobrenedant dels cultius cel·lulars, contenen una càpsida que protegeix l'RNA i alhora està embolcallada per vesícules membranoses que no tenen cap proteïna viral en la seva superfície (40).

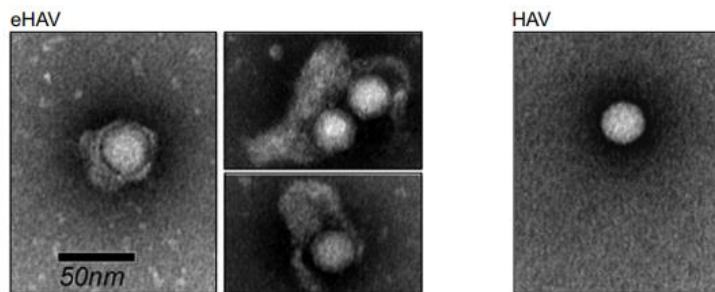


Figura 4. Micrografies electròniques de transmissió d'eHAV i de partícules nues detectades en el sobrenedant de cultius cel·lulars infectats. Imatge extreta de Lemon SM, et al. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(1):167–84.(40)

S'han descrit 6 genotips per a l'HAV, l'I, II i III són d'origen humà i el IV, V i VI contenen soques aïllades de simi. El genotip I és el més prevalent a nivell mundial, particularment el subgenotip IA que predomina al Nord, Centre i Sud-Amèrica, Xina, Japó, Tailàndia i Europa (50). El subgenotip IB predomina més a la regió mediterrània, Sud-Àfrica i Turquia. El subgenotip IIIA predomina en el continent asiàtic i poc comú a Europa i EEUU, tot i que últimament s'ha detectat un cert augment als països nòrdics europeus així com a Japó (51). La co-circulació de múltiples genotips o subgenotips s'ha

notificat a moltes parts del món (52). Dels subgenotips restants, el IIA, el IIB i el IIIB són menys prevalents.

4.7 Immunitat i patogènesis

Els humans són susceptibles a la infecció per HAV en qualsevol dels tres genotips (40). Els anticossos generats, induïts per la infecció natural i la vacunació, són capaços de produir una neutralització creuada, i estan dirigits contra les proteïnes de la càpsida (40). Gairebé totes les persones afectades d'HAV es recuperen completament i adquireixen immunitat de per vida. Aproximadament entre el 5% i el 10% dels casos aguts de VHA recauen, generalment són persones grans que no poden mantenir respostes immunes antivirals efectives (53). La recaiguda es caracteritza per un ressorgiment de la replicació del VHA i símptomes d'hepatitis poques setmanes després del control de la infecció primària (54). El curs de l'hepatitis A recidivant de vegades es perllonga, però el virus s'acaba eliminant. Es desconeix si la resposta dels anticossos anti-VHA es desenvolupa amb una cinètica típica en individus amb hepatitis A recidivant. Els anticossos sèrics IgM anti-HAV persisteixen en individus amb infeccions recurrents per raons que encara no s'entenen (55) (56) (57) (53). Se sap relativament poc sobre la sincronització i la funció neutralitzadora dels anticossos IgG anti-HAV, o la seva capacitat per prevenir la replicació del HAV ressorgent.

Tot i el bon pronòstic que pot tenir la infecció per HAV, una proporció molt petita de casos poden evolucionar a una hepatitis fulminant i ser mortal.

4.8 Epidemiologia

En infants menors de 5 anys la infecció per hepatitis A es desenvolupa principalment asimptomàticament no obstant en els nens i nenes més grans

i, en l'edat adulta, la infecció en general evoluciona amb símptomes (58). S'ha descrit que el subgenotip IIIA, que és emergent a Europa, provoca hepatitis simptomàtica en infants (59).

Els símptomes descriuen una malaltia aguda i són generalment compartits amb els altres tipus d'hepatitis: febre, malestar, anorèxia, nàusees, molèsties abdominals, orina fosca i icterícia, amb un augment dels nivells de bilirubina sèrica i aminotransferases posteriorment.

El període d'incubació de l'hepatitis A es pot allargar des dels 15 dies als 50 dies i la malaltia clínica no sol durar més de 2 mesos, amb uns nivells de virus en sèrum de fins a 10^7 còpies genòmiques/ml a les dues setmanes següents a l'aparició de símptomes i fins a 6 setmanes més tard (60) (61). En el 10-15% dels pacients s'han perllongat els símptomes més enllà dels 6 mesos (57) (54).

Tot i que no és un tipus d'hepatitis que presenti cronicitat, s'han donat alguns casos que ha evolucionat cap a hepatitis fulminant en pacients amb trastorns hepàtics subjacents (62) (58).

La distribució geogràfica de l'HAV va molt lligat al poder socioeconòmic de les diferents àrees del planeta. En els països industrialitzats l'endemicitat del virus és baixa, en canvi és alta en països emergents, marcant dos patrons ben diferenciats d'epidemiologia. Degut a que la infecció produeix immunitat de per vida (43), les infeccions greus no són habituals en països on l'HAV és altament endèmic, ja que la població té contacte amb el virus des de la infància, normalment en forma d'infeccions subclíniques, quedant immunitzada durant les edats adultes. En canvi, en els països on hi ha una

baixa endemicitat, el contagi per pràctiques sexuals de risc, consum d'aliments o aigua contaminada, o bé, per viatjar a països endèmics fa que el contacte amb el virus es doni en edats més avançades en una població que no es troba protegida fent que el quadre clínic sigui més sever.

L'any 2017 el nombre de casos d'hepatitis A notificats a Espanya va augmentar en més de tres vegades respecte a l'any anterior, disminuint a la meitat el nombre de casos en 2018. L'augment va afectar fonamentalment homes, especialment en el grup de 20 a 44 anys. En la majoria dels brots notificats la transmissió és persona a persona. El percentatge de brots l'origen dels quals no és Espanya va augmentar en 2018 (9,1%) comparat amb 2017 (4,2%) (63).

4.9 Clínica

Els primers símptomes que manifesten totes les hepatitis virals solen ser semblants degut a l'origen hepàtic d'aquesta, mentre que les manifestacions extrahepàtiques i les complicacions solen variar. L'hepatitis A és una malaltia aguda amb aparició discreta que mostra signes o símptomes consistents en hepatitis viral aguda com per exemple, febre, mal de cap, malestar general, anorèxia, nàusees, vòmits, diarrea, dolor abdominal o orina fosca.

A més pot cursar amb icterícia o nivells elevats de bilirubina total ($\geq 3,0$ mg / dL) o nivells elevats d'alanina aminotransferasa sèrica (ALT > 200 UI / L). Donar positiu en anticossos de la immunoglobulina M (IgM) contra l'HAV (anti-HAV) confirmaria aquest diagnòstic. També es podria confirmar mitjançant la detecció del virus a través de RT-PCR.

Caldrà tenir en compte que les persones que hagin estat en contacte amb la persona infectada entre 15 i 50 dies abans de l'aparició dels símptomes també podrien estar cursant la infecció.

5. NOROVIRUS

Els norovirus humans (HuNoV) són la principal causa de brots de malalties transmiseses per aliments i l'agent causant del 18% de les infeccions diarreiques d'origen alimentari arreu del món (17). Afecten a qualsevol grup d'edat i la seva distribució és mundial, i de forma global, se'ls hi atribueix un total de 684 milions de casos i 212000 morts cada any. (64)

Generalment provoquen una malaltia autolimitant, poden causar una morbimortalitat significativa entre els infants, persones grans i persones immunocompromeses.

Els norovirus pertanyen a la família *Caliciviridae* que està formada per virus petits, 27-40 nm, sense embolcall, icosaèdrics i amb un genoma RNA lineal, de polaritat positiva i cadena senzilla (ssRNA) (65).

La família inclou onze gèneres dels quals membres de set infecten mamífers (*Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* i *Vesivirus*), dos gèneres infecten aus (*Bavovirus*, *Nacovirus*) i dos gèneres infecten peixos (*Minovirus* i *Salovirus*). Els patògens més importants per a l'home són *Norovirus* i *Sapovirus*, ambdós causants de gastroenteritis agudes. En el gènere *Vesivirus* es troba el *calicivirus* felí (Feline calicivirus, FCV), el qual causa trastorns respiratoris en gats i al gènere *Lagovirus*, el virus de la

malaltia hemorràgica del conill (*Rabbit hemorrhagic disease virus*, RHDV), el qual causa una malaltia greu en aquests animals.

Com hem esmentat abans ens centrem en els norovirus perquè són la major causa de gastroenteritis epidèmica i són causants de morbiditat i morbilitat en infants, persones immunocompromeses i persones grans provocant pèrdues econòmiques a conseqüència de les despeses en salut pública i associades a la manca de productivitat (66).

Alguns individus passen la infecció de manera asimptomàtica. En assajos fets amb voluntaris adults, entre el 15 i el 35% de les infeccions confirmades serològicament o mitjançant la detecció del virus en femta no estaven associades a gastroenteritis (67)(68)(69). Aquestes infeccions asimptomàtiques podrien venir d'una immunitat adquirida que protegeix de la malaltia però no de la infecció.

5.1 Història

Va ser en l'any 1929 que el pediatra John Zahorsky va descriure la "malaltia emètica de l'hivern" (*Hyperemesis heimis or the winter vomiting disease*) amb un quadre de diarrea a la majoria de les persones afectades. (70)

No és difícil imaginar lo complicat que deuria ser poder establir un agent etiològic per a la malaltia diarreica, els diferents microorganismes implicats i, en el cas dels virus, la dificultat afegida de fer-los créixer al laboratori en un cultiu cel·lular. Als anys 40 i 50 va ser un gran avenç poder fer investigacions amb persones voluntàries que s'oferien a ingerir suspensions

de femtes provinents de malalts de gastroenteritis però on s'havia descartat la presència de bacteries (71).

L'any 1968 es va produir un brot de gastroenteritis aguda entre el professorat i l'alumnat d'una escola de secundària a Norwalk, a Ohio, però, malgrat els esforços del CDC, cap agent causal va ser aïllat de forma immediata.

A principis dels anys 70, els assajos amb persones voluntàries van mostrar un patró d'immunitat adquirida d'entre 6 mesos a 2 anys de durada, (72) (73)(74) tot i que actualment, els assajos indiquen que la immunitat homotípica pot durar de 4 a 9 anys (75).

L'any 1972, el Dr. Albert Kapikian descobria l'anomenat virus de Norwalk gràcies a la microscòpia immuno-electrònica de les mostres provinents del brot de Norwalk (Ohio) que s'havien administrat a persones voluntàries (76).

L'any 1977 s'observen a través de microscòpia immuno-electrònica uns virus similars al Norwalk virus, petits i amb forma arrodonida, en unes mostres provinents de pacients amb gastroenteritis.

Un any més tard es realitza un assaig d'hemaglutinació d'adherència immunològica i es detecten anticossos per al virus Norwalk en el 50% de les persones adultes (77).

L'any 1982 es va aïllar d'un brot de gastroenteritis viral un prototip de Calicivirus clàssic, anomenat soca Sapporo, i es va determinar que era antigènicament diferent del virus Norwalk. Els Calicivirus són anomenats així per la seva forma de calze que li ve donada per les 32 depressions que

formen la seva càpsida (78). Dintre d'aquesta família hi va ser inclòs el Norwalk virus.

Els anys posteriors els estudis amb immunoassajos van permetre detectar l'antigen del virus al 40-60% dels brots de gastroenteritis aguda no bacteriana.

L'any 1986 s'utilitza l'immunoassaig enzimàtic per a detectar l'antigen víric en femtes i la presència d'anticossos en sang.

A l'inici de la dècada dels 90 es classifica el Norwalk virus com un Calicivirus, aquest cop en base al seu genoma i no només en l'estructura de la seva càpsida. L'any 1992 s'utilitza per primer cop la RT-PCR per a detectar el genoma del virus en femtes humanes i és mitjançant la producció de proteïna de la càpsida a través d'un sistema d'expressió de baculovirus que s'aconsegueixen formar partícules pseudovíriques o *Virus-Like Particles (VPL)*, que són morfològicament idèntiques als virus però que estan totalment desprovistes de genoma. D'aquesta manera s'assoleix l'expressió de proteïnes de la càpsida i per tant l'obtenció d'antígens virals. A partir d'aquests antígens va ser possible la producció d'anticossos específics que van permetre el desenvolupament de tècniques d'immunoassaig (ELISA) amb l'objectiu de poder realitzar tests de detecció antigènica (70).

Inicialment es creia que una persona era infecciosa fins a 48-72h després de recuperar-se d'una gastroenteritis produïda per NoV. No obstant, un estudi realitzat a 50 persones voluntàries exposades a NoV, el 82% es van infectar amb el virus i d'aquestes persones infectades, el 68% va emmalaltir, mentre que el 32% van romandre asimptomàtiques. La expulsió del virus en femtes

va començar 15 hores després de l'administració del virus amb un pic màxim a les 25-72h (70).

L'any 1995 es seqüencia el genoma complet del virus Norwalk. Un anàlisi ben ampli de 90 brots succeïts als Estats Units, on hi van participar 5000 persones, va demostrar que els virus "tipus Norwalk" eren la causa del 96% de les gastroenteritis no bacterianes transmiseses per aliments (79) .

A l'inici del segle XXI es detecta per primer cop el virus mitjançant RT-PCR en mostres d'aliments, i a partir d'aleshores s'avança en el coneixement de la seva elevada freqüència com per exemple el gran reservori humà disponible, els nombrosos casos asimptomàtics i l'estabilitat que manté en l'ambient.

L'any 2002 hi ha un augment entre el 100% i el 200% dels casos a Europa possiblement relacionats amb una nova soca que ràpidament es va convertir en el norovirus predominant a tota Europa (79).

Un any més tard, la Unió Europea funda la Foodborne Viruses in Europe Network i el US CDC Calicinet establerts com a estructures de vigilància, eines d'alerta primerenca i centres de recerca per a brots de norovirus (79).

L'any 2016, es va produir a Andorra el brot més gran causat per norovirus, que va acabar afectant a 4160 persones de tota Catalunya i que es va transmetre a través d'aigua embotellada. Arran d'aquest fet es va arribar a la conclusió que els controls bacteriològics no eren suficients per garantir la bona qualitat de l'aigua (80).

L'any 2018 el Dr. Ettayebi aconsegueix replicar norovirus humans en enteorids intestinals d'origen humà (HIEs) (81) i dos anys més tard, la Dra.

Constantini es basa en aquest cultiu cel·lular per a realitzar assajos d'infectivitat en norovirus humans inactivats amb clor i alcohol (82).

El norovirus és un bon exemple de patogen en què, gràcies a les millores que s'han donat en les tècniques de diagnòstic, hem pogut avançar en el seu reconeixement, i ha passat de ser un virus relativament desconegut als anys 90 a esdevenir la principal causa de gastroenteritis, epidèmica i esporàdica, arreu del món (83).

5.2 Descobrint-lo a nivell molecular

El genoma de norovirus està organitzat en tres ORFs i tenen l'extrem 5' de l'RNA unit covalentment a la proteïna VPg i l'extrem 3' poliadenilat. El primer ORF, l'ORF1, codifica per una poliproteïna precursora que es processa donant lloc a sis proteïnes imprescindibles per la replicació del virus (p48, NTPase, p22, VPg, proteasa (3CLpro), i a la RNA polimerasa RNA dependent (RdRp). Els ORF2 i ORF3 són traduïts a partir d'un RNA subgenòmic que es sintetitza durant el cicle replicatiu i codifiquen, respectivament, per a la proteïna major de la càpsida, la VP1 i per a la proteïna menor de la càpsida, la VP2. La proteïna VP1 està formada per 3 dominis. A nivell molecular, aquesta proteïna està organitzada en diferents dominis: un domini més conservat, el "shell" (S), i un domini protuberant (P) més variable (Figura 5). El domini S forma la part interna de la càpsida. El domini P forma les protuberàncies de l'estructura arquejada que sorgeixen de la coberta i que conté els dímers de contacte (84).

La seva classificació dins el gènere s'estableix en base a la diversitat en la seqüència que codifica per a la proteïna VP1 completa, i cal destacar que són un grup de virus molt diversos genèticament. Es classifiquen en 7 genogrups (G), dels quals els que infecten a humans els trobem en 32 genotips: GI (9 són HuNoV), el GII (19) i el GIV (1)(83). Els dos primers són els responsables de la majoria de casos, mentre que el GIV no és gens freqüent. Al seu temps, cada genogrup està subdividit en genotips i aquest en variants o soques. Paral·lelament, i degut a que es coneix que la recombinació juga un paper important en l'evolució dels norovirus, els virus dins de cada genogrup també es subclassifiquen en base a la diversitat genètica de la seqüència que codifica per a la RdRp, donant lloc a un sistema de classificació dual en base a les dues regions.

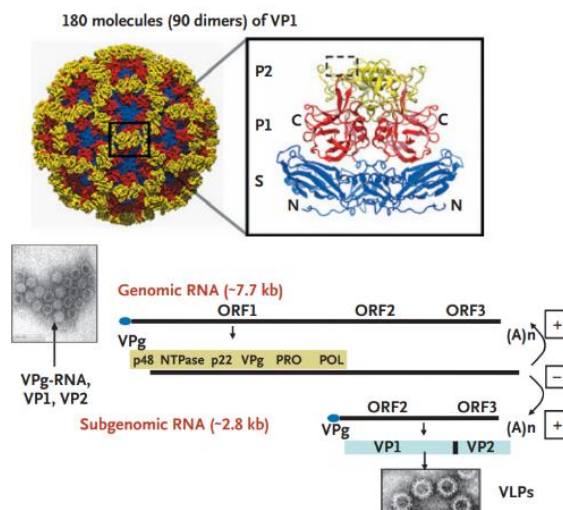


Figura 5. A la part superior, estructura icosaèdrica de la càpsida del NoV. Marcats en diferents colors els 3 dominis d'VP1. Les imatges en blanc i negre il·lustren les partícules víriques mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. També està representat el genoma d'RNA de cadena senzilla i polaritat positiva, format per

7654 nucleòtids. Imatge estreta de Glass et al., Norovirus Gastroenteritis. Emerg Infect Dis Clin Case Stud. 2014;203–12. (65)

5.3 El seu cicle biològic

Els norovirus humans utilitzen com a principal via d'entrada la cavitat bucal, tot i que no es descarten els aerosols que generen els vòmits de persones infectades com una altra via d'entrada (85). S'assumeix que el lloc de replicació principal és l'intestí prim per després sortir via tracte gastrointestinal en femta, a unes concentracions de entre 10^5 i 10^{10} equivalents genòmics per gram (86) tot i la seva baixa dosi infecciosa que alguns estudis situen en 18-1000 virions (87).

L'excreció en femtes té el seu inici a partir de les 18 hores després del contagi, fins i tot podria donar-se abans de l'inici dels símptomes, i s'estén de dies a setmanes després de la resolució dels símptomes aguts en persones adultes sanes (86)(68)(87). En el cas de persones grans, infants i individus immunocompromesos els nivells de virus en femta excretats poden ser més elevats i la durada d'excreció major (88)(89).

Sembla ser que les respostes del sistema immunitari tindrien un paper important a l'hora de reduir la durada d'excreció i les càrregues virals en la femta, i possiblement en explicar diferències en la clínica (90)(91)(92)(93).

D'altra banda, alguns autors han reportat que tant la durada d'excreció com les càrregues virals en femta d'individus infectats de forma simptomàtica i asimptomàtica són similars, si bé n'hi ha que defensen que els individus simptomàtics presentarien càrregues majors en femta que els infectats asimptomàtics (86)(68)(87)(93). A més, s'ha observat que les durades

d'excreció i les càrregues fecals poden variar en funció del genotip del virus en qüestió (86)(94)(95)(96)(97) i s'ha suggerit que diferències en la replicació vírica es podrien traduir en diferències en la facilitat de transmissió de diferents genotips (98)(99)(94)(97)(100).

5.4 La seva estratègia replicativa

L'entrada a la cèl·lula es produeix quan el virió interacciona amb la cèl·lula hoste a través d'un receptor específic de virus, segurament format per carbohidrats. Seguidament la partícula vírica s'introdueix dintre de la cèl·lula i allibera el seu RNA en el citoplasma. L'inici de la traducció es duu a terme mitjançant la interacció de la proteïna VPg amb la maquinària traduccional de la cèl·lula. Primerament es produeix la poliproteïna no estructural a través de la traducció de l'ORF1 que serà processada per a obtenir els precursors i productes per la proteïnasa viral NS6^{Pro} encarregada de tallar per diverses parts la poliproteïna. L'inici de la síntesi de la cadena negativa, antisense, comença en l'extrem 3' de la cadena RNA positiva i es creu que necessita de la interacció amb proteïnes cel·lulars.

La cadena negativa serveix com a motllo per a la transcripció de dos cadenes d'RNA positiu corresponents al genoma sencer i al RNA subgenòmic del virus. L'abundant RNA subgenòmic serveix de motllo bicistronic per a la síntesi de les proteïnes estructurals VP1 i VP2 (84).

La replicació del virus s'associa a membranes cel·lulars, igual que succeeix amb altres virus RNA de polaritat positiva. L'encapsidament del RNA viral, la maduració, i l'alliberament encara no són del tot coneguts.

La replicació primària dels norovirus es creu que es dona al tracte intestinal per després ser alliberats en les femtes. Els norovirus també han estat detectats en vòmits, per immuno microscòpia electrònica i per RT-PCR, així com també en saliva mitjançant RT-PCR.

En persones voluntàries que han estat infectades, l'alliberament de norovirus pot ocórrer abans dels primers símptomes i un cop el o la pacient ja està recuperat/da, allargar-se de varis dies a setmanes. Això complica el seu control degut a que una persona sense símptomes pot continuar contagiant el virus, per exemple en el cas dels manipuladors d'aliments (101).

5.5 Característiques antigèniques

La evolució dels norovirus està molt influenciada per la variació antigènica. Cada cert temps, emergeixen variants dels genotips degut, fonamentalment, a canvis antigènics en les proteïnes de la càpsida viral i per esdeveniments de recombinació genòmica. Aquestes noves variants reemplaçaran a les soques predominants associant-se a un augment en el número de brots de gastroenteritis aguda.

S'ha demostrat que els norovirus del genogrup II, genotip 4 (GII.4) evolucionen ràpidament, amb l'aparició d'una nova soca primària cada 2 a 4 anys quan es supera la immunitat del ramat a la soca que circulava prèviament (102). La diversitat genètica vírica és major en persones amb la malaltia crònica que en l'aguda, això fa suposar que les persones

immunocompromeses infectades crònicament són una font de noves soques epidèmiques de GII.4 (102).

5.6 Immunitat i patogènesis

La immunitat sembla que té una durada limitada, de manera que la infecció i la malaltia es produeixen al llarg de la vida. En persones adultes, la seroprevalença d'anticossos contra el norovirus supera el 80%, però alguns adults continuen experimentant un grau elevat de susceptibilitat a la infecció i la malaltia (103).

A més, aquesta es dona generalment entre les soques homotípiques, amb un cert grau de protecció a altres virus dins dels genogrups, però no cap a altres genogrups, sembla ser que hi ha una manca de protecció creuada entre el genogrup I (GI) i el genogrup II (GII) (74).

La infecció per norovirus indueix una resposta específica d'anticossos IgG, IgA i IgM, fins i tot si hi ha hagut exposició prèvia. Dues setmanes després de la infecció per norovirus s'ha demostrat un augment en la síntesi de IgA en el jejú.

Estudis recents mostren que la resistència a la infecció per norovirus és multifactorial. Existeix una resistència genètica en totes aquelles persones que tenen inactivat el gen FUT2, mentre que una part d'aquelles que tenen el gen FUT2 funcional són resistents a la infecció, la qual cosa suggereix que existeix una memòria immunològica que protegeix enfront de la infecció (67).

5.7 Epidemiologia

Els norovirus causen aproximadament 684 milions de gastroenteritis aguda al món, es calcula que repercuteix en un cost per a la societat de 60.000 milions de dòlars (104).

Tant en països industrialitzats com emergents s'ha detectat que ja han estat en contacte amb el virus abans de l'edat adulta, això és un reflex de la distribució global i la natura endèmica d'aquest virus. Immunoassajos realitzats per a detectar anticossos de GI i GII han demostrat la prevalença d'anticossos de tots dos genogrups s'incrementa més gradualment en l'edat en els països industrialitzats que en els emergents.

En general els brots solen ocórrer en hospitals, àrees recreatives, escoles, centres de dia, creuers, residències de gent gran, restaurants o esdeveniments socials amb càtering que poden afectar tant a famílies com a milers de persones.

A Europa hi ha una forta estacionalitat, predominant a l'hivern, encara que s'han descrit epidèmies puntuals a la primavera i l'estiu. L'any 2017 va haver-hi 211 brots a la UE, el que suposà el 4,2% del total de brots de zoonosis, afectant a 6550 persones, amb un 2,3% d'hospitalitzacions (105).

A Catalunya, el nombre de brots declarats en el període 2011-2016 es manté estable oscil·lant entre els 9 i els 25 brots a l'any (106).

Es creu que la xifra de persones afectades està subestimada degut a que molts cops no s'acudeix al centre mèdic i s'acaba passant a casa sense més complicacions (107). El sèrum oral per a poder reemplaçar els electròlits

perduts sol ser suficient per a la recuperació del pacient tot i que en casos greus amb elevada deshidratació és necessari l'administració del sèrum via parenteral.

Els norovirus s'han associat a infeccions a tots els grups d'edats tot i que molts brots afecten principalment a persones grans, a infants en edat escolar i adults.

5.8 Clínica

La gastroenteritis causada pel virus sol ser auto limitant resolent-se al cap de 24-48 hores. En persones amb malalties subjacents pot ser més greu i fer-se necessària la intervenció mèdica. En la majoria dels casos els símptomes són nàusees, vòmits, diarrea, dolor abdominal, mal de cap, rampes, miàlgies i de vegades febre. No es presenta sang en femtes. Els vòmits són més freqüents en infants afectats mentre que en persones adultes és més prevalent la diarrea (108) (109).

La màxima eliminació de virus en la femta es produeix en els primers dies després de la infecció, però pot continuar fins i tot després de tres setmanes, especialment en infants. Es calcula que aproximadament el 50% de les infeccions per norovirus són asimptomàtiques (70).

6. VIES DE TRANSMISSIÓ

Els virus entèrics són excretats en grans quantitats en femtes, el que fa que sovint contaminin aigües o aliments abans de tornar a ser ingerits per un nou hoste.

Els pacients que pateixen gastroenteritis virals poden arribar a excretar alts nombres de virus en les seves femtes podent arribar a assolir la xifra de 10^{10} còpies genòmiques de HuNoV per gram (gc/g) de femta. També en els episodis de vòmits els virus es disseminen en l'ambient arribant a alliberar-se 3×10^7 partícules víriques per cada episodi de vòmit (110). En el cas d'HAV la seva excreció en femtes pot arribar a ser superior a 10^{11} gc/g a l'inici dels primers símptomes, fent d'aquesta etapa la que concentra el major risc de transmissió (36).

Un cop al medi ambient els virus entèrics poden contaminar aigües i aliments que seran consumits tornant a infectar a nous individus i continuant així la seva expansió. Aigües destinades a beguda, aliments que siguin regats amb aquestes aigües contaminades o animals que les filtrin per alimentar-se són susceptibles de causar brots alimentaris per virus entèrics.

L'any 2014, el sistema europeu Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) informava que el 85% de les alertes eren causades per bivalves, mentre que les fruites eren les causants del 15% dels aliments contaminats. El marisc com les cloïsses, les ostres o els musclos són els animals que, en ser consumits crus, poden transmetre els virus sent els causants del 57%, 15% i l'11% dels brots respectivament (26). En quant a les fruites, les maduixes i els gerds congelats formen el 5% de totes les alertes de brots

alimentaris, mentre que el 3% estan relacionats amb barreges de fruites del bosc congelades. Tot i que cada cop hi ha més control sobre la qualitat i seguretat dels aliments que consumim, la globalització de les persones i dels aliments ha anat també en augment, fent que augmenti la demanda de productes de temporada durant tot l'any havent-los d'exportar de països on els controls sanitaris no són tan estrictes afavorint l'aparició de brots alimentaris.

La contaminació no tant sols es pot produir durant el conreu d'aquest aliments; la incorrecta manipulació dels aliments també constitueix un factor de risc. Pràctiques higièniques inapropiades durant el tractament dels aliments crus o poc cuinats, superfícies o fomites contaminats poden infectar a la persona consumidora.

El report del RASFF de l'any 2019 evidenciava un 17% més de notificacions referent a microorganismes patògens detectats en aliments que l'any 2018, especialment en productes d'origen animal.

En el cas de l'HAV i l'HEV, la transmissió parenteral també està contemplada, i en el cas de l'HEV (Figura 6) també s'han detectat casos per consum de carn de porc, senglar o cérvol al tractar-se d'una malaltia zoonòtica (111)(112).

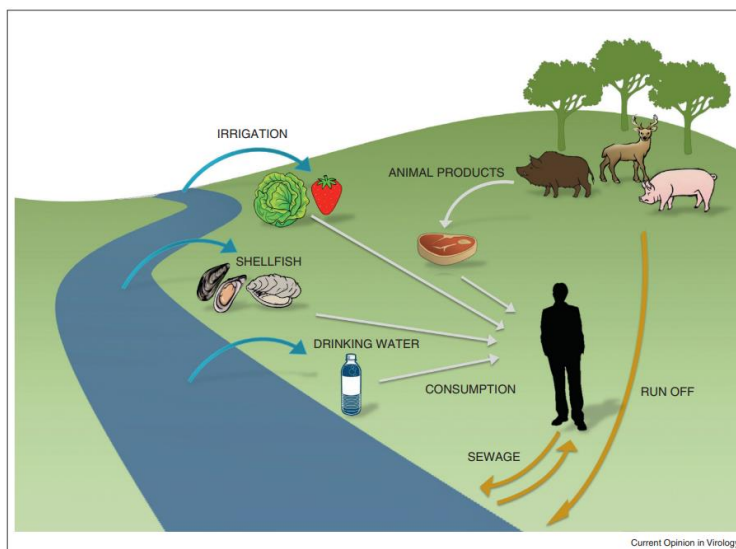


Figura 6. Rutes potencials de transmissió de l'HEV a través de menjar i de l'entorn. Imatge extreta de Van Der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis e virus transmission. Curr Opin Virol. 2014;4:91–6. (112)

L'HAV té algunes característiques que afavoreixen la seva propagació. La primera, l'elevada concentració de virus en femtes (més de 10^{11} còpies genòmiques/gr de femta) després de dues setmanes dels primers símptomes i fins a quatre setmanes més com a mínim. (36) A més, l'excreció viral s'inicia abans dels primers símptomes el que dificulta la contenció de la seva propagació. Finalment, la seva elevada persistència en el medi fa que pugui ser detectat durant un període llarg de temps en fomites com paper del vàter, rajoles o guants de làtex (113).

A més l'hepatitis A també per via sexual pot ser transmesa en casos de pràctica oro-anal (114) (115)(116).

Des del 2016, un augment alarmant dels casos d'hepatitis A en homes s'ha observat en persones homosexuals a Europa.(117) A Itàlia, el nombre d'aquests casos per als homes de 25 a 54 anys és superior a la d'altres països europeus segons el SEIEVA, Integrated Epidemiological System for Acute Viral Hepatitis.(117) Durant el període de juliol de 2016 a juliol de 2017 al nord d'Itàlia (Brescia), es van registrar 42 casos, dels quals 25 (60%) es van associar amb comportament sexual en lloc de transmissió del patogen a través del menjar. (118) Aquesta nova tendència també es confirma amb les dades publicades pel Centre Europeu de Prevenció i control de malalties (ECDC), que indica que el factor de risc relacionat amb la conducta sexual augmenta respecte als clàssics factors de risc, com el consum de mol·luscs crus o els viatges a zones endèmiques (118).

Les infeccions per via parenteral no són tan freqüents gràcies als actuals sistemes de control aplicats als productes hemoderivats (119) (120).

L'any 2018 es va produir un brot d'HAV, del subgenotip 1B, que va afectar a Suècia, Alemanya i Àustria i que es va propagar a través de maduixes congelades provinents de Polònia (121).

Els norovirus són estables al medi ambient i poden contaminar superfícies que siguin utilitzades per a la manipulació d'aliments suposant un risc afegit. Els espais tancats fa que es compliqui l'eliminació d'un brot, fet que fa vulnerables les persones que es troben en creuers i residències, així com hotels, escoles i escoles bressol.

A més la infecció per norovirus es pot repetir molts cops al llarg de la vida degut a la diversitat antigènica, la immunitat generada és de curta durada. S'ha detectat que, en climes temperats, hi ha més prevalença de brots per HuNoV durant els mesos freds (122).

L'any 2018 el RASFF informava que s'havien produït 47 notificacions referents a norovirus, 34 dels quals eren detectats en ostres de França i 6 notificacions en fruits del bosc. (121) Al report de l'any 2019 al RASFF es notificaren tant sols 17 avisos, més de la meitat corresponien a virus detectats en ostres vives i dos casos provenien de groselles vermelles congelades.

Els norovirus són extremadament contagiosos, i els humans són l'únic reservori conegut del virus. La dosi infectiva pot variar segons la soca, tot i que hi ha un debat obert sobre com calcular la ID50 (o la dosi infectiva que fa que el 50% dels individus exposats al virus es contagiïn), amb un rang estimat de entre 18.2 (123) a 1300-2800 (124) equivalents genòmics.

7. PREVENCIÓ I CONTROL

Més enllà de la vacuna per a HAV i per a Poliovirus, no existeixen mètodes específics per a la prevenció de la infecció per virus entèrics. La majoria de les actuacions en casos de brots són de contingència per evitar que s'estengui contagiant a més persones mitjançant una descontaminació de l'àrea i incidint en la neteja de les mans de les persones afectades pel brot.

La vacunació, quan es disposa de la mateixa, també és una eina clau que ajuda a la prevenció de la malaltia.

Als països industrialitzats la vacuna per a l'hepatitis A forma part del pla de vacunació. A Catalunya, a finals de l'any 1998, es va engegar un programa pilot de vacunació sistemàtica antihepatitis A en els preadolescents de 12 anys. La taxa d'incidència va disminuir de 3,28 el 2005 a 1,50 el 2015, però la reducció va ser només significativa en dones. El major nombre de casos va tenir lloc en homes adults, especialment aquells amb edat de més de 20 anys, degut a la transmissió entre homes que tenen sexe amb homes (*Men who have sex with men*, MSM) (125).

Existeixen dues vacunes d'un sol antigen, Vaqta (126) i Havrix (127), i una vacuna combinada contra l'HAV/HBV, Twinrix (GlaxoSmithKline, Rixensart, Bèlgica). Un cop adaptat el virus de l'HAV al creixement de cultiu cel·lular, s'atenua. Després, el virus purificat es inactivat amb formalina i s'absorbeix en hidròxid alumínic. Havrix i Twinrix tenen com a conservant 2-fenoxietanol, i Vaqta no disposa de conservant. Totes les preparacions de la vacuna contra la hepatitis A s'administren per via intramuscular (128).

Actualment la vacuna contra l'hepatitis A, Havrix 720, és una vacuna inactivada obtinguda a partir de soques del virus cultivades en cèl·lules diploides humanes inactivades amb formalina i adsorbides en l'adjuvant hidròxid d'alumini. S'administra als 15 mesos amb un recordatori als 6 anys (129).

Són resistents als detergents i als productes amb base d'alcohol i és més recomanable utilitzar hipoclorit a 5000 ppm, productes amb base de peròxid d'hidrogen o amb base fenòlica. En quant a la contaminació alimentària cal tenir molta cura en les aigües on creix el marisc fent-se imprescindible el

control de vessaments així com la purificació de l'aigua de beguda i de les piscines.

Com que els norovirus són un grup altament divers de virus RNA de cadena senzilla, el desenvolupament de vacunes és una àrdua tasca i caldrà anar adaptant les vacunes segons la ràpida evolució de les soques majoritàries (130).

Actualment no hi ha cap vacuna per a norovirus però hi ha diverses candidates desenvolupant-se (104).

8. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓ VÍRICA

La seguretat alimentària és la manera pràctica d'aplicar la dita de "la millor cura és la prevenció". Segons dades de la Unió Europea, l'any 2018, els virus entèrics van ser la causa de 389 brots alimentaris que van afectar a 10.000 persones. De tots els brots associats a peix, crustacis i mol·luscs, el norovirus va representar el 20% de tots els brots (117).

Per a detectar virus en aigua i aliments cal filar molt prim. Sovint se'n troben en concentracions massa baixes com per a ser detectats per mètodes que no siguin els moleculars. La reacció en cadena de la polimerasa quantitativa aplicada després de retrotranscripció (RTqPCR) ha estat el mètode escollit per a analitzar aliments degut a que permet detectar baixes quantitats de partícules víriques. Una altra dificultat afegida és que aquest baix número de partícules pot no estar repartit de manera uniforme en els aliments i a més la matriu alimentària que els conté també pot tenir inhibidors dels assajos moleculars.

La identificació del genotip i del subtip del virus que ha causat la contaminació alimentaria és important per tal de poder traçar la font inicial de la transmissió. També és rellevant per tal de poder discernir d'entre totes les soques que estan circulant en el medi ambient quines són causants de brots alimentaris i en aigua, i en quina gravetat ho fan. Actualment les tècniques de seqüenciació massiva (*Next-Generation Sequencing*, NGS) ens permeten llegir milers de seqüències d'àcids nucleics de diferents regions genòmiques i establir un mapa amb les variants, fins i tot les minoritàries, que es troben circulant en un moment determinat. D'aquí se'n pot extreure molta informació com variabilitat genètica, recombinacions, característiques relacionades amb virulència i de vegades també traçar geogràficament l'evolució del virus. No obstant cal encara aplicar-hi millores per poder-ho utilitzar de manera eficient en matrius alimentàries.

8.1 Inactivació vírica

Una de les característiques dels NoV és la seva resistència a diferents agents físico-químics. Estudis realitzats amb suspensions de femtes del virus Norwalk, han demostrat que el virus manté la seva capacitat d'infecció sobre voluntaris després de sotmetre aquestes a: pH 2.7 durant 3 hores a temperatura ambient, tractament amb èter al 20% a 4°C durant 18 hores o incubant a 60°C durant 30 minuts (131). A més, és resistent a la inactivació després de tractaments amb concentracions d'entre 3.75 i 6.25 mg/l de clor (clor lliure residual 0.5 a 1.0 mg/l), unes quantitats suficients per a inactivar altres virus entèrics i habituals en una aigua potable de consum (132) (133). No obstant, s'inactiva amb 10 mg/l de clor lliure que seria la

concentració usada quan es detecta una contaminació en el sistema de distribució d'aigua (132) (134).

El HAV és més resistent a la calor que altres *Picornavirus*, podent conservar la seva infectivitat després de tractaments a 60°C. En tractar-se d'un virus que en el medi ambient existeix com a partícula nua sense lípids en la seva estructura, presenta una elevada resistència als solvents. Així, és relativament estable al tractament amb èter, cloroform, àcid (és resistent a extrems de pH, mantenint-se estable a pH 3 i requerint-se un pH superior a 10 per a inactivar-lo). La inactivació total de la partícula viral es dona gairebé immediatament a temperatures superiors als 90 °C. L'activitat viral s'inhibeix per ebullició durant 5 minuts, amb formalina a altes concentracions i per radiació UV. D'altra banda, a 4°C roman estable durant setmanes a mesos, mentre que conservat entre -20°C i -70°C manté la seva infectivitat al llarg dels anys (135) (136) (137).

Per garantir la seguretat alimentaria s'utilitzen tractaments desinfectants en matrius alimentaries i aigua.

Per a realitzar processos de desinfecció podem utilitzar:

- Agents físics, com per exemple la calor, la sedimentació, la coagulació-floculació-sedimentació, la filtració, la llum o els rajos ultraviolats.
- Agents químics, com els halògens (clor, brom i iode), l'ozó, el permanganat de potassi o l'aigua oxigenada.

Tant la inactivació per clor com per altes temperatures són mètodes utilitzats actualment per la inactivació dels virus entèrics.

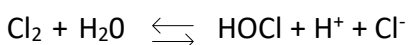
8.1.1 Inactivació per clor

La polvorització, el rentat o la immersió de fruites i verdures a l'aigua és una pràctica habitual durant el processament post collita. L'aigua s'ha identificat com un punt crític en la cadena del camp a la taula (138), degut a que pot contaminar-se fàcilment amb femtes, i una petita quantitat de contaminació pot ser àmpliament distribuïda a través de l'aigua. S'utilitzen desinfectants aquosos per a inactivar microorganismes que es transmeten a través de l'aigua, així com per desinfectar superfícies on s'han de manipular aliments (139).

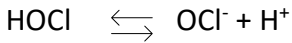
La cloració és el mètode de desinfecció predominat en els tractaments d'aigua i aigua residual. Com avantatges podem destacar el gran poder oxidatiu, la seva fàcil dosificació, el cost assequible, la capacitat d'inactivar un ampli ventall de microorganismes patògens i un efecte residual que protegeix l'aigua d'una posterior contaminació en la xarxa de distribució. Per contra, és molt corrosiu, pot donar un sabor desagradable a l'aigua i requereix de certes mesures de seguretat en la seva manipulació i emmagatzematge.

El grau de destrucció de microorganismes per la cloració depèn de la temperatura de l'aigua, del pH, del temps de contacte, de la turbulència, de la presència de substàncies que hi interfereixin i de la concentració de clor disponible.

El clor al entrar en contacte amb l'aigua reacciona formant àcid hipoclorós (HOCl) i àcid clorhídric (HCl):



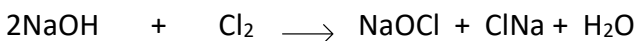
Per la seva banda, el HOCl es dissocia en ions hidrogen (H^+) i ions hipoclorit (OCl^-):



Si el pH és superior a 4, les espècies predominants són el HOCl i OCl^- . L'HOCl és un àcid feble i per tant la seva presència està fortament relacionada amb el pH de la solució.

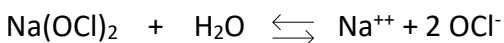
L'aigua natural té un pH de 7 que afavoreix que es presentin les dos formes, tant HOCl com OCl^- . Tots dos compostos tenen acció desinfectant i oxidant però l'HOCl és més eficient que l' OCl^- en la destrucció de microorganismes. El HOCl i l' OCl^- formen el clor actiu lliure. Tot i que el poder desinfectant del HOCl és molt més fort, i és considerat el desinfectant per excel·lència, ja que té la capacitat de penetrar en les membranes cel·lulars de les bacteries així com en les càpsides proteiques dels virus i el seu àcid nucleic (140).

L'hipoclorit de sodi es produeix clorant el hidròxid de sodi (sosa càustica) i conté entre un 1 a un 10% de clor actiu.

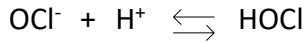


Les solucions amb hipoclorit, com per exemple amb hipoclorit de sodi o $Na(OCl)_2$, estableixen el mateix equilibri de ionització en l'aigua.

En valors baixos de pH predominen els ions hipoclorit com mostra la següent reacció:



I en valors alts pren importància l'àcid hipoclorós:



Per tant, es pot veure una variabilitat en la desinfecció depenent del pH de l'aigua. Quan el pH és menor de 4, el clor està en forma de clor molecular. A pH 5 i 6, el clor existent està en forma d'àcid hipoclorós. Per sobre de 6, hi ha ions hipoclorit, que acaben predominant quan el pH està per sobre de 7,5. Per tant, la desinfecció per cloració de l'aigua és òptima quan el pH ronda el 5-6 (Figura 7).

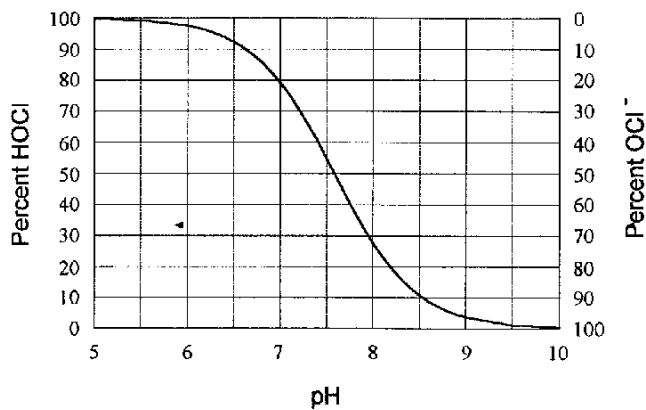


Figura 7. Influència del pH en la dissociació de l'àcid hipoclorós a l'ió hipoclorit. La proporció d'HOCl a un determinat pH està lligada a l'eficàcia relativa de qualsevol compost de clor utilitzat per a la desinfecció. Imatge extreta Niedz RP, et al. Control of In vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* [Internet]. 2002 Sep;38(5):468–71. (141)

Quan afegim clor a l'aigua aquest reacciona amb components que hi poden ser presents com substàncies orgàniques proteiques, aminoàcids així com amb substàncies químiques com Fe, Mn, NO₂, H₂S,... amb cada un d'aquests components el Clor genera diferents compostos que no tenen massa interès

a nivell desinfectant. A aquest Clor que no podrem aprofitar en la desinfecció l'anomenem "demanda de clor".

Un cop hem cobert aquesta demanda de clor, el clor lliure restant actuarà sobre la càpsida i sobre el genoma víric. En l'HAV s'ha demostrat que la regió més sensible al clor és el fragment comprès entre el nucleòtid 1 i el 671, suggerint que la inactivació de HAV per clor es deguda a la pèrdua del fragment de 5'NTR (142) .

8.1.2 Inactivació tèrmica

El tractament amb calor s'utilitza de manera freqüent per a inactivar els virus en aliments. Un tractament molt comú per garantir la seguretat en la llet és la pasteurització a 72º durant 15 segons (143) i en el cas dels mol·luscs és una cocció completa.(144) Diferents estudis en mol·luscos bivalves indiquen que són necessaris graus de cocció en què es garanteixi una temperatura interna de 90 °C durant un minut i mig per a inactivar completament els virus entèrics (145).

Els productors de marisc han d'aplicar els tractaments tèrmics que garanteixin l'eliminació dels microorganismes patògens per complir la normativa vigent de la Unió Europea (UE) per a mostres de zones de producció de classe B i C que no compleixin els criteris bacteriològics. Segons l'esquema oficial de classificació de la UE, les zones de producció de mol·luscs es classifiquen com a classe B quan el $\geq 90\%$ de les mostres contenen menys de 4.600 E. coli del nombre més probable (MPN) per 100 g

de carn i fluid intravalvar i el 10% restant està per sota de 46.000; i com a classe C quan totes les mostres tenen <46.000 E. coli MPN / 100 g (144).

8.2 La importància d'estandarditzar els processos de detecció: ISO

La identificació d'HAV i norovirus (GI i GII) en aliments compta amb dues ISO (International Organization for Standardization) que regulen la seva detecció quantitativa i qualitativa en mol·luscs bivalves, algunes fruites, vegetals, aigua d'ampolla i superfícies on es manipulen aliments.

Així doncs la ISO 15216-1:2017 i la ISO 15216-2:2019 han estat un gran pas perquè han establert la base per a establir uns estàndards comuns que sentin les bases per a la regulació de la seguretat alimentària relacionada amb virus. Durant el procés de validació d'aquestes ISO es van haver d'establir uns mínims requeriments de control de qualitat. Al llarg d'aquesta etapa, es van contaminar aliments de manera artificial per tal de saber-ne la quantitat real de còpies víriques i poder-la comparar posteriorment amb les còpies víriques recuperades. Per tenir un control de l'eficàcia en el mètode d'extracció es va afegir també un virus com a control de procés, el virus Mengo. Una eficiència d'extracció superior al 1% és considerada satisfactòria.

8.3 La gran avantatja de les RTqPCR multiplex

La RTqPCR és una tècnica que combina la transcripció inversa del RNA a DNA (en aquest context anomenat DNA complementari o DNAC) i l'amplificació de dianes específiques de DNA mitjançant la reacció en cadena de la

polimerasa (PCR). Per cada virus es pot realitzar una RTqPCR monoplex afegint la mostra i els diferents reactius a una placa amb pouets que serà introduïda dintre de la màquina per a que realitzi els diferents cicles amb temps i temperatures diverses. Segons el mètode estandaritzat, cada placa hauria de contenir la mostra per duplicat, així com una dilució per a detectar possibles inhibidors arrossegats per la mostra, si hi hagués.

La gran avantatge que suposen les RTqPCR multiplex és que poden fer la detecció i quantificació de més d'una diana vírica de forma simultània. En l'assaig que mostrem com a article I quantifiquem fins a 4 virus: HAV, NoV GI, NoV GII i el virus control mengovirus. Aquest tipus d'assaig estalvien temps a l'hora d'obtenir els resultats, així com recursos econòmics al no haver de gastar tantes plaques per a fer l'assaig.

8.4 El repte de la viabilitat

Un dels reptes més grans amb els que ens trobem quan volem quantificar virus en aliments i aigua és saber del cert que aquell virus són infectius i poden representar un perill per la població o pel contrari estan inactivats i són totalment innocus. Les proporcions de virus inactivats en mostres d'aliments i aigua pot variar depenent de quan de temps aquests virus han estat en el medi o en els aliments.

Tot i que el cultiu cel·lular comporta una despesa major de temps, no té tanta sensibilitat ni especificitat que els mètodes moleculars, és, a dia d'avui, el millor procés amb el qual examinar la infectivitat de virus aïllats. Hi ha alguns virus entèrics que són senzills de replicar com els enterovirus, en

canvi la gran majoria no tenen tanta facilitat (virus de l'HAV o HuNov) o directament no existeixen línies cel·lulars disponibles per a la seva propagació (146).

Un altra conseqüència de la dificultat de poder correlacionar presència i infectivitat es troba en la incertesa de l'eficiència dels processos de desinfecció. Durant l'assaig de processos de desinfecció es compara la matriu alimentària o l'aigua contaminada abans i després de l'aplicació del mètode infectiu. Els resultats de les proves moleculars poden donar falsos positius indicant que el funcionament d'aquets mètode no ha estat òptim quan la realitat pot ser que estiguem detectant el fragment del genoma que no ha estat malmès malgrat el virus ja no és viable gràcies al procés de desinfecció.

Aquest repte seria més senzill de resoldre si comptéssim al laboratori amb cultiu cel·lular per als virus més comuns en brots alimentaris. Però això no és així, de fet, només alguns dels virus amb els que treballem al laboratori compten amb un cultiu cel·lular adient.

Existeixen soques de l'HAV adaptades a la propagació in vitro i això permet comparar els resultats del mètode molecular amb els obtinguts després d'infectar cultius cel·lulars. En canvi, fins fa poc temps, l'estudi dels norovirus es veia dificultat per la manca d'un model animal de mida petita i un cultiu cel·lular que oferís possibilitats de propagació del virus. L'estudi mitjançant *virus-like particles* (VLP) que són morfològicament i antigènica i idèntiques al virus salvatge va ser un gran avenç.

Els norovirus infecten les cèl·lules adherint-se a les molècules dels antígens del grup sanguini (*Histoblood Group Antigen*, HBGA). L'any 2016 Khalil Ettayebi va obtenir un cultiu cel·lular adient per a norovirus a l'aconseguir replicar GII.4, el genotip causant de la majoria de brots i epidèmies, en una monocapa de cèl·lules HIEs. Per a altres genotips com GII.3, GII.17 i GI.1, va ser necessària la addició de bilis per obtenir replicació (81).

Posteriorment Veronica Constantini va analitzar al laboratori els efectes del clor i l'alcohol en la infectivitat dels norovirus humans, utilitzant el cultiu cel·lular en HIEs. D'aquesta manera es corroborava l'èxit en la implementació del cultiu HIEs en la replicació de diversos genotips de norovirus humans així com mostrava l'aplicabilitat dels HIEs per avaluar l'eficàcia d'aquests dos productes en la desinfecció de norovirus (82).

Malgrat aquests petits èxits, la majoria de virus no compten amb aquest mètode per a poder discernir entre partícules viables i no viables fent que els resultats obtinguts no siguin del tot acurats, un pal a la roda quan cal prendre una decisió correcta a l'hora d'implementar mesures de control alimentari que suposen una despesa econòmica. Una interpretació errònia dels resultats pot portar a decisions incorrectes que poden comportar grans pèrdues econòmiques a la indústria alimentària i a l'hora repercutir negativament en la reputació dels diferents actors que participen en el control de la salut pública.

Per això és tant important continuar investigant en cultius cel·lulars adients per als principals virus que representen una amenaça a la salut pública o en el seu defecte a microorganismes model que puguin acurar més les xifres obtingudes en les deteccions moleculars.

Un altre mètode per a fer aquesta aproximació entre còpies genòmiques obtingudes per mètodes moleculars i viabilitat és l'ús d'agents intercalants d'àcids nucleics, com per exemple el monoazida de propidi (PMA) o l'etidi de monoazida (EMA) com a pretractament previ a la RTqPCR (147) (148).

Aquests colorants funcionen a través d'un grup azida fotoinduïble, que s'enllaça covalentment amb l'àcid nucleic i condueix a la inhibició de l'amplificació de la PCR (149). Els virus intactes no permetran l'entrada de l'EMA o el PMA, mentre que les càpsides de virus danyades permetran que el colorant interaccioni amb els àcids nucleics vírics mitjançant la intrusió a través de les càpsides. La presència d'un grup azida permet l'enllaç del colorant amb l'àcid nucleic sota l'exposició a una intensa llum. La fotòlisi de l'EMA i del PMA converteix el grup azida en un radical de nitren altament reactiu, que pot reaccionar amb qualsevol molècula orgànica a la seva proximitat, com per exemple al àcid nucleic al que s'ha unit covalentment, impedit que pugui ser amplificat mitjançant PCR (150). (Figura 8).

D'aquesta manera els agents permeten discernir entre els virus que tenen l'estructura de la càpsida íntegra i els que la tenen malmesa, inferint així, que aquells que tinguin la càpsida danyada no seran viables (151).

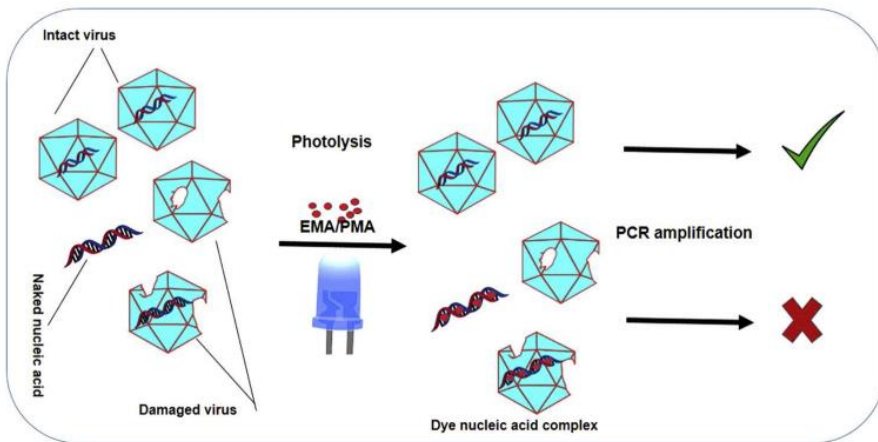


Figura 8. Mecanisme d'acció del PMA i l'EMA previ a l'amplificació per PCR. Imatge extreta de Hamza IA, et al. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. J Virol Methods. 2019;266 (October 2018):11–24. (152)

D'aquesta manera es fa una millor aproximació de còpies víriques detectades per mètodes moleculars i viabilitat. Tot i que el PMA és l'agent intercalant més selectiu, no es capaç de penetrar en partícules víriques no viables que tinguin la seva càpsida intacta (153). A més, factors com el grau d'estructura secundària present en la regió diana de la RTqPCR, el nivell d'interacció i protecció per les proteïnes de la càpsida, l'estabilitat mecànica o plàstica de la càpsida viral o el grau d'agregació dels virus en la mostra poden causar un biaix en l'aplicació del mètode amb PMA.

Una altra aproximació per a quantificar la infectivitat viral és l'ús de nucleases i proteïnases que degraden el material genòmic lliure per tal d'evitar falsos positius en els resultats de la RTqPCR (154).

Tot i les millores que aporta l'ús d'aquests components, aquests segueixen presentat limitacions a l'hora d'evitar amplificar regions genòmiques en virus inactivats quan es compara amb l'assaig en cultiu cel·lular (155). Per tant, tot i que són un gran avenç, cal continuar investigant per tal de poder trobar un mètode que s'apropi més a la realitat i ens ajudi a assegurar si una mostra alimentària o d'aigua representa un risc per a la salut pública.

Aquesta Tesi Doctoral té l'objectiu de facilitar la detecció de virus entèrics en mostres d'aliments i aigua, així com millorar la inferència de la seva viabilitat després de processos d'inactivació amb clor o calor.

Els objectius específics proposats s'agrupen en dos blocs:

1. Disseny d'una RT-qPCR multiplex optimitzada per a la detecció d'HAV, Norovirus GI i GII per a mostres de mol·luscs i aigua.
2. Refinament dels mètodes per a millorar la detecció de la infectivitat d'HAV en mostres ambientals mitjançant la utilització d'agents intercalants combinats amb RTqPCR.

INFORME DELS ARTICLES

1. Informe dels articles publicats i dels seus factors d'impacte

Els articles que formen part de la memòria de la Tesi Doctoral presentada per Noemí Fuster Rabat han estat publicats en revistes internacionals en el camp de la Virologia indexades en el *Journal Citation Reports*.

Article I:

Fuentes C, Guix S, Pérez-Rodríguez FJ, **Fuster N**, Carol M, Pintó RM, Bosch A. **“Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water”** *Food Microbiol.* 2014;40:55-63. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.003. S'ha publicat a la revista *Food Microbiology* a l'any 2014.

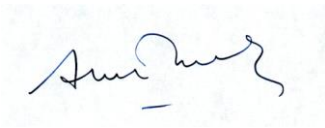
La revista ***Food Microbiology*** es troba en el quartil Q1 de l'àrea de FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY(9/133), amb un factor d'impacte de 4.090 a l'any 2017.

Article II:

Fuster N, Pintó RM, Fuentes C, Beguiristain N, Bosch A, Guix S. **“Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters”** *Water Res.* 2016;101:226-232. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.086. S'ha publicat a la revista *Water Research* a l'any 2016.

La revista **Water Research** es troba en el quartil Q1 de l'àrea de WATER RESOURCES (1/88), amb un factor d'impacte de 6.942 a l'any 2017.

Director i tutor



Dr. Albert Bosch Navarro

Directora



Dra Susana Guix Arnau

Barcelona, 17 de setembre del 2021

2. Informe de coautoria dels articles publicats

Article I:

Fuentes C, Guix S, Pérez-Rodríguez FJ, **Fuster N**, Carol M, Pintó RM, Bosch A.
“Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water” *Food Microbiol.* 2014;40:55-63. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.003.

L'article I, s'ha dut a terme en el marc del projectes “Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used in food preparation” (AQUAVALENS), finançat per la Unió Europea (Food-FP7-311846), “From genomics to biotechnology: selection of fast HAV populations based on the codon usage in the replicative cycle and on its physical and antigenic stability” (BIO2011-23461), finançat pel Ministerio de Economía y Competitividad, i “Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda por norovirus y sapovirus en Cataluña, 2010 – 2012” (PS09/02516), finançat per l'Institut de Salut Carlos III.

La doctorand ha dut a terme gran part experimental del treball i la gestió de les bases de dades, així com l'anàlisi i interpretació dels resultats. Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

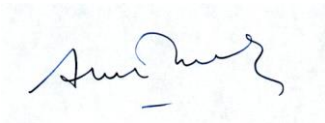
Article II:

Fuster N, Pintó RM, Fuentes C, Beguiristain N, Bosch A, Guix S. **“Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters”** *Water Res.* 2016;101:226-232. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.086.

L'article II s'ha dut a terme en el marc dels projecte “Protecting the health of Europeans by improving methods for the detection of pathogens in drinking water and water used in food preparation” (AQUAVALENS), finançat per la Unió Europea (Food-FP7-311846) i “Key factors of hepatitis A virus traffic to improve capsid yields and to design antivirals, and development of deep-sequencing protocols for a rapid response to outbreaks” (BIO2014-53285), finançat pel Ministerio de Economía y Competitividad.

La doctorand ha dut a terme la part experimental del treball i la gestió de les dades. Ha participat en l'anàlisi, interpretació dels resultats i en la redacció de manuscrit. Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Director i tutor



Dr Albert Bosch i Navarro

Barcelona, 17 de setembre del 2021

Directora



Dra Susana Guix Arnau

PUBLICACIONES

Article I: Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water

Autors: Cristina Fuentes, Susana Guix, Francisco Javier Pérez-Rodríguez, **Noemí Fuster**, Mònica Carol, Rosa Maria Pintó, Albert Bosch.

Els virus entèrics es transmeten per consum d'aigua i aliments contaminats a través de la ruta fecal-oral. Els virus més ben caracteritzats en brots alimentaris són el virus de l'hepatitis A i els norovirus. Aquests virus són excretats en grans quantitats al medi ambient, en el cas dels norovirus s'han detectat més de 10^{11} còpies genòmiques per gram de femta (68) mentre que persones infectades amb el virus de l'hepatitis A poden excretar de 10^6 a 10^{11} còpies genòmiques (61)(156). El tractament d'aigües residuals no pot assegurar l'eliminació de tots els virus, i el risc esdevé quan aquestes aigües contaminades es converteixen en aigües de beure, aigües de regadiu que entren en contacte amb hortalisses o amb aigües on es cultiva marisc per al consum humà. Amb la globalització els virus traspassen fàcilment fronteres i un producte cultivat a un país on els controls sanitaris siguin insuficients pot causar un brot a l'altra punta del món.

L'any 2004 el Comitè Europeu de Normalització (CEN) va encarregar a un grup d'assessorament tècnic (CEN / TC275 / WG6 / TAG4) el desenvolupament de mètodes estàndard (quantitatiu i qualitatiu) per a la detecció de NoV i HAV en aliments seleccionats amb l'objectiu d'obtenir un procediment ISO (ISO 15216-1:2017 i la ISO 15216-2:2019).

Un únic assaig on es poguessin detectar i quantificar alhora els virus més determinants de brots alimentaris seria un gran avenç que faria estalviar recursos econòmics i temps als grups d'investigació d'arreu del món.

En aquest assaig es va desenvolupar un mètode de detecció a través de RTqPCR multiplex per al HAV, norovirus GI i GII, utilitzant mengovirus com a control d'extracció, en aigua i aliments, i d'extracció d'àcids nucleics. L'eficiència de la multiplex va ser comparada amb la de monoplex específiques per a cada un dels virus assajats seguint la metodologia ISO.

La soca d'hepatitis A utilitzada va ser la pHM175 43c, adaptada a cultiu cel·lular i citopatogènica, i els norovirus aïllats de femtes de pacients amb gastroenteritis van ser el GI.6 i el GII.4. Les mostres d'aliments i aigua escollides van ser mostres de cloïsses i aigua que havien estat associades a brots de gastroenteritis, així com mostres d'aigua potable que van ser utilitzades com a control.

Durant el procés d'extracció del virus de la matriu alimentaria, així com de l'extracció del seu àcid nucleic, es pot donar la situació de perdre partícules víriques o genomes que ens farien infravalorar la quantitat inicial de virus en la mostra. Per corregir aquest error s'utilitzen virus control de procés, com la soca no virulenta de virus mengo MC₀, que va ser utilitzada com control tant de l'extracció del virus com de l'àcid nucleic. Amb l'adició d'una quantitat coneguda d'aquest virus i en funció del percentatge de recuperació del mateix podem afegir factors correctors de les eficiències obtingudes a les dades obtingudes de la resta de virus.

El punt de partida per a desenvolupar la multiplex van ser els paràmetres validats pel comitè CEN/TC 275/WG6/TAG4 de la Unió Europea en les monoplex per a la detecció del HAV i dels dos genotips de norovirus.

Un pas important en la detecció d'aquests 4 virus va ser escollir 4 sondes fluorescents diferents amb un solapament d'adsorció i emissió baix per tal de no confondre les senyals detectades per l'equip de RTqPCR.

Un altre dels reptes que se'ns plantejaven era que hi pogués haver competència entre les quatre reaccions quan es donaven simultàniament dintre de la mateixa RTqPCR. Per a resoldre-ho es van assajar diferents concentracions de cada virus en la multiplex, fins a un total de 6 condicions diferents, els resultats van ser comparats amb aquelles multiplex que tenien les mateixes condicions per un únic virus present.

Inicialment es van reproduir les condicions de les diferents monoplex però en el format multiplex, el resultat va ser una RTqPCR lleugerament menys sensible però capaç de detectar els 3 virus diana: HAV, norovirus GI i GII. Aquesta manca de sensibilitat feia necessari optimitzar les condicions inicials modificant les concentracions de sondes i primers. Finalment es va desenvolupar un assaig quàdruplex on no hi havia evidència de competència entre els diferents objectius individuals, excepte quan els nivells d'RNA estaven a prop dels nivell de detecció, suggerint una detecció quantitativa fiable del HAV, NoV GI i NoV GII en mostres d'aigua i aliments.

Si bé és cert que l'assaig multiplex va demostrar un cert desavantatge en comparació amb l'assaig monoplex en quant a la seva sensibilitat, en termes de cost i consum de reactius, va representar un estalvi del 30% en comparació amb el monoplex. L'avantatge de reduir els costos dels reactius i del temps utilitzat fa que l'assaig multiplex tingui un gran valor com a eina de cribratge virològic en mostres d'aliments i aigua.



Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water



Cristina Fuentes^{a,b}, Susana Guix^{a,b}, Francisco J. Pérez-Rodríguez^{a,b}, Noemí Fuster^{a,b},
Mónica Carol^c, Rosa M. Pintó^{a,b,*}, Albert Bosch^{a,b,*}

^a Enteric Virus Laboratory of the Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Public Health Agency of Catalonia, Generalitat de Catalunya, Manresa, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2013

Received in revised form

22 October 2013

Accepted 23 December 2013

Available online 30 December 2013

Keywords:

Foodborne viruses

Waterborne viruses

Virus assay

Multiplex

ABSTRACT

A quadruplex Real-Time RT-PCR assay for the simultaneous quantitative detection of hepatitis A virus (HAV), norovirus (NoV) GI and GII, and mengovirus (used as process control for determination of the virus/nucleic acid extraction efficiency) has been developed. This multiplex assay has been comparatively evaluated with the individual monoplex assays and showed to be slightly less sensitive, with average ΔCq values of 0.90, 0.28 and 0.44 for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively, in standard curves of viral RNA, or 0.32, 0.37 and 0.51 for the same viruses respectively, in naturally-contaminated samples. These ΔCq values were mostly negligible since it represented, in the worst case scenario, a loss of 0.43 log in genome copy numbers.

The quadruplex assay shows similar theoretical detection limits than the monoplex assay for NoV GII, and 10 times higher for HAV and NoV GI. However, when naturally-contaminated food and water samples were tested, these theoretical detection thresholds were often exceeded and very low genome copy numbers (below the limit of detection) could be quantified.

The quadruplex assay fulfills the requirements of the method developed by the European Committee on Standardization (CEN) for virus detection in selected foodstuffs with significant advantages in labor and reagent costs.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A wide variety of human enteric viruses may be found as food and water contaminants. However, with few exceptions most well characterized foodborne viral outbreaks are restricted to human norovirus (NoV), and hepatitis A virus (HAV), that thus become the main targets of virus detection in food. Human NoV are shed in extremely high numbers in the feces of infected individuals (up to 10^{11} genome copies per gram of stool) (Atmar et al., 2008) while patients suffering from hepatitis A may excrete from 10^6 to 10^{11} (Costafreda et al., 2006; Pinto et al., 2012). Wastewater treatments do not ensure complete virus removal (Blatchley et al., 2007; Bosch, 2007; El-Senousy et al., 2007), hence viruses become environmental contaminants in numbers high enough to represent a public

health threat although in numbers low enough to pose serious difficulties for their detection. Human NoV and HAV infections are mostly transmitted person-to-person but foodborne transmission is increasingly reported. Exposure to contaminated drinking water, to crops irrigated with contaminated waters or to shellfish grown in contaminated waters, eventually results in waterborne and foodborne outbreaks (Kukkula et al., 1999; Costafreda et al., 2006; Le Guyader et al., 2006; Le Guyader et al., 2010; Pintó et al., 2009; Li et al., 2012).

As a consequence of the globalization of food trade, many outbreaks are caused by products imported from third countries (Falkenhorst et al., 2005; Pinto et al., 2009; Sarvikivi et al., 2012). This has been evidenced to be particularly critical in recent outbreaks of hepatitis A (Gillesberg Lassen et al., 2013); (<http://www.cdc.gov/hepatitis/Outbreaks/2013/A1b-03-31/>). Hepatitis A is highly endemic in developing regions while it is much less frequent in developed regions. This pattern has important implications on the average age of exposure and on the severity of clinical disease which increases with age (Pinto et al., 2012). In young children the infection mostly develops asymptotically, while in adults the

* Corresponding authors. Department of Microbiology, University of Barcelona, Ave. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034620/934034621; fax: +34 934034629.

E-mail addresses: rpinto@ub.edu (R.M. Pintó), abosch@ub.edu (A. Bosch).

infection presents with symptoms. Since hepatitis A infection induces life-long immunity, severe infections among adults are rare in highly endemic regions where most children are infected early in life. By contrast, in low-endemic areas, the disease occurs mostly in adulthood with a high probability of developing severe symptomatic illness.

In this context, reliable and affordable methodologies for the detection of human NoV and HAV in water and, particularly, in food are needed. In 2004 the European Committee on Standardization (CEN) tasked a technical advisory group (CEN/TC275/WG6/TAG4) with the development of standard methods (quantitative and qualitative) for detection of NoV and HAV in selected foodstuffs that developed as ISO procedures (CEN/ISO TS 15216-1 and CEN/ISO TS 15216-2; April 7, 2013).

In the present study, a multiplex (quadruplex) for the quantitative detection of HAV, NoV GI and NoV GII, including mengovirus as process control, in food and water was developed. The efficiency of the procedures formulated by the CEN/TC275/WG6/TAG4 committee (CEN method), based on four monoplex reactions was compared with the quadruplex format in which all viruses are detected in a single reaction.

2. Materials and methods

2.1. Viruses, cells and plasmids

The cell-adapted cytopathogenic pHM175 43c strain of HAV (kindly provided by T. Cromeans, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) and NoV isolates GI.6 and a GII.4 (New Orleans 2009 type) from stool specimens of patients with gastroenteritis (kindly provided by R. Bartolomé, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) were used as positive controls. The pHM175 43c strain was grown in FRhK-4 cells as previously described (Aragonès et al., 2008).

Infectious mengovirus strain MC₀ (ATCC VR-1957) was obtained after transfection of a cDNA clone, pMC₀ (kindly provided by A. Palmenberg, University of Wisconsin), into HeLa cells as previously described (Martin et al., 1996). The MC₀ strain, which lacks the poly(C) tract in comparison to the wild-type mengovirus, shows growth properties identical to those of the wild-type virus but with a completely avirulent phenotype (Martin et al., 1996). Mengovirus stocks were produced in the same cells and added as process control in each sample before virus extraction to monitor the efficiency of virus and nucleic acid extraction from water and food samples, as described elsewhere (Costafreda et al., 2006; Pérez-Sautu et al., 2012; Pintó et al., 2009; Sano et al., 2011).

Amplicons of the genomic region 68–240 of HAV (pHM175 43c) and of the region 5012–5100 of NoV GII.4 (Lordsdale) were previously cloned in the pGEM-3Zf (+) vector (Promega) (Costafreda et al., 2006; Le Guyader et al., 2009) and that of the region of 5291–5376 of NoV GI.1 (Norwalk) in the pCR2.1-TOPO (Life Technologies) (Le Guyader et al., 2009). These plasmids were used for the multiplex assay development.

2.2. Primers and probes and molecular assays

The set of primers and probes used have been previously validated (Costafreda et al., 2006; da Silva et al., 2007; Loisy et al., 2005; Pintó et al., 2009) and target the 5' non coding region (5'NCR) of HAV and the junction of open reading frame 1 and 2 (ORF1/ORF2) of NoVs. The monoplex methods described in the CEN method for quantification of HAV, NoV GI and NoV GII (CEN method; Lees, 2010) were used as base line controls for the development of a multiplex format assay. The CEN method is based on previously described one-step RT-PCRs (Costafreda et al., 2006; da Silva et al.,

2007; Loisy et al., 2005; Pintó et al., 2009) with minor modifications. Concentrations of reverse primers, forward primers, and probes were 900 nM, 500 nM, and 250 nM, respectively (Table 1), in a final volume of 25 µl containing 5 µl of sample. The temperature–time program was also the same for all monoplex reactions: 1 h at 55 °C for the RT reaction, 5 min at 95 °C as a hot start, and 45 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 1 min at 60 °C for annealing, and 1 min at 65 °C for extension. The fluorescence was measured at the end of each cycle. The thermo cycler used through out this study was the Mx3000P (Stratagene).

Mengovirus was used as a process control for the monitoring of the virus/nucleic acid extraction efficiency and three external RNA controls, obtained from *in vitro* transcriptions of the above described plasmids, were employed for the monitoring of RT-PCR efficiencies. Hence, the multiplex assay to be developed was, actually, a quadruplex one. Four fluorescent labels, which show very low adsorption/emission overlap (Table 2), were chosen to be used in this quadruplex assay.

2.3. Competition between the different individual reactions within the multiplex assay

To examine the possible competition between the four individual RT-PCR reactions within the multiplex assay, viral RNAs from HAV, NoV GI, NoV GII and mengovirus were mixed in different concentrations and quantified using the multiplex real-time assay. Six mixes containing different genome copy concentrations of the 3 target viral RNAs per reaction and a fixed amount of mengovirus (10^5 TCID₅₀/rxn) were prepared. The genome copies/rxn of HAV, NoV GI and NoV GII, respectively, in each mix was as follows. Mix A: 10^0 , 10^3 , and 10^4 ; Mix B: 10^0 , 10^5 and 10^2 ; Mix C: 10^2 , 10^1 and 10^4 ; Mix D: 10^2 , 10^5 and 10^0 ; Mix E: 10^4 , 10^1 and 10^2 ; Mix F: 10^4 , 10^3 and 10^0 . Results were compared with those obtained by performing the multiplex assay in the same conditions but with only a single target viral RNA. All assays were performed in duplicate.

2.4. Food and water samples

Shellfish and spring water samples associated with outbreaks of NoV gastroenteritis (unpublished results) were supplied by the Public Health Laboratories of the Generalitat de Catalunya, Catalonia. Clams associated with an outbreak of hepatitis A (Pintó et al., 2009) were supplied by the Public Health Laboratories of the Generalitat Valenciana, Valencia. These clams were found also to contain NoV GGI and GGII. All these samples were titrated using both, the monoplex and the quadruplex formats to test the efficiency of this latter methodology.

Additionally, samples from fresh water employed as source of potable water were also used to further validate the multiplex methodology.

2.5. Virus and nucleic acid extraction

Processing of shellfish was performed using the CEN method essentially as described by Lowther and colleagues (Lowther et al., 2008). Briefly, for each sample, 2.0 g of digestive glands were finely chopped using a razor blade. Homogenates were then prepared by treating the chopped digestive glands with 2 ml of a 3 U/ml proteinase K solution. Samples were incubated at 37 °C with shaking for 60 min, followed by an additional incubation at 60 °C for 15 min. After a low-speed centrifugation at $3000 \times g$ for 5 min, supernatants were recovered and employed for RNA extraction. RNA extraction from 500 µl was performed using the NucliSens mini-MAG magnetic system (BioMérieux), following the manufacturer's instructions and eluted in 100 µl.

Table 1
Concentration of primers and probes used in the optimized multiplex reaction in comparison with the concentrations of the monoplex reactions.

Reagents	HAV ^a multiplex reaction	NoV GI ^b multiplex reaction	NoV GII ^c multiplex reaction	Mengovirus ^d multiplex reaction	Individual monoplex reactions
Reverse primer	500 nM (nt 223–240)	500 nM (nt 5354–5376)	500 nM (nt 5080–5100)	900 nM (nt 184–209)	900 nM
Forward primer	100 nM (nt 68–85)	100 nM (nt 5291–5308)	100 nM (nt 5012–5037)	500 nM (nt 110–127)	500 nM
Probe	100 nM (nt 150–169)	250 nM (nt 5321–5343)	100 nM (nt 5042–5061)	250 nM (nt 147–166)	250 nM

^a nt positions following the sequence of the strain HM175 (Accession number M14707).

^b nt positions following the sequence of the strain Norwalk (Accession number M87661).

^c nt positions following the sequence of the strain Lordsdale (Accession number X86557).

^d nt positions following the sequence of the strain MC₀ (Martin et al., 1996); (Accession number L22089).

Ten liters of spring water were concentrated through positively charged glass wool (Ouest Isol, France) (Pérez-Sautu et al., 2012). Viruses were eluted with 200 ml 0.05 M glycine buffer containing 3% beef extract, pH 9.5, and the eluate was further concentrated by polyethylene glycol (PEG) precipitation (Lewis and Metcalf, 1988). River water samples (5–500 l) were concentrated by direct filtration through Zeta plus filters (CUNO) without preconditioning (El-Senousy et al., 2007). Adsorbed viruses were eluted with 1 l of glycine-beef extract buffer, pH 9.5 and re-concentrated by organic flocculation (Katzenelson et al., 1976). The resulting pellets were resuspended in 6 and 12 ml of PBS, pH 7.4 for spring and river water, respectively, and stored at –80 °C. Viral RNA was extracted from 1 ml aliquot of the concentrates using the NucliSens miniMAG magnetic system (BioMérieux) to a final volume of 100 µl.

2.6. Raw and accurate estimation of virus genome copy numbers

To accurately estimate the virus genome copy numbers in food and water samples corrective factors from the efficiencies of the virus/nucleic acid extraction (percent recovery of a known concentration of mengovirus added to the samples) and the RT-PCR amplification (percent recovery of a known concentration of RNA external control added to the samples) were applied to the raw copy numbers. These corrective factors were only applied when the efficiencies were over 1%. Additionally, both corrective factors were only applied when the efficiencies were in the same log range, otherwise only the lowest efficiency was applied because the influence of the higher efficiency is in comparison mathematically negligible (Pintó et al., 2009). Mengovirus was added to the same sample used for target detection before virus/nucleic acid extraction. After the extraction, each replica of each sample was split in two and all three RNA external controls added into one of the aliquots (Costafreda et al., 2006).

2.7. Estimation of theoretical limits of detection

To build up probability of detection (POD; Probit) curves for both, monoplex and quadruplex formats, dilution series from 10^3 to 10^{-1} genome copies per reaction of each virus were tested by titrating 8 replicas per dilution. From these curves the theoretical limits of detection with a 95% probability and with a 95% confidence level were determined.

3. Results

3.1. Quadruplex mastermix under monoplex conditions

A quadruplex reaction, containing all primer sets and probes for the detection of the three targets as well as the process control virus, was first tested using mastermix concentrations of reagents, primers and probes and the RT-PCR program of the monoplex reactions as described in the CEN method. Plasmids containing the cloned amplicons corresponding to each of the three targets were

individually tested under these conditions and the corresponding standard curves of ten-log dilution series (from 2.4×10^6 to 2.4×10^1 , from 3.2×10^6 to 3.2×10^1 and from 3.3×10^6 to 3.3×10^1 plasmid copies for HAV, NoV GI and for NoV GII, respectively) plotted and compared to the monoplex curves. The quadruplex format under monoplex conditions showed to be less sensitive independently of the target tested (Fig. 1), with the exception of the process virus control which showed an exact match between both curves (data not shown). The average ΔCq values between the quadruplex and monoplex assays were of 1.66, 2.39 and 2.21 for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively. These losses in sensitivity clearly indicated that the concentration of the different primer sets, probes, reagents and/or the RT-PCR program were not yet optimized for the multiplex format since they represented losses of 0.70, 0.85 and 0.82 logs for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively.

3.2. Quadruplex mastermix optimization

In an attempt to optimize the quadruplex format, the concentrations of primers and probes were modified (Table 1). Under these new conditions the standard curves for the quadruplex compared to the monoplex using both target plasmids (from 2.4×10^8 to 2.4×10^0 , from 5.2×10^8 to 5.2×10^0 , and from 7.1×10^8 to 7.1×10^0 plasmid copies for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively; Fig. 2) and viruses (from 3.9×10^6 to 3.9×10^0 , from 5.7×10^5 to 5.7×10^0 and from 1.1×10^7 to 1.1×10^0 genome copies for HAV, NoV GI, NoV GII, respectively, and from 1.1×10^4 to 1.1×10^{-1} TCID₅₀ for mengovirus; Fig. 3) were very similar. The average ΔCq values between the quadruplex and monoplex formats were of 0.14, 0.08 and –0.83 for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively, when testing target-containing plasmids and of 0.90, 0.28 and 0.44 when testing viruses. These increases in the Cq values were mostly negligible since it represented, in the worst case scenario, a loss of 0.43 log in genome copy numbers.

The theoretical limits of detection with a 95% probability of detection and a 95% confidence level for HAV, NoV GI and NoV GII, following the POD curves, were of 491, 23 and 33 copies per reaction, respectively, in the quadruplex format, in comparison with 51, 2 and 17, respectively in the monoplex format (Fig. 4). Thus, the detection limit for NoV GII was similar in the mono- and quadruplex assays, while for HAV and NoV GI the detection limits were 1-log higher in the quadruplex format. However, while the detection limit in the quadruplex reaction for NoV GI was in the same log range than that of NoV GII, for HAV it was 1-log higher and the probability to detect the same log genome copy numbers was of 50%. To evaluate the implication of these losses in the theoretical detection limit in real-life scenarios, naturally contaminated samples were tested in parallel using both approaches.

The competitive effect between the individual RT-PCR reactions within the multiplex assay was ascertained by assaying different concentrations of HAV, NoV GI, NoV GII RNA (Table 3). Overall, there was good correlation between the results from mixes containing the four viral RNAs and those with containing a single target viral

Table 2
Fluorochromes used in the Real-Time-RT-PCR multiplex format.

Probe	5' label	3' label	Absorption peak (nm)	Emission peak (nm)
HAV150 (HAV)	6-FAM ^a	MGBNFQ ^b	492	520
Mengo 147 (Mengovirus)	VIC	MGBNFQ ^b	538	554
NVGG1p (NoV GI)	Texas Red-X NHS Ester	Iowa Black RQ-Sp	595	615
QNIFS (NoV GII)	ATTO 647N	BHQ ^c	644	669

^a 6-carboxyfluorescein.

^b Minor Groove Binder Non Fluorescent Quencher.

^c Black Hole Quencher.

RNA. When viral RNA levels were near the limit of detection, more substantial differences were observed (Table 3).

3.3. Comparative virus titration in food and water samples using the monoplex and quadruplex formats

A spring water sample associated with an outbreak of NoV GII gastroenteritis (RCC33/11), affecting 12 out of 26 exposed boy

scouts camping at the Catalan Pyrenees in 2011, was analyzed. While only GII NoV was detected in feces samples from the affected patients, both GI and GII NoV were detected in the water sample, with NoV GII being present at a 2.3-log higher concentration (Table 4).

Among foodborne gastroenteritis outbreaks investigated during 2010–2011 in Catalonia, the presence of viruses in food products was confirmed in 2 out of 48. Both outbreaks (UVEVV07/10 and UVEVV126/11) affected customers of restaurants and the implicated food was oysters. The number of associated cases was of 3 out of 6 exposed and 7 out of 10 exposed, respectively. Oysters from both outbreaks contained NoV GI and GII as well, although GII was present in higher numbers (Table 4). However, both GI and GII NoV were detected in clinical samples in the UVEVV07/10 outbreak, but only GII NoV was detected in the UVEVV126/11 outbreak samples.

An outbreak of hepatitis A occurred in the autonomous community of Valencia, Spain, in 2008 (Pintó et al., 2009) affecting over 100 patients who ate contaminated clams imported from Peru. During the outbreak episode, HAV was detected and quantified in shellfish samples but the presence of NoV GI and NoV GII was not analyzed. In the present work all three viruses have been detected

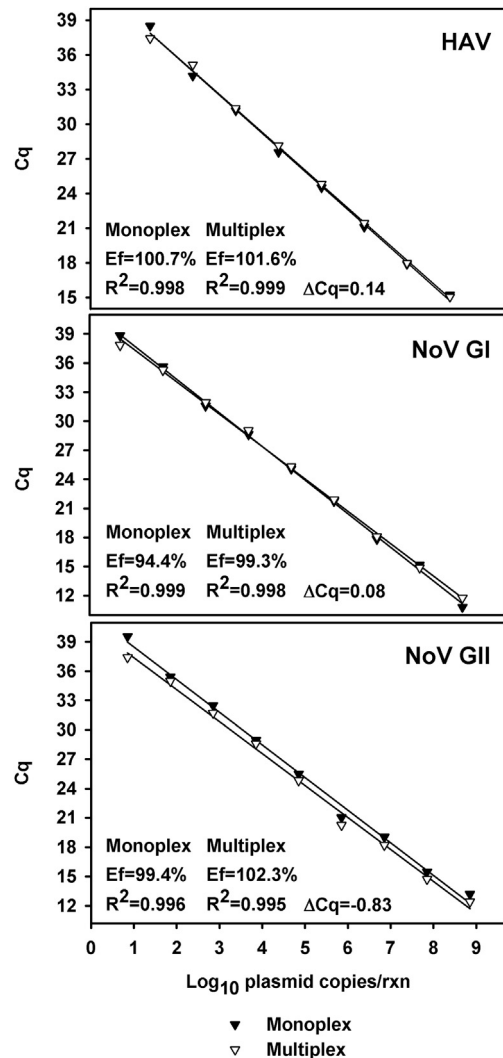
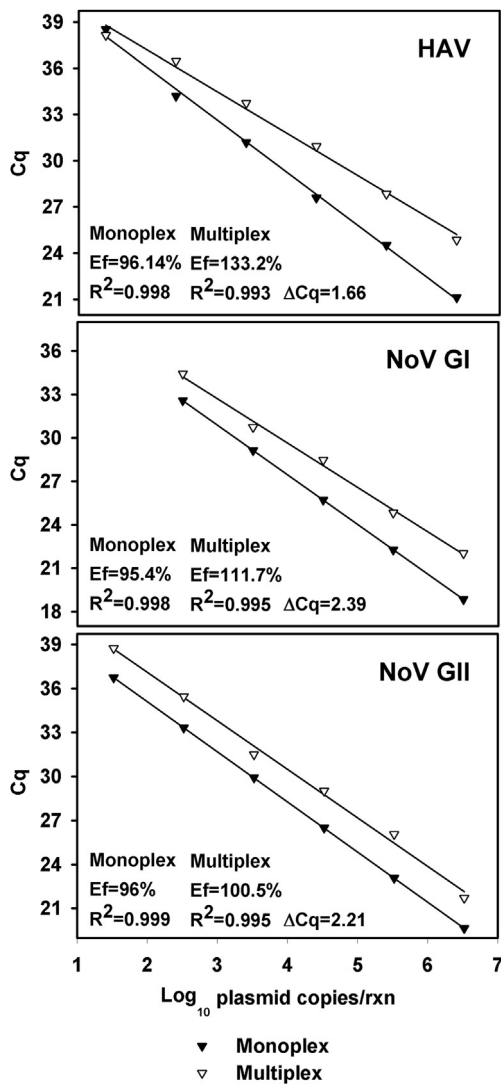


Fig. 1. Comparative standard curves of the monoplex and multiplex assays, using the conditions of the monoplex assays and plasmid targets containing the cloned amplicons corresponding to HAV, and NoV GI and GII.

Fig. 2. Comparative standard curves of the monoplex and multiplex assays, using optimized conditions for each assay and plasmid targets containing the cloned amplicons corresponding to HAV, and NoV GI and GII.

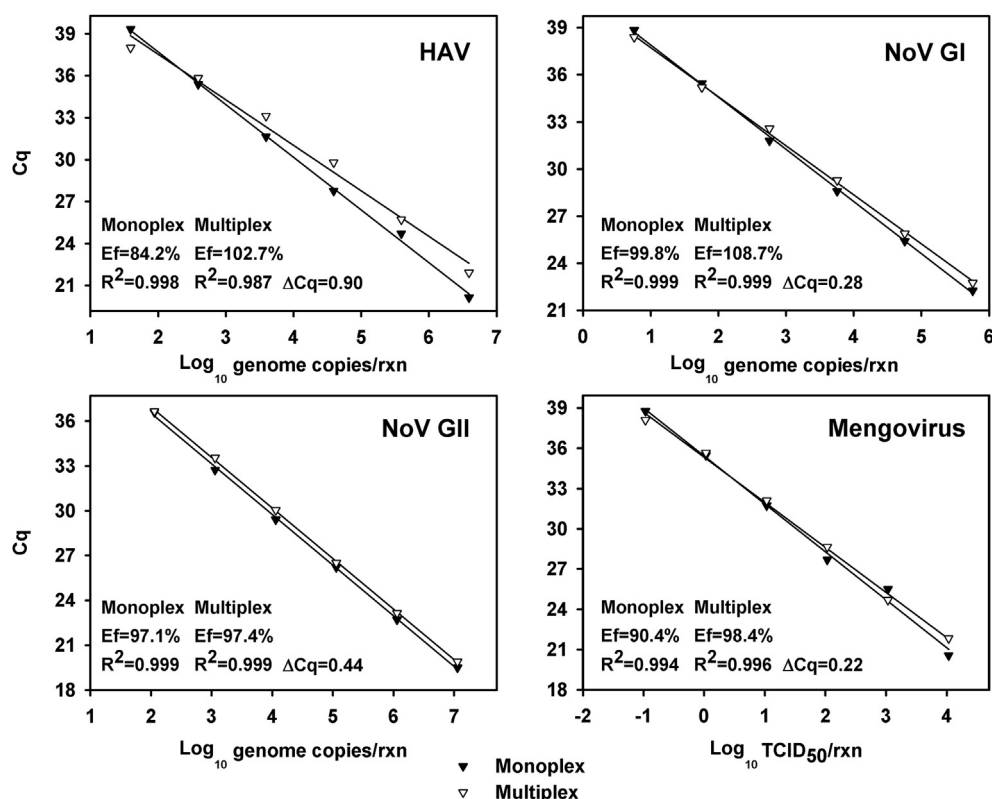


Fig. 3. Comparative standard curves of the monoplex and multiplex assays, using optimized conditions for each assay and viral RNA targets corresponding to HAV, NoV GI and GII and mengovirus.

and quantified in frozen ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) samples related to the outbreak (Val01/08 to 05/08; Table 4).

Additionally, water samples from the Llobregat river, used as the source of potable water in the area of Barcelona, that contained both NoV GI and GII (Pérez-Sautu et al., 2012) were comparatively titrated using the monoplex and the multiplex assays (Table 5).

Overall there was a substantial correlation between genome copy titers obtained through the individual monoplex assays and the single multiplex assay (Tables 4 and 5). Compared to the monoplex assay, an average loss of 0.4 log in genome copies was observed in the multiplex assay, particularly, 0.32 for HAV, 0.37 for NoV GI and 0.51 for NoV GII (Table 6). These losses, which were less pronounced when genome copies were higher (Tables 4 and 5), were in agreement with the data from the standard curves.

Among all samples (Tables 4 and 5), 0 out of 7, 1 out of 8 and 2 out of 17 for HAV, NoV GI and NoV GII, respectively, were negative by the quadruplex assay and positive by the monoplex assay. These discrepancies were due to the low genome copies present in these specific samples (shellfish UVEVV126/11 for NoV GI and waters 1 and 8 for NoV GII) which were below the limit of detection in the quadruplex system. Additionally, none of the positive samples by the quadruplex assay was negative by the monoplex assay. It is remarkable that many river water samples containing genome copy numbers of HAV (sample 9) and NoV GII (samples 1, 2, 3, 5, 7, 8 and 9) below their theoretical limit of detection in the quadruplex assay, were however positive by this assay (Table 5).

4. Discussion

The European Commission (SANCO 12655/2012) has implemented the monitoring of human NoV and HAV in some food imports in accordance with Art 15 (5) of Regulation (EC) No 882/2004

(<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:194:0011:0021:EN:PDF>), employing the standardized CEN methodologies (ISO/TS 15216-1 and ISO/TS 15216-2; 2013). These procedures are currently being validated following the principle and technical protocol for the validation of alternative methods in the field of microbiological analysis of food, animal feeding stuffs and environmental and veterinary samples for the validation of alternative methods (ISO 16140). Additionally, the CEN method has recently been evaluated for the monitoring of human NoV in naturally contaminated fresh produce (El-Senousy et al., 2013).

One of the difficulties in the implementation of the CEN protocol on a regular basis for the monitoring of food is that it is time-consuming and implies a high cost. Thus, the development of an efficient multiplex assay is highly appropriate. Although the CEN method is open to the use of different sets of primers and probes, provided that they target the 5'NCR of HAV, and the ORF1/ORF2 junction of NoV GI and GII, and to the use of different virus process controls, provided they all perform equally as well as the ones included in the annexes of the CEN protocol, we remained with these latter ones for the development of the multiplex assay. The development of a quadruplex assay including the detection of HAV, NoV GI and NoV GII in addition to the mengovirus virus MC₀ strain used as a process control was challenging. In fact, to our knowledge no quadruplex assays for the detection of viruses in water and food matrices have been described. Most multiplex assays are actually triplex systems based on the detection of only HAV, NoV GI and NoV GII without a process control (Morales-Rayas et al., 2010), the detection of NoV GI and GII with the inclusion of Murine norovirus as process control (Stals et al., 2009), or on the detection of NoV GI, GII and GIII (Wolf et al., 2007) or GI, GII and GIV (Miura et al., 2013).

Multiplex assays usually show higher detection limits compared with their monoplex counterparts and the losses in sensitivity tend

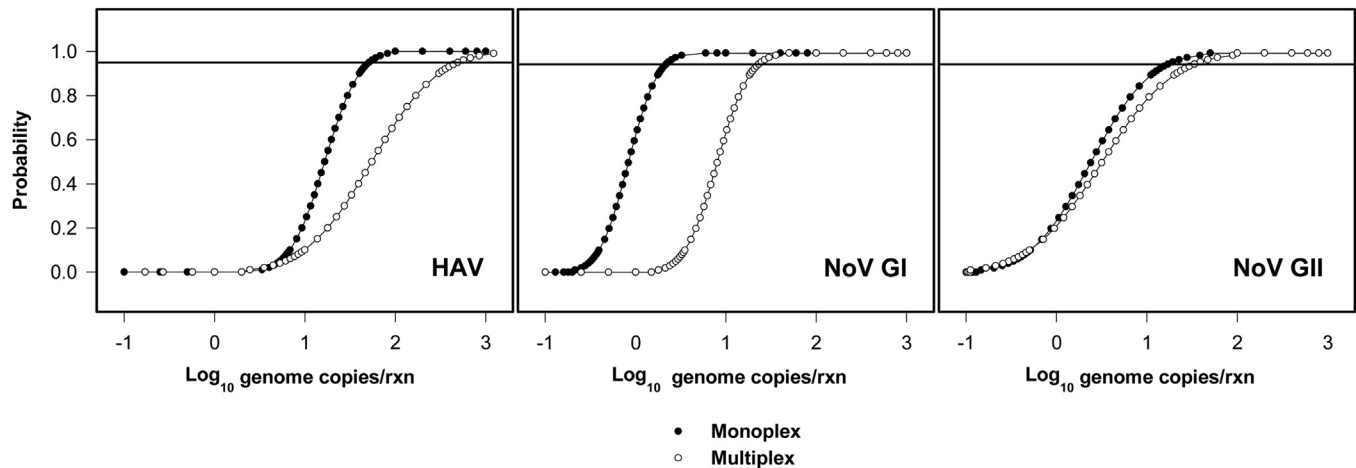


Fig. 4. Probability of detection curves of HAV, and NoV GI and GII with the monoplex and multiplex assays.

to correlate with the number of targets included and the number of copies of each target (Spackman et al., 2005; Stals et al., 2009; Templeton et al., 2004). In the present study, a quadruplex assay has been developed which did not show competition between the different individual targets with a small decay observed only when the RNA levels were near the threshold of detection. These data suggest that reliable quantitative detection of HAV, NoV GI and NoV GII in the same sample is possible using the multiplex real-time PCR assay herein presented, provided that viral numbers are above the limit of detection. The POD curves depicted a certain loss of the theoretical limit of detection of HAV and NoV GI compared with the monoplex format. These theoretical limits, however, are in the

range of other commonly described triplex and quadruplex assays (Huber et al., 2011; Thonur et al., 2012). Additionally, it should be remarked that our theoretical detection limits do not always reflect the reality. We considered the actual genome copy number of a sample the one obtained through the corrected value of the most sensitive monoplex assay and we compared this value with the statistical POD value of the quadruplex assay which is accounted to be one hundred percent effective. By this comparison, water samples with genome copy numbers below the theoretical 95% POD could be detected with the multiplex assay. In this way, one water sample contaminated with HAV and three water samples contaminated with NoV GII, in numbers below the POD, came out to be positive. Even four NoV GII containing water samples were detected positive by both the monoplex and the multiplex assays being its content clearly below the theoretical limits of detection at a 95% probability for both assays. As a general rule, in water and food samples, an average loss of 0.43 log genome copies is observed between the monoplex and the quadruplex assays independently of the virus target and the number of copies.

Despite the fact that the quadruplex assay showed a certain disadvantage compared with the monoplex assay in terms of sensitivity, in terms of reagents cost and time consumption, the quadruplex assay represents around 30% saving compared to the monoplex, since 65 and 43 reactions/wells are needed to quantify a single sample (including sample dilutions and replicas, the process control, the external controls and the standard curves) by the monoplex or the multiplex assay, respectively, following the CEN protocol. In both formats, for each sample, two undiluted replicas and two 1/10 diluted replicas are assayed. In the monoplex format this implies a total of 16 reactions per sample (4 per virus \times 4 viruses), while in the multiplex format this number goes down to 4 reactions per sample.

Savings could be even greater when combining the analysis of several samples in the same plate, especially if 384-well plates are used instead of 96-well plates. The critical balance between loss in sensitivity and cost and time reductions should be considered and the use of the quadruplex approach may be postulated as a routine monitoring schedule while performing individual monoplex reactions for confirmation of some viruses in specific samples.

5. Conclusions

A standardized multiplex assay for quantitative NoV GI and GII and HAV detection in water and food, using mengovirus as process control has been developed. The quadruplex assay format has been

Table 3

Competition between the different individual reactions within the multiplex assay. Different concentrations of spiked HAV, NoV GI, NoV GII RNA (expressed as \log_{10} genome copies per reaction) were tested in a multiplex mix containing either the four target viruses or a single virus. Depicted data (mean \pm standard error of the \log_{10} genome copies) are per reaction.

	Spiked	Four target viruses		Single target virus	\log_{10} difference
		Detected	Detected	Detected	
Mix A	HAV	0	ND ^a	ND ^a	NA ^c
	NoV GI	3	2.79 \pm 0.01	2.95 \pm 0.05	0.15
	NoV GII	4	3.78 \pm 0.02	3.94 \pm 0.03	0.15
	Mengo	5	5.01 \pm 0.01	5.04 \pm 0.02	0.03
Mix B	HAV	0	ND ^a	ND ^a	NA ^c
	NoV GI	5	5.02 \pm 0.10	4.95 \pm 0.05	-0.07
	NoV GII	2	1.69 \pm 0.06	1.78 \pm 0.05	0.09
	Mengo	5	5.04 \pm 0.01	5.04 \pm 0.02	0.00
Mix C	HAV	2	0.65 \pm 0.09	2.24 \pm 0.08	1.60
	NoV GI	1	0.72 \pm 0.15	0.43 ^b	-0.29
	NoV GII	4	3.95 \pm 0.03	3.94 \pm 0.03	-0.02
	Mengo	5	5.09 \pm 0.03	5.04 \pm 0.02	-0.05
Mix D	HAV	2	1.47 \pm 0.00	2.24 \pm 0.08	0.78
	NoV GI	5	4.97 \pm 0.01	4.95 \pm 0.05	-0.02
	NoV GII	0	0.38 ^b	1.09 ^b	0.72
	Mengo	5	5.10 \pm 0.01	5.04 \pm 0.02	-0.06
Mix E	HAV	4	4.66 \pm 0.00	4.70 \pm 0.00	0.04
	NoV GI	1	1.08 \pm 0.11	0.43 ^b	-0.65
	NoV GII	2	1.50 \pm 0.05	1.78 \pm 0.05	0.28
	Mengo	5	5.08 \pm 0.02	5.04 \pm 0.02	-0.05
Mix F	HAV	4	4.55 \pm 0.09	4.70 \pm 0.00	0.15
	NoV GI	3	2.88 \pm 0.00	2.95 \pm 0.05	0.07
	NoV GII	0	ND ^a	1.09 ^b	NA ^c
	Mengo	5	5.11 \pm 0.02	5.04 \pm 0.02	-0.07

^a ND: Not detected.

^b Only one replica was positive.

^c NA: Not applicable.

Table 4

Comparative quantitative detection through monoplex and multiplex assays in spring water and shellfish samples associated with outbreaks. Mean \pm standard error of the \log_{10} genome copies of HAV and NoV GI and GII per liter of water or g of shellfish hepatopancreas are depicted. Values corresponding to raw or corrected data, taken into consideration the extraction and RT-PCR efficiencies provided they were both over 1%, are shown. The estimated limit of detection, expressed as the \log_{10} genome copies per liter of water or g of shellfish hepatopancreas, is also shown.

Sample	Virus	Monoplex		Limit of detection	Multiplex		Limit of detection
		Raw	Corrected		Raw	Corrected	
Spring water (RCC33/11)	HAV	ND ^a	ND ^a	2.71	ND ^a	ND ^a	3.69
	GI	4.26 \pm 0.03	4.28 \pm 0.03	1.34	4.24 \pm 0.05	4.27 \pm 0.05	2.36
	GII	6.46 \pm 0.01	6.55 \pm 0.01	2.23	6.58 \pm 0.02	6.58 \pm 0.02	2.52
Oysters (UVEVV07/10)	HAV	ND ^a	ND ^a	3.31	ND ^a	ND ^a	4.29
	GI	1.94 \pm 0.14	NA ^b	1.94	1.60 ^c	NA ^b	2.96
	GII	3.96 \pm 0.05	NA ^b	2.83	3.26 \pm 0.01	NA ^b	3.13
Oysters (UVEVV126/11)	HAV	ND ^a	ND ^a	3.31	ND ^a	ND ^a	4.29
	GI	2.07 ^c	NA ^b	1.94	ND ^a	NA ^b	2.96
	GII	2.54 ^c	NA ^b	2.83	1.94 ^c	1.96 ^c	3.13
Coquina clams (Val01/08)	HAV	3.14 \pm 0.16	5.03 \pm 0.16	3.31	2.82 \pm 0.38	4.42 \pm 0.38	4.29
	GI	2.08 \pm 0.21	3.97 \pm 0.21	1.94	1.76 ^c	3.51 ^c	2.96
	GII	2.80 \pm 0.28	4.69 \pm 0.28	2.83	2.31 \pm 0.28	3.99 \pm 0.28	3.13
Coquina clams (Val02/08)	HAV	3.91 \pm 0.00	5.85 \pm 0.00	3.31	3.69 \pm 0.02	5.73 \pm 0.02	4.29
	GI	2.22 \pm 0.09	4.15 \pm 0.09	1.94	1.76 ^c	3.79 ^c	2.96
	GII	3.34 \pm 0.03	5.27 \pm 0.03	2.83	2.75 \pm 0.11	4.78 \pm 0.11	3.13
Coquina clams (Val03/08)	HAV	3.55 \pm 0.02	5.35 \pm 0.02	3.31	3.25 \pm 0.44	4.98 \pm 0.44	4.29
	GI	2.38 \pm 0.22	4.19 \pm 0.22	1.94	1.75 ^c	3.48 ^c	2.96
	GII	3.77 \pm 0.03	5.58 \pm 0.03	2.83	3.42 \pm 0.18	5.14 \pm 0.18	3.13
Coquina clams (Val04/08)	HAV	3.53 \pm 0.07	5.06 \pm 0.07	3.31	3.61 \pm 0.27	5.14 \pm 0.27	4.29
	GI	2.68 \pm 0.59	4.21 \pm 0.59	1.94	1.78 \pm 0.00	3.39 \pm 0.00	2.96
	GII	3.33 \pm 0.01	4.86 \pm 0.01	2.83	2.52 \pm 0.01	4.15 \pm 0.01	3.13
Coquina clams (Val05/08)	HAV	4.28 \pm 0.03	6.07 \pm 0.03	3.31	3.62 \pm 0.02	5.58 \pm 0.02	4.29
	GI	2.10 \pm 0.24	3.90 \pm 0.24	1.94	2.10 \pm 0.16	4.03 \pm 0.16	2.96
	GII	3.63 \pm 0.00	5.42 \pm 0.00	2.83	2.88 \pm 0.01	4.92 \pm 0.01	3.13

^a ND Not detected.

^b NA Not applicable due to efficiencies equal or lower than 1%.

^c Only one replica was positive.

Table 5

Comparative quantitative detection through monoplex and multiplex assays in river water used as source of potable water. Mean \pm standard error of the \log_{10} genome copies of HAV and NoV GI and GII per liter of water are depicted. Values corresponding to raw or corrected data, taken into consideration the extraction and RT-PCR efficiencies provided they were both over 1%, are shown. The estimated limit of detection, expressed as the \log_{10} genome copies per liter of water, is also shown.

Sample (Volume)	Virus	Monoplex		Limit of detection	Multiplex		Limit of detection
		Raw	Corrected		Raw	Corrected	
1 (5 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	3.41	ND ^a	ND ^a	4.39
	GI	ND ^a	ND ^a	2.03	ND ^a	ND ^a	3.06
	GII	2.06 \pm 0.28	2.10 \pm 0.28	2.93	ND ^a	ND ^a	3.22
2 (5 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	3.41	ND ^a	ND ^a	4.39
	GI	ND ^a	ND ^a	2.03	ND ^a	ND ^a	3.06
	GII	2.19 \pm 0.14	2.30 \pm 0.14	2.93	1.94 ^b	1.98 ^b	3.22
3 (500 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	1.41	ND ^a	ND ^a	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	0.48 ^b	0.49 ^b	0.93	-0.27 ^b	-0.26 ^b	1.22
4 (500 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	1.41	ND ^a	ND ^a	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	1.44 \pm 0.31	1.44 \pm 0.31	0.93	0.85 ^b	0.86 ^b	1.22
5 (500 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	1.41	ND ^a	ND ^a	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	0.44 \pm 0.01	0.69 \pm 0.01	0.93	0.33 ^b	0.67 ^b	1.22
6 (500 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	1.41	ND ^a	ND ^a	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	1.65 ^b	1.65 ^b	0.93	0.59 ^b	0.59 ^b	1.22
7 (500 l)	HAV	ND ^a	ND ^a	1.41	ND ^a	ND ^a	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	0.94 ^b	0.94 ^b	0.93	0.06 ^b	0.14 ^b	1.22
8 (500 l)	HAV	4.29 \pm 0.05	4.29 \pm 0.05	1.41	4.15 \pm 0.11	4.15 \pm 0.11	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	-0.12 ^b	0.06 ^b	0.93	ND ^a	ND ^a	1.22
9 (500 l)	HAV	1.70 \pm 0.04	1.70 \pm 0.04	1.41	1.13 \pm 0.33	1.13 \pm 0.33	2.39
	GI	ND ^a	ND ^a	0.03	ND ^a	ND ^a	1.06
	GII	0.07 ^b	0.20 ^b	0.93	0.21 \pm 0.11	0.21 \pm 0.11	1.22

^a ND Not detected.

^b Only one replica was positive.

Table 6

Differences in log₁₀ titers between monoplex and multiplex assays ($\Delta\log_{10}$ monoplex–multiplex), regarding the viral load of the sample (log₁₀ genome copies per L of water or per g of hepatopancreas). Values represent the mean \pm standard error. Numbers in brackets indicate the number of samples used in the calculation.

log ₁₀ viral load	HAV	NoV GI	NoV GII	Total
6	0.49 (n = 1)	(n = 0)	0.03 (n = 1)	0.23 \pm 0.26 (n = 2)
5	0.26 \pm 0.15 (n = 4)	(n = 0)	0.48 \pm 0.02 (n = 3)	0.35 \pm 0.09 (n = 7)
4	0.14 (n = 1)	0.48 \pm 0.18 (n = 4)	0.71 \pm 0.01 (n = 2)	0.49 \pm 0.12 (n = 7)
3	(n = 0)	0.17 \pm 0.30 (n = 2)	0.70 (n = 1)	0.34 \pm 0.25 (n = 3)
2	(n = 0)	(n = 0)	0.45 \pm 0.13 (n = 2)	0.45 \pm 0.13 (n = 2)
1	0.57 (n = 1)	0.34 (n = 1)	0.82 \pm 0.24 (n = 2)	0.64 \pm 0.15 (n = 4)
0	(n = 0)	(n = 0)	0.39 \pm 0.22 (n = 4)	0.39 \pm 0.22 (n = 4)
Total	0.32 \pm 0.10 (n = 7)	0.37 \pm 0.13 (n = 7)	0.51 \pm 0.08 (n = 15)	0.43 \pm 0.06 (n = 29)

validated in naturally-contaminated water and food samples in comparison with the four monoplex assay counterparts.

As expected, the quadruplex assay showed a certain loss of sensitivity in comparison with the monoplex counterpart which however was negligible when naturally-contaminated samples were assayed. Nevertheless, the advantage of lower reagent costs and less time-consuming labor makes the multiplex assay a most valuable tool for the virological screening of food and water samples.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants, CSD2007-00016 and BIO2008-01312 (Ministry of Education and Science, Spain; <http://web.micinn.es/>), BIO2011-23461 and PS09/02516 (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain; <http://www.idi.mineco.gob.es/>), 2009SGR00024 and XRB-Biotechnology Reference Network (Generalitat de Catalunya; www.gencat.cat/agaur) and FP7-KBBE-2012-6 of the European Union (<http://cordis.europa.eu/fp7>). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We are indebted to the Catalan Viral Gastroenteritis Study Group, particularly to Angela Domínguez, Rosa Sala and Roser Torra, for supplying food and water samples associated with outbreaks.

References

Aragónès, L., Bosch, A., Pintó, R.M., 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82, 1688–1700.

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y., 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1553–1557.

Blatchley III, E.R., Gong, W.L., Alleman, J.E., Rose, J.B., Huffman, D.E., Otaki, M., Lisle, J.T., 2007. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environ. Res.* 79, 81–92.

Bosch, A., 2007. *Human Viruses in Water*, first ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston.

Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3846–3855.

da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 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.

El-Senousy, W.M., Costafreda, M.I., Pinto, R.M., Bosch, A., 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 174–179.

El-Senousy, W.M., Guix, S., Abid, I., Pinto, R.M., Bosch, A., 2007. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 164–167.

Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Bottiger, B., Molbak, K., 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveill.* 10 (9), 1795.

Gillesberg Lassen, S., Soborg, B., Midgley, S., Steens, A., Vold, L., Stene-Johansen, K., Rimhanen-Finne, R., Kontio, M., Lofdahl, M., Sundqvist, L., Edelstein, M., Jensen, T., Vestergaard, H., Fischer, T., Molbak, K., Ethelberg, S., 2013. Ongoing multi-strain food-borne hepatitis A outbreak with frozen berries as suspected vehicle: four Nordic countries affected, October 2012 to April 2013. *Euro Surveill.* 18 (17), 20467.

Huber, I., Campe, H., Sebah, D., Hartberger, C., Konrad, R., Bayer, M., Busch, U., Sing, A., 2011. A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Euro Surveill.* 16 (7), 19798.

Katzenelson, E., Fattal, B., Hostovesky, T., 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 638–639.

Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E., von Bonsdorff, C.H., 1999. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.* 180, 1771–1776.

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., Ruggeri, F.M., 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3878–3882.

Le Guyader, F.S., Krol, J., Ambert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2010. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J. Clin. Microbiol.* 48, 915–920.

Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 618–624.

Lees, D., 2010. International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in Molluscan shellfish. *Food Environ. Virol.* 2, 146–155.

Lewis, G.D., Metcalf, T.G., 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1983–1988.

Li, J., Predmore, A., Divers, E., Lou, F., 2012. New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 331–352.

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. *J. Virol. Methods* 123, 1–7.

Lowther, J.A., Henshilwood, K., 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. *J. Food Prot.* 71, 1427–1433.

Martin, L.R., Duke, G.M., Osorio, J.E., Hall, D.J., Palmenberg, A.C., 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* 70, 2027–2031.

Miura, T., Parnaudeau, S., Grodzki, M., Okabe, S., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2013. Environmental detection of Genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6585–6592.

Morales-Rayas, R., Wolffs, P.F., Griffiths, M.W., 2010. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 48–55.

Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R.M., Bosch, A., 2012. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ. Microbiol.* 14, 494–502.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7350–7355.

Pinto, R.M., D'Andrea, L., Perez-Rodriguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S., Bosch, A., 2012. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol.* 7, 331–346.

Sano, D., Perez-Sautu, U., Guix, S., Pinto, R.M., Miura, T., Okabe, S., Bosch, A., 2011. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1111–1114.

Sarvikivi, E., Roivainen, M., Maunula, L., Niskanen, T., Korhonen, T., Lappalainen, M., Kuusi, M., 2012. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol. Infect.* 140, 260–267.

Spackman, E., Kapczynski, D., Sellers, H., 2005. Multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of three viruses associated with Poultry Enteritis complex: Turkey Astrovirus, Turkey Coronavirus, and Turkey Reovirus. *Avian Dis.* 49, 86–91.

Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Werbrouck, H., Herman, L., Uyttendaele, M., Van Coillie, E., 2009. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J. Virol. Methods* 161, 247–253.

Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Beersma, M.F.C., Kroes, A.C.M., Claas, E.C.J., 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1564–1569.

Thonur, L., Maley, M., Gilray, J., Crook, T., Laming, E., Turnbull, D., Nath, M., Willoughby, K., 2012. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet. Res.* 8, 37.

Wolf, S., Williamson, W.M., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Lin, S., Ball, A., Scholes, P., Greening, G.E., 2007. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5464–5470.

Article II: Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters

Autors: Noemí Fuster, Rosa Maria Pintó, Cristina Fuentes, Nerea Beguiristain, Albert Bosch, Susana Guix.

L'objectiu d'aquest estudi és millorar la relació entre el numero de còpies genòmiques reflectit en la RTqPCR i la infectivitat real del virus per tal de poder fer una aproximació més correcta sobre el risc que suposa el consum d'un aigua que ha estat prèviament desinfectada mitjançant clor o altes temperatures, basant-nos en estudis previs que recomanaven l'ús dels agents intercalants de bases com el Propidi de Monoazida (PMA). Aquests colorants tant sols podran entrar en els virus que tinguin les càpsides malmeses, i per tant assumim que no són infectius. Després d'un pas de fotoactivació els agents intercalants s'uniran covalentment a l'àcid nucleic de cadena doble o que contenen un grau elevat d'estructures secundàries, i impediran la retrotranscripció del RNA, i per tant aquests genomes provinents de càpsides malmeses no seran amplificats.

Per a dur a terme aquest estudi es va provar diferents concentracions de PMA per a valorar el grau d'inactivació d'HAV en mostres d'aigua inactivades per clor i mitjançant tractament tèrmic. La concentració de PMA que mostrava una caiguda més gran del títol víric entre dues mostres, una de virus infecciosos i l'altra amb virus inactivats amb 10 mg/L de clor lliure durant 30 minuts a temperatura ambient, va ser de 200 µM.

L'adició de Triton X-100, que estava descrit en diversos articles com un surfactant que millorava l'acció del PMA, també va ser assajat en condicions de presència i absència, i els resultats van ser més favorables quan hi afegíem aquest compost.

Com a matriu vàrem utilitzar també fosfat salí (PBS) per reproduir les condicions de les aigües salobres que irriguen alguns camps de cultiu del Delta del Llobregat, així com mostres d'aigua contaminades de manera natural amb el virus.

El virus utilitzat va ser la soca d'hepatitis A pHM175 43c, adaptada a cultiu en la línia cel·lular FRhK-4 i citopatogènica, i amb les quals es va fer la titulació d'infectivitat mitjançant TCID₅₀.

Per inactivar el virus i després poder inferir la caiguda de títol mitjançant el PMA, es va fer servir hipoclorit de sodi i temperatures iguals o superiors a 70°. Les concentracions de clor lliure que es van experimentar van ser de 0, 2.5, 5 i 10 mg/L, un cop posats en contacte i després d'un període d'incubació a temperatura ambient, es va mesurar el clor lliure amb un fotòmetre i s'inactivà amb tiosulfat (1%). Per a la inactivació del virus mitjançant temperatures es va sotmetre l'alíquota a temperatures de 70°, 85° i 99° durant 5 minuts.

Passats 30 minuts en el cas de la inactivació per clor lliure i 5 minuts per a la inactivació per calor, quan alguns dels virus ja haurien de tenir la càpsida malmesa degut a la inactivació, s'hi va afegir el PMA i el Triton X-100, s'incubaven barrejant bé per afavorir la penetració del intercalant de bases i s'exposaven a llum continua durant 15 minuts en un sistema de fotoactivació. Un cop fet aquest pas, se'n extreia el RNA i es quantificava mitjançant RTqPCR.

També es van sotmetre al mateix experiments mostres contaminades de manera natural de diverses procedències, dos mostres d'aigua del riu Llobregat entre el

2007 i el 2009 i una mostra recollida l'any 2015 a Marrakesh, totes elles havien donat prèviament positiu pel HAV mitjançant RTqPCR ISO.

La mitjana dels nivells d'inactivació de les mostres contaminades artificialment després dels diferents tractaments amb clor i amb calor van ser avaluats tant per assajos TCID₅₀ com diferents assajos moleculars, i es van comparar els resultats obtinguts amb els diferents mètodes. Els assajos moleculars incloïen RTqPCR sense tractament previ, RTqPCR després de tractament amb PMA (PMA-RTqPCR), i RTqPCR després de tractament amb PMA suplementat amb Triton X-100 (PMA/Triton-RTqPCR).

Els resultats obtinguts van ser molt esperançadors, es van detectar reduccions de fins a 3.5 logaritmes de diferència entre les mostres inactivades a 99°C i tractades amb PMA i Triton i les inactivades però igualment tractades amb el PMA i el Triton.

Les dades que reflectien les reduccions de títol obtingudes per RTqPCR van ser majors quan es va incloure el PMA en els assajos amb clor, sobretot a concentracions de 5 i 10 g/L, el que suggereix que la combinació PMA i RTqPCR pot reflectir millor la infectivitat real d'un virus, tot i que estadísticament no va ser diferent de quan vàrem realitzar la RTqPCR sola.

En canvi, en els assajos amb calor, la correlació de les dades obtingudes a partir de la RTqPCR amb l'assaig TCID₅₀ va ser més bona. Sobretot en la condició d'inactivació del virus a 99° C. A més, també vàrem observar que el Triton X-100 millorava la correlació amb la infectivitat quan els virus eren inactivats per calor, diferint només en 1 logaritme dels resultats obtinguts als assajos d'infectivitat.

Per la seva banda, les mostres extretes de fonts naturals com aigua del riu o clavegueres van ser amplificades sense tractament i paral·lelament amb

tractament amb Triton i PMA. Tant sols les mostres recollides al riu mostraven una reducció logarítmica d'1.75 sense haver rebut cap mena d'inactivació, mentre que en les mostres d'aigües residuals la reducció estava al voltant del 0.1.

Paral·lelament les dues mostres d'aigües residuals van ser inactivades 5 minuts a 85°C i es va tornar a fer la quantificació per RTqPCR previ tractament amb Triton i PMA. Tal i com s'esperava, el tractament amb calor va donar com a resultat una reducció dels títols en totes les mostres.

Aquests resultats suggereixen que, mentre que més del 98% dels genomes es van quantificar a l'aigua del riu concentrats no eren infecciosos a causa de danys a la càpsida, la majoria dels genomes detectats a les aigües residuals si que ho eren.

Al llarg d'aquest estudi hem constatat que l'adició de PMA millora la correlació entre la infectivitat i els mètodes moleculars, tant quan el virus és inactivat amb clor lliure com quan s'inactiva amb altes temperatures. La presència del surfactant Triton millora encara més els resultats, sempre i quan, la inactivació sigui per calor.

Per tant, d'aquest estudi en podem extreure les següents conclusions:

- Els experiments amb PMA-RTqPCR són útils per inferir l'eficàcia de la desinfecció del HAV ja que s'han detectat reduccions logarítmiques en la detecció del virus.
- La correlació entre el genoma i el virus infeccios depèn del mètode de desinfecció ja que hem pogut contrastar una major reducció logarítmica en mostres inactivades per calor que en mostres inactivades amb clor lliure.
- Els assajos amb PMA-RTqPCR són aplicables a mostres d'aigua de riu així com a aigües residuals contaminades, fet que fa destacar la gran practicitat del mètode.
- Els assajos realitzats amb PMA-RTqPCR permeten una millor estimació del risc que pot suposar per a la salut un resultat positiu en una mostra d'aigua contaminada.



Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters



Noemí Fuster^{a, b}, Rosa M. Pintó^{a, b}, Cristina Fuentes^{a, b}, Nerea Beguiristain^{a, b}, Albert Bosch^{a, b}, Susana Guix^{a, b, *}

^a Enteric Virus Group, Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), University of Barcelona, Avda Prat de la Riba 171, 08921 Santa Coloma de Gramanet, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2015

Received in revised form

24 May 2016

Accepted 27 May 2016

Available online 28 May 2016

Keywords:

Hepatitis A virus

RTqPCR

Propidium monoazide

Infectivity

Disinfection

Free chlorine

Thermal inactivation

ABSTRACT

The waterborne transmission of hepatitis A virus (HAV), the main cause of acute hepatitis, is well documented. Recently, two ISO proposals for sensitive determination of this pathogen by RTqPCR in water and food have been published (ISO/TS 15216-1 and ISO/TS 15216-2), and could enable the formulation of regulatory standards for viruses in the near future. However, since detected viral genomes do not always correlate with virus infectivity, molecular approaches need to be optimized to better predict infectivity of contaminated samples. Two methods involving the use of propidium monoazide (PMA), with or without Triton X-100, prior to RTqPCR amplification were optimized and adapted to infer the performance of infectious viral inactivation upon two different water treatments: free chlorine and high temperature. Significant correlations between the decrease of genome copies and infectivity were found for both inactivation procedures. The best procedure to infer chlorine inactivation was the PMA-RTqPCR assay, in which 1, 2 or 3-log genome copies reductions corresponded to reductions of infectious viruses of 2.61 ± 0.55 , 3.76 ± 0.53 and 4.92 ± 0.76 logs, respectively. For heat-inactivated viruses, the best method was the PMA/Triton-RTqPCR assay, with a 1, 2 or 3-log genome reduction corresponding to reductions of infectious viruses of 2.15 ± 1.31 , 2.99 ± 0.79 and 3.83 ± 0.70 logs, respectively. Finally, the level of damaged virions was evaluated in distinct types of water naturally contaminated with HAV. While most HAV genomes quantified in sewage corresponded to undamaged capsids, the analysis of a river water sample indicated that more than 98% of viruses were not infectious. Although the PMA/Triton-RTqPCR assay may still overestimate infectivity, it is more reliable than the RTqPCR alone and it seems to be a rapid and cost-effective method that can be applied on different types of water, and that it undeniably provides a more accurate measure of the health risk associated to contaminated waters.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Water is an important source of human exposure to gastroenteric diseases, mainly as a result of the ingestion of fecally contaminated water or food irrigated with it (Bosch et al., 1991, Severi et al., 2015). One of the better characterized waterborne viral pathogen for humans is hepatitis A virus (HAV), which is the etiological agent of the most common type of hepatitis. These

viruses are shed in feces as non-enveloped virus particles containing a positive-sense single-stranded RNA genome. In 2013–14, a huge HAV outbreak affecting over 1500 patients hit Europe due to the consumption of frozen berries (Severi et al., 2015). Although the contamination source has not been determined, such a broad contamination could be suspected in the irrigation water. Recently, two ISO proposals for sensitive and quantitative determination of HAV in water and several food matrices have been published and could enable the formulation of regulatory standards for viruses in the near future (ISO/TS15216-1 and 2, 2013). These methods are based on real time reverse transcription quantitative PCR (RTqPCR), which is fast and extremely sensitive, but since detected viral genomes are not always indicative of virus infectivity, molecular

* Corresponding author. Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: susanaguix@ub.edu (S. Guix).

approaches need to be optimized to better predict infectivity of contaminated samples. Although HAV cell-culture adapted strains are available, unfortunately wildtype viruses are extremely difficult to grow *in vitro* and infectivity assays in cell culture are not available for their detection in water.

Common procedures for water disinfection include chlorine and heat treatment, but the inability of molecular tests to distinguish between inactivated and infectious virions has hampered the assessment of the efficiency of disinfection methods. In the last years, several reports have recommended the use of fluorescent dyes such as ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) for the live-dead differentiation in molecular tests (Elizaquível et al., 2014). These dyes enter damaged viral capsids and bind to double-stranded nucleic acid after a photo-activation step, thus preventing RNA retrotranscription and further amplification by RTqPCR. However, the efficacy of the treatment depends on the target virus as well as the disinfection procedure (Karim et al., 2015; Kim et al., 2011; Leifels et al., 2015; Parshionikar et al., 2010). Factors such as the degree of secondary structure present within the target RTqPCR region, its level of interaction and protection by capsid proteins, or the mechanical stability or plasticity of the viral capsid may explain why the efficiency of EMA/PMA-RTqPCR methods varies among viral targets and inactivation mechanisms. However, few studies have addressed the applicability of these methods on water (Moreno et al., 2015; Parshionikar et al., 2010).

The main goal of our study was to develop a PMA/RTqPCR quantitation method to be used as a tool to infer the performance of different disinfection procedures, in correlation with the reduction of infectious titers. Several PMA concentrations were tested, and the effect of Triton X-100 was studied because it has been previously shown to enhance PMA action (Coudray-Meunier et al., 2013; Moreno et al., 2015). HAV was selected because it is highly stable in the environment and particularly resistant to disinfectants and heating (Abad et al. 1994, 1997; Fraisse et al., 2011; Sow et al., 2011). As a disinfection method, we used free chlorine, which alters the viral capsid but which have also been reported to damage specific genomic regions (Li et al., 2002), and heat treatment at temperatures over 70 °C, which mainly affects virus capsid (Costafreda et al., 2014). Viral inactivation experiments were performed on water containing high levels of chloride salts to simulate river waters from our geographic area in the Mediterranean coast of Spain, which frequently show high salinity, and which may be a source of contamination when used to irrigate crops. Additionally, naturally contaminated water samples were analyzed to assess the applicability of the method on real matrices.

2. Methods

2.1. Cell line, virus propagation and titration

The cell-adapted cytopathogenic pHM175 43c strain of HAV (kindly provided by T. Cromeans, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) was grown in FRhK-4 cells as previously described (Aragones et al., 2008). Inactivated viruses and control viruses were titrated by TCID₅₀ in the same cell line as previously described (Costafreda et al., 2014).

2.2. Hypochlorite inactivation treatment

Virus stocks were suspended at 1×10^6 TCID₅₀/ml in 3-ml aliquots in water with a chloride concentration of around 8 g/L. Sodium hypochlorite was added to achieve an initial concentration of free chlorine (FC) of 0, 2.5, 5 and 10 mg/L, and samples were incubated for 30 min at room temperature (RT). FC was measured

by the DPD (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine sulfate) method using a portable photometer (HI 96734, HANNA Instruments). Each experiment included 2 replicas for each condition, and each condition was tested in at least 3 different experiments. After inactivation, 1% thiosulfate was added to neutralize FC. Viral inactivation was examined by measuring the loss of infectivity by determination of the TCID₅₀ and by examining the loss of genome copy titers by PMA-RTqPCR.

2.3. Heat treatment

Viruses were suspended at 1×10^6 TCID₅₀/ml in 3-ml aliquots in water with a chloride concentration of around 8 g/L, and incubated at 70 °C, 85 °C and 99 °C for 5 min. Aliquots of virus suspensions were kept at RT and used as controls. Each experiment included 2 replicas for each condition. As above, viral inactivation was examined by measuring the loss of infectivity using the TCID₅₀ assay and by the loss of genome copy titers by PMA-RTqPCR assays.

2.4. Propidium monoazide (PMA) RTqPCR assay

PMA solution (GenIUL, Spain) was dissolved in water and added to each sample at the concentrations ranging from 0 to 200 μM. When indicated, 0.5% Triton X-100 (Panreac) was added. Samples were incubated in the dark during 5 min at RT with shaking to allow reagent penetration. Then, samples were exposed to light for 15 min using a continuous light in a photo-activation system (Led-Active Blue, Geniul, Spain). After cross-linking, RNA was extracted using the NucleoSpin[®] RNA virus kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Duren, Germany) according to the manufacturer's instructions. HAV genome copies were titrated by one-step RTqPCR assay using the RNA UltraSense One-Step quantitative system (Invitrogen SA) and the Stratagene Mx3000P system following the standardized ISO guidelines (ISO/TS15216-1 and 2, 2013). The set of primers and probe used target the 5' non coding region (5'NCR) of the HAV genome and have been previously validated (Costafreda et al., 2006; Pintó et al., 2009). Forward primers, reverse primer and probe concentrations were 500 nM, 900 nM and 250 nM, respectively. Cycling parameters were 1 h at 55 °C followed by 5 min at 95 °C, and 45 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 65 °C. Non PMA-treated samples were quantified in parallel.

2.5. Analysis of naturally contaminated water samples

Concentrated water samples from a previous survey conducted along the Llobregat river catchment in Spain between 2007 and 2009 (Pérez-Sautu et al., 2012) which had tested positive for HAV were analyzed: a freshwater concentrate (S3-Nov07) and an untreated sewage concentrate (S5-Apr09). In addition, a sewage sample collected from the municipal wastewater treatment plant of Marrakesh in August 2015 was concentrated and analyzed. The freshwater sample was concentrated from 10 L by filtration through positively charged glass wool and polyethylene glycol (PEG) precipitation, and the untreated sewage samples were concentrated by PEG precipitation using a starting volume of 0.6 L (Pérez-Sautu et al., 2012). RTqPCR assays supplemented or not with PMA and Triton X-100 were performed as described above, and a process control virus (mengovirus) and an external control were included to monitor extraction and RTqPCR efficiencies following the ISO guidelines. Quantifications were repeated at least in duplicate.

2.6. Statistical analysis

All inactivation experiments were performed at least in triplicate. Comparisons between means were performed using the

student t-test (unpaired) using the IBM SPSS® Statistics version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Correlation analyses between the level of inactivation measured by the infectivity assay and the molecular assays were performed using Microsoft Excel 2010. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. PMA-RTqPCR assay development

In order to establish the optimal conditions for the PMA-RTqPCR assay, HAV suspensions at a concentration of 10^5 TCID₅₀/ml were completely inactivated by incubation with 10 mg/L of free chlorine for 30 min at RT, and samples were incubated at 0, 25, 100 or 200 μ M of PMA and irradiated using continuous light. Results shown in Table 1 indicate that the use of PMA at 200 μ M provided significantly higher differences between infectious and inactivated viruses ($p < 0.05$).

3.2. Monitoring HAV inactivation by PMA-RTqPCR assays

Average levels of inactivation after different chlorine and heat treatments were evaluated both by TCID₅₀ assays and by several molecular assays, and compared (Fig. 1). Molecular assays included RTqPCR alone, RTqPCR after PMA treatment at the optimized conditions (PMA-RTqPCR), and RTqPCR after PMA treatment supplemented with Triton X-100 (PMA/Triton-RTqPCR). In the infectivity assays, no cytotoxicity was observed on FRhK-4 cells due to the use of FC and thiosulfate during the inactivation process (data not shown). Since treatment of samples with PMA did not significantly reduce infectivity (Fig. S1; $p = 0.108$), TCID₅₀ titers shown in Fig. 1 correspond to samples which had been inactivated but which had not been treated with PMA. On RTqPCR assays, process control virus recoveries and percentages of RTqPCR inhibitions were valid in all cases according to the ISO criteria and were similar between samples (data not shown). A 2.5 mg/L FC dose only affected the infectious titer with a reduction of 1.34 ± 0.45 log (Fig. 1A). No effects were observed in any of the genome copy numbers calculated by RTqPCR alone, PMA-RTqPCR or PMA/Triton-RTqPCR. With higher doses including 5 and 10 mg/L of FC, infectivity was reduced over 4.5 logs, and in most cases viral titers decreased below the detection limit. As expected, due to the specific damage of FC on the 5' end of the HAV genome (Li et al., 2002), genome titers obtained by RTqPCR alone were already significantly lower at 5 and 10 mg/L of FC ($p < 0.05$) compared to untreated controls. Average log reductions obtained by molecular tests were higher when PMA was included, suggesting that PMA-RTqPCR may better reflect infectivity although differences were not statistically different from RTqPCR alone. Neither did addition of Triton X-100 enhance titer reduction (Fig. 1A).

After treatment at 70 °C, infectivity was reduced 2.48 ± 1.30 logs (Fig. 1B). Treatment at 85 °C and 99 °C resulted in losses of 3.58 ± 0.32 and 4.50 ± 0.58 logs, respectively. Despite this high effect on infectivity, RTqPCR alone only measured a reduction lower than 1 log in all cases. PMA-RTqPCR assay resulted in reductions of

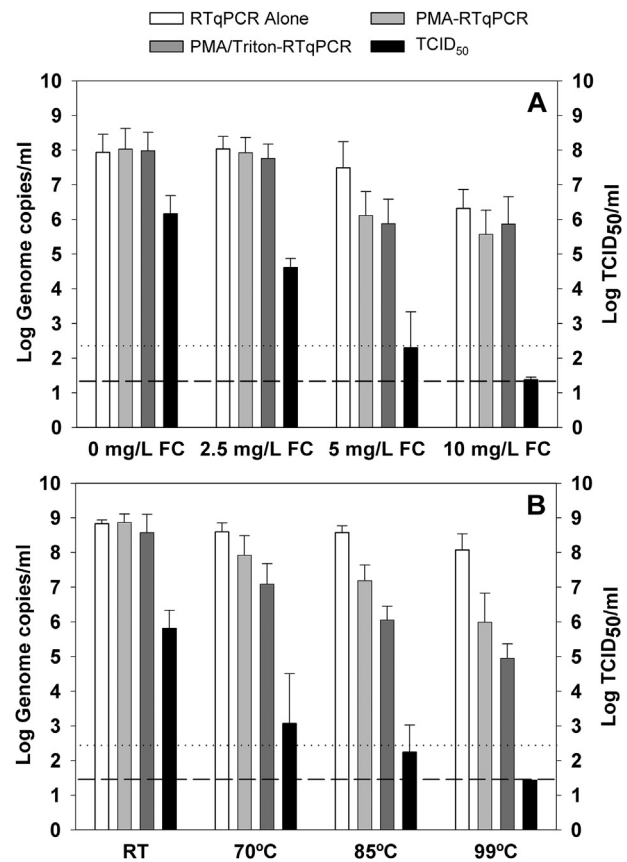


Fig. 1. Inactivation of HAV by free chlorine treatment (A) and high temperature (B), as determined by molecular (RTqPCR alone, PMA-RTqPCR and PMA/Triton-RTqPCR) and infectivity methods (TCID₅₀). Titers are expressed as average \pm standard deviation. Dashed lines indicate the detection limit for the TCID₅₀ assay. Dotted lines indicate the detection limit for the molecular assays. Experiments were performed at least in triplicate.

0.86 ± 0.36 , 1.79 ± 0.36 and 2.87 ± 0.84 logs at 70 °C, 85 °C and 99 °C, respectively. Of note, PMA-RTqPCR assays combined with Triton X-100 performed better, resulting in log reductions of 1.46 ± 0.10 , 2.81 ± 0.38 and 3.63 ± 0.48 , which only differ in less than 1 log with TCID₅₀ log reductions at the 3 assayed temperatures. Interestingly, when looking at the strongest inactivation treatments (30 min at 10 mg/L FC and 5 min at 99 °C), log reductions obtained by RTqPCR alone were markedly higher for FC (1.90 ± 0.87) compared to high temperature (0.76 ± 0.37).

As an additional approach to estimate correlation between molecular and infectivity methods, an analysis on the average ratio of genome copies versus infectious viruses was also performed (Fig. 2). As expected, these ratios were high when using RTqPCR alone in all cases. The addition of PMA resulted in a ratio reduction, although it was only significant when viruses were inactivated by temperatures of 99 °C (Fig. 2B). As observed before, Triton X-100 improved correlation with infectivity only when viruses were

Table 1
Quantification by RTqPCR after PMA treatment at 25, 100 or 200 μ M in infectious and inactivated HAV suspensions inactivated by free chlorine (average \pm standard deviation, $n = 3$).

PMA concentration (μ M)	Infectious HAV (Log genome copies/ml)	Inactivated HAV (Log genome copies/ml)	Log reduction ^a
25	8.33 ± 0.27	5.66 ± 0.34	2.67 ± 0.43
100	7.78 ± 0.40	4.83 ± 0.23	2.95 ± 0.46
200	8.39 ± 0.18	4.79 ± 0.38	$3.59 \pm 0.43^*$

^a Reduction in titers obtained between inactivated viruses before and after PMA treatment. ANOVA test (* $p < 0.05$).

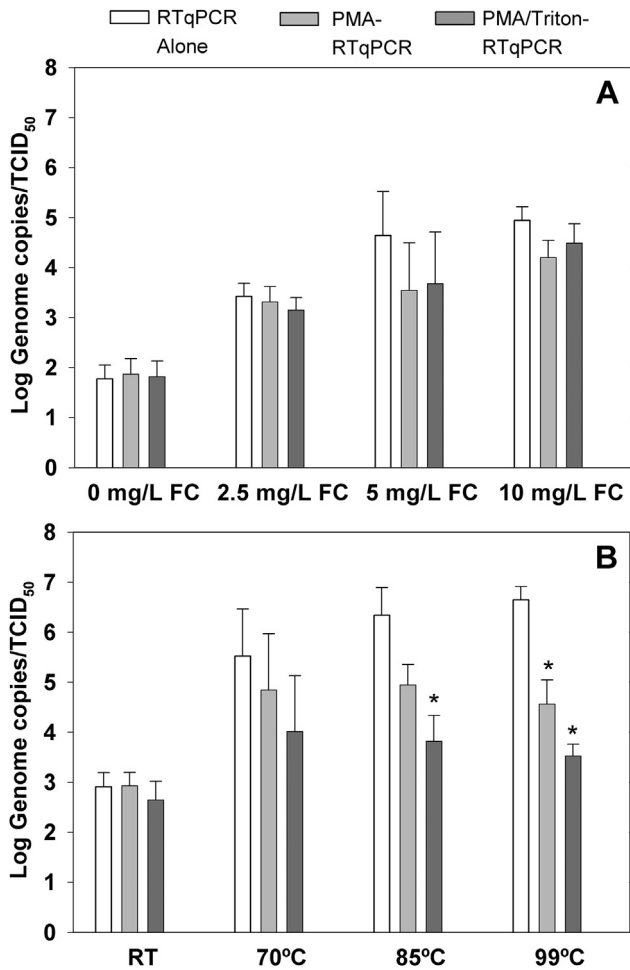


Fig. 2. Average log ratio of genome copies and TCID₅₀ titers obtained by RTqPCR alone, PMA-RTqPCR and PMA/Triton-RTqPCR after inactivation by free chlorine (A) and heat treatment (B). Data are represented as mean values \pm standard error. Asterisks indicate statistically significant differences compared to the ratio obtained by RTqPCR alone (*t*-test; $p < 0.05$).

inactivated by heat.

To assess with a higher precision the correlation between molecular and infectious measurements, linear regression analyses were performed using all data pairs. Linear regression analysis provides a better way to estimate correlation between the two variables over the wide range of inactivation levels than mean comparison. Since the ratio between infectious particles and genome copies may vary depending on the particular virus stock used for the experiments and could also be different in wildtype isolates, correlation analyses were performed for the log reductions achieved by the inactivation treatment. Individual data pairs were modeled using linear predictor functions and all pairs were considered valid after standardized residual analysis to identify outliers. The correlation between the infectious log reduction and the log reductions obtained by the applied molecular tests (RTqPCR alone, PMA-RTqPCR and PMA/Triton-RTqPCR) for HAV inactivated by FC is shown in Fig. 3A, 3C and 3E, respectively. The linear correlation was statistically significant in all cases but higher for the PMA-RTqPCR assay, with a correlation of 0.884 (p value 5.99×10^{-5}). Again, a significant correlation was also observed between RTqPCR alone and infectivity (Fig. 3A) due to the fact that FC specifically damages the 5' end of the HAV genome (Li et al., 2002), but the analysis of covariance used to compare slopes

from different regression lines indicated significant differences between slopes from RTqPCR alone and PMA-RTqPCR for free chlorine inactivation ($p = 0.024$; Fig. 3A and C). Added to the fact that the slope of PMA-RTqPCR is closer to 1, these results indicate that PMA significantly improves correlation between genome copy reduction and infectious titer reduction when viruses are inactivated by FC.

Correlation analysis between infectivity and molecular log reductions for heat-inactivated HAV is shown in Fig. 3B, D and F. Correlation was only significant when PMA/Triton-RTqPCR assay was used (p value of 0.024). Thus, while viral inactivation by chlorine treatment could be better estimated by the PMA-RTqPCR assay (Fig. 3C), inactivation by high temperature was better estimated by the PMA/Triton-RTqPCR assay (Fig. 3F), confirming that addition of the surfactant was especially helpful to discriminate inactivated viruses damaged by heat. Analysis of covariance also confirmed significant differences between slopes from RTqPCR alone and PMA/Triton-RTqPCR for heat treatment ($p = 0.033$; Fig. 3B and F).

In conclusion, addition of PMA improved correlation between infectivity and molecular tests both for chlorine and heat-inactivated viruses, and it was more effective in the presence of the surfactant agent only for heat-inactivated viruses. Our linear regression analyses show that molecular methods including PMA pre-treatment may be used to estimate the performance of disinfection treatments, but it should be taken into account that correlation depends on the mechanism of inactivation. For example, for chlorine-inactivated viruses, a 1, 2 or 3-log reduction in the PMA-RTqPCR assay would correspond to reductions of infectious viruses of 2.61 ± 0.55 , 3.76 ± 0.53 and 4.92 ± 0.76 logs, respectively. For heat-inactivated viruses, a 1, 2 or 3-log reduction in the PMA/Triton-RTqPCR assay would correspond to reductions of infectious viruses of 2.15 ± 1.31 , 2.99 ± 0.79 and 3.83 ± 0.70 logs, respectively.

3.3. Use of PMA-RTqPCR assays on naturally contaminated water samples

In order to confirm the applicability of the PMA/Triton-RTqPCR assay on real water matrices, the developed method was tested using contaminated samples. We used 2 archived naturally contaminated water samples from a study conducted in 2007 (a river water sample and a sewage sample), and a fresh sewage sample collected at the time of the study. Since Triton X-100 contributed to the discrimination of viruses inactivated by high temperature and it was not detrimental in discriminating chlorine-inactivated viruses, we decided its inclusion in the assay. Samples were titrated with and without PMA/Triton treatment in parallel. The percentage of viruses with damaged capsids may be calculated comparing quantification data from the RTqPCR and the PMA/Triton-RTqPCR assay using the following formula: % viruses with damaged capsids = $100 - [(\text{genome copies/L PMA/Triton-RTqPCR}) / (\text{genome copies/L RTqPCR alone}) \times 100]$. Results from the analysis of 3 HAV positive samples are shown in Table 2. Each sample was quantified at least twice. While treatment with PMA/Triton reduced HAV genome copy numbers 1.75 ± 0.48 logs in the river water sample, the titer difference for the two analyzed sewage samples was very low. In order to confirm that PMA/Triton treatment was able to reduce the signal of inactivated viruses in sewage concentrates, parallel aliquot samples were heated for 5 min at 85 °C before quantification. As expected, heat treatment resulted in a reduction of titer in all samples (Table 2). These results suggest that while more than 98% of genomes quantified in the river water concentrate were not infectious due to capsid damage, most genomes detected in sewage are likely to be infectious.

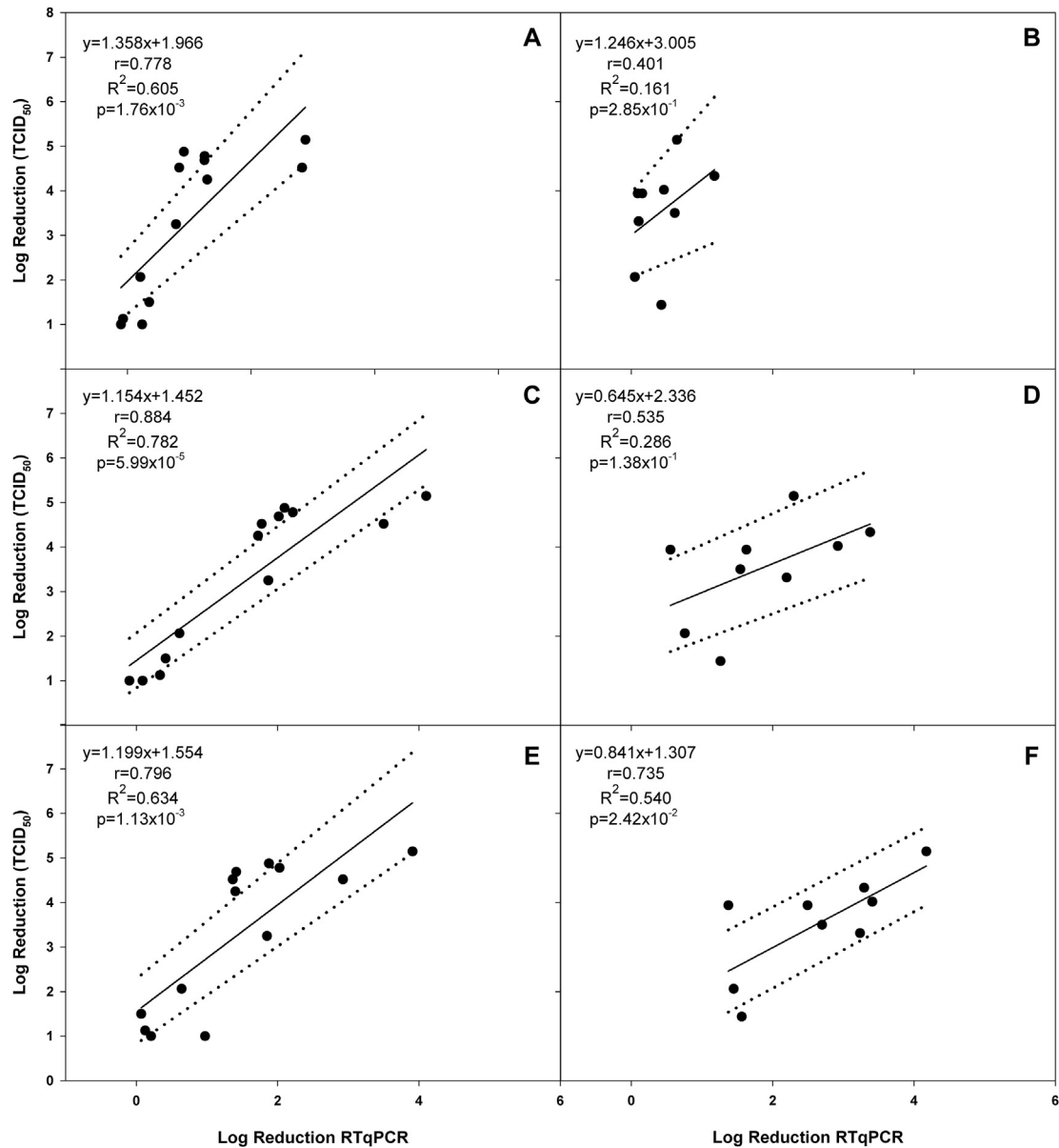


Fig. 3. Linear regression analysis between infectivity and RTqPCR log reductions for HAV inactivated by FC (panels A, C and E) and high temperature (panels B, D and F). Correlation analyses were performed between the reduction of infectivity and the reduction of genome copies by RTqPCR alone (panels A and B), PMA-RTqPCR (panels C and D) and PMA/Triton-RTqPCR (panels E and F). Equations, r , R^2 and p values are shown for each plot. Dashed lines indicate 95% confidence intervals.

Table 2

Quantification of HAV present in naturally contaminated water samples by RTqPCR alone, and PMA/Triton RTqPCR assays (average \pm standard deviation, $n = 2-3$).

Sample	Treatment	RTqPCR alone (log genome copies/L)	PMA/Triton-RTqPCR (log genome copies/L)	Log reduction ^a
River water S3 Nov07	Untreated	3.12 \pm 0.27	1.37 \pm 0.21	1.75 \pm 0.48
	5 min at 85 °C	NT	NT	NT
Wastewater S5 Apr09	Untreated	5.46 \pm 0.99	5.35 \pm 0.77	0.11 \pm 0.23
	5 min at 85 °C	5.79 \pm 0.40	4.55 \pm 0.23	1.49 \pm 0.28
Wastewater M1 Aug15	Untreated	5.16 \pm 0.11	5.32 \pm 0.11	-0.16 \pm 0.23
	5 min at 85 °C	4.65 \pm 0.33	$\leq 3.42 \pm 0.0$	$\geq 1.23 \pm 0.33$

NT: Not tested.

^a Log reduction in titer compared to RTqPCR alone.

4. Discussion

One of the main challenges in public health is the evaluation of risks associated with water samples that are positive for viruses by

a molecular assay. Availability of sensitive culture-independent molecular tests that correlate with infectious titers will be a key step in risk assessment studies, especially for non-cultivable pathogenic viruses such as HAV. Molecular methods that measure

capsid integrity, such as the use of intercalating dyes prior to RTqPCR, have been explored by different laboratories (Karim et al., 2015; Moreno et al., 2015; Parshionikar et al., 2010), and it seems that there is no universal pattern of behaviour. In this study we have examined the correlation of two different PMA-RTqPCR assays (with and without Triton X-100) with the infectious titer of HAV after inactivation by FC and high temperature. Our results confirm the observation that both treatments lead to capsid damage allowing PMA penetration and show that correlation between infectivity assays and molecular tests depends on the mechanisms of virus inactivation. Indeed, heat inactivation at temperatures higher than 40 °C mainly affects virus capsids and FC has been shown to target both the capsid and the genome (Costafreda et al., 2014; Li et al., 2002). For HAV, inactivation by chlorine at high doses has been reported to be due to the loss of the 5'NCR of the viral genome (Li et al., 2002), and our results are consistent with these observations. When HAV was inactivated by FC, correlation between TCID₅₀ and RTqPCR was statistically significant even in the absence of PMA pretreatment, confirming that free chlorine does degrade the target region of the RTqPCR assay located at the 5'NCR of the genome.

In our study, for PMA-RTqPCR assays without Triton X-100, better correlations were observed for viruses inactivated by FC than by heat, and addition of Triton X-100 only improved PMA performance when viruses were thermally denaturated but not when they were oxidized by FC. Other studies using PMA assays without Triton X-100 have also described worse performance on other heat-inactivated viruses, compared to other inactivation mechanisms (Karim et al., 2015; Leifels et al., 2015; Parshionikar et al., 2010), and addition of Triton X-100 has been shown to improve discrimination of infectious HAV after heat inactivation (Coudray-Meunier et al., 2013; Moreno et al., 2015). However, the effect of Triton X-100 had not yet been assessed on other inactivation processes different from heat. The molecular bases for the differential effect of Triton X-100 observed depending on the inactivation mechanisms are unclear. Since PMA requires double-stranded or structured nucleic acids for binding, its binding to nucleic acids may be less efficient when viruses are inactivated by heat due to denaturation of stable secondary structures present within genomes. In this type of samples, Triton X-100 and other surfactants may facilitate reannealing of RNA secondary structures on genomic regions, which are essential for PMA covalent binding.

Overall, despite significant correlations found between log reductions of infectious titers and genome copy titers, it seems that PMA-RTqPCR assays cannot completely prevent amplification and detection of inactivated viruses. In our hands, despite the high level of viral inactivation, we did not get any RTqPCR result with a genome copy titer below the limit of detection of the assay (2.30 logs genome copies/ml and 1.43 logs TCID₅₀/ml) in any of the experiments performed, highlighting the fact that molecular PMA assays are likely to overestimate virus infectivity. Since treatment of purified HAV RNA with PMA completely abolishes RTqPCR signal (data not shown), it seems that this limitation is not due to the stoichiometric ratio between genome copies and dye molecule, neither of the degree of secondary structures within the target region. PMA assays with modified pH or after supplementation with nucleic acid hexamers to induce the formation of double-stranded regions have been performed in our laboratory and did not provide any improvement on the procedure (data not shown). Whether PMA entry into damaged particles may be hindered by viral aggregation, or by capsid lack of plasticity and flexibility remains to be elucidated. In addition, it is also possible that viral capsids suffer structural alterations that render them non-infectious without

causing holes through which intercalator molecules can get inside. More than likely, the population of inactivated viruses is not homogeneous.

In summary, our study shows that although PMA-RTqPCR assays are not a perfect tool to directly predict the concentration of infectious viruses, they are useful in inferring the efficiency of several water treatments on infectious virus removal. Linear correlations may be employed as a culture-independent tool to estimate the level of disinfection reached upon a certain inactivation process. Thus, for example, for chlorine-inactivation, a 1, 2 or 3-log reduction in the PMA-RTqPCR assay corresponds to reductions of infectious viruses of 2.61 ± 0.55 , 3.76 ± 0.53 and 4.92 ± 0.76 logs, respectively. For heat-inactivated viruses, a 1, 2 or 3-log reduction in the PMA/Triton-RTqPCR assay corresponds to reductions of infectious viruses of 2.15 ± 1.31 , 2.99 ± 0.79 and 3.83 ± 0.70 logs, respectively.

In addition, we have confirmed the applicability of PMA assays to estimate the proportion of “non-infectious” viruses present in naturally contaminated water samples. We demonstrate that PMA/Triton-RTqPCR assays are suitable for the analysis of naturally contaminated water samples of different kinds without further sample dilution, providing a better estimation of the infectious titer. An additional advantage of applying PMA-RTqPCR tests on water samples is that PMA may prevent amplification of non-specific free nucleic acids. Due to the scarcity of water samples naturally contaminated with HAV in our area, two of the analyzed samples came from a previous study that had been archived at –80 °C for 5–7 years (Pérez-Sautu et al., 2012), and although HAV capsids have been shown to be highly stable (Costafreda et al., 2014), the levels of damaged virions may have been modified during storage. Although our results suggest that the percentage of non-infectious HAV, and the resulting risk for humans, may be significantly different between the different types of analyzed water samples, the possibility that the long storage time has affected the capsid stability of viruses contaminating the river water sample cannot be completely ruled out.

In conclusion, although PMA-RTqPCR assays may still overestimate the amount of infectious viruses, acknowledging that a certain percentage of viral genomes present in water are not infectious due to capsid damage undeniably provides a better assessment of the associated risk. This may be highly relevant in outbreak situations in which a waterborne origin is suspected.

5. Conclusions

- The treatment of samples with PMA prior to RTqPCR amplification may be used to infer the performance of HAV disinfection treatments.
- Addition of Triton enhances correlation with infectivity for heat-inactivated viruses, but not for free chlorine inactivated viruses.
- Despite the positive effect of Triton may not be universal, the potential use of PMA/Triton-RTqPCR assays as a horizontal method to monitor a reduction in virus infectivity is promising.
- PMA/Triton-RTqPCR assays may be used as a refinement for a better estimation of the concentration of infectious particles in naturally contaminated waters.
- Accurate quantification of intact viruses present in water will be of enormous value in performing and interpreting quantitative risk assessment studies.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

Funding information

This work was supported in part by projects BIO2014-53285 (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain) and XRB-Biotechnology Reference Network (Generalitat de Catalunya), and Food-FP7-311846 (European Union). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgments

We are indebted to Dr Mohamed Farissi at the Sultan Moulay Sliman University, Morocco, for supplying water samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.086>.

References

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Bosch, A., 1997. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol. Lett.* 156 (1), 107–111.
- Abad, F.X., Pintó, R.M., Diez, J.M., Bosch, A., 1994. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7), 2377–2383.
- Aragones, L., Bosch, A., Pintó, R.M., 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82 (4), 1688–1700.
- Bosch, A., Lucena, F., Diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J., 1991. Waterborne viruses associated with a hepatitis outbreak. *J. Am. Water Works Ass.* 83, 80–83.
- Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6), 3846–3855.
- Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F.J., D'Andrea, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R.M., 2014. Hepatitis A virus adaptation to cellular shutoff is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *J. Virol.* 88 (9), 5029–5041.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latit, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiol.* 13, 216.
- Elizaquível, P., Aznar, R., Sánchez, G., 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J. Appl. Microbiol.* 116 (1), 1–13.
- Fraisse, A., Temmam, S., Deboosere, N., Guillier, L., Delobel, A., Maris, P., Vialette, M., Morin, T., Perelle, S., 2011. Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 151 (1), 98–104.
- ISO/TS15216-1 and 2, 2013. *Norovirus and Hepatitis A Virus Analyses from Food and Animal Feed.*
- Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J. Virol. Methods* 219, 51–61.
- Kim, K., Kitajima, K.H., Tohya, M., Ohgaki, S. Y., 2011. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Sci. Technol.* 63 (3).
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218 (8), 686–693.
- Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10), 4951–4955.
- Moreno, L., Aznar, R., Sánchez, G., 2015. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 201, 1–6.
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4318–4326.
- Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R.M., Bosch, A., 2012. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment. Spain. *Environ. Microbiol.* 14 (2), 494–502.
- Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23), 7350–7355.
- Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B.R., Faber, M., Sundqvist, L., Rimhanen-Finne, R., Roque-Afonso, A.M., Ngui, S.L., Allerberger, F., Baumann-Popczyk, A., Muller, L., Parmakova, K., Alfonsi, V., Tavoschi, L., Vennema, H., Fitzgerald, M., Myrmet, M., Gertler, M., Ederth, J., Kontio, M., Vanbockstael, C., Mandal, S., Sadkowska-Todys, M., Tosti, M.E., Schimmer, B., O'Gorman, J., Stene-Johansen, K., Wenzel, J.J., Jones, G., Balogun, K., Ciccaglione, A.R., O'Connor, L., Vold, L., Takkinen, J., Rizzo, C., 2015. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Euro Surveill.* 20 (29), 21192.
- Sow, H., Desbiens, M., Morales-Rayas, R., Ngazoa, S.E., Jean, J., 2011. Heat inactivation of hepatitis A virus and a norovirus surrogate in soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Foodborne Pathog. Dis.* 8 (3), 387–393.

DISCUSSIÓ

El canvi climàtic està afectant tots els aspectes de la vida al planeta especialment sobre els recursos hídrics i l'accés a aigua potable, principalment als 2.200 milions de persones que a dia d'avui no tenen accés diari a una font segura d'aigua potable. Aquest fet pot significar la diferència entre salut o malaltia, entre prosperar o amb prou feines sobreviure. L'aigua és un bé escàs i des de principi de desembre del 2019 aquest recurs, o més exactament els seus drets d'ús, cotitzen en la borsa en base a l'índex Nasdaq Veles California Water (NQH2O) amb l'objectiu principal de regular-ne el seu ús.

Segons l'Informe Mundial de les Nacions Unides sobre el Desenvolupament dels Recursos Hídrics 2020, a més dels problemes derivats del canvi climàtic, també assenyala que l'ús global de l'aigua s'ha multiplicat per 6 els últims 100 anys i continua augmentant a un ritme constant de l'1% anual, degut al desenvolupament econòmic, el creixement demogràfic i el canvi de patrons de consum (157).

Aquest escenari de futur dificulta el compliment dels Objectius de Desenvolupament Sostenible marcats en l'agenda 2030 de les Nacions Unides, especialment l'objectiu numero 6 que busca garantir l'accés universal a l'aigua potable.

L'aigua contaminada o un sanejament deficient estan relacionats amb la transmissió de malalties a través d'agents patògens. Una gran varietat de virus entèrics que afecten a humans poden ser trobats en aliments i aigua contaminada. Malgrat unes poques excepcions, els millors caracteritzats com a brots deguts a aliments contaminats amb virus són el virus de l'hepatitis A i els norovirus.

El virus de l'hepatitis A, que és l'agent etiològic de l'hepatitis més comú, arriba a l'aigua a través de les femtes d'una persona infectada, i seguint la via de

transmissió fecal-oral duu a terme la infecció quan una persona sana ingereix directament l'aigua o els aliments irrigats amb aquella aigua contaminada. La determinació de quina quantitat de virus hi ha en una mostra d'aliment o d'aigua és crucial per a determinar el grau de risc que suposa el seu consum, així com saber discernir entre genomes detectats i partícules víriques infectives.

Actualment disposem de dues propostes d'ISO (ISO 15216-1:2017 i ISO 15216-2:2019) per a la determinació quantitativa del HAV en aigua i en diferents matrius alimentaries que permetran la formulació d'estàndards reguladors per al virus de l'hepatitis A. Aquests mètodes estan basats RTqPCR, una tècnica ràpida i molt sensible, però que malauradament no pot inferir la infectivitat d'un virus com podria fer-ho la infecció d'un cultiu cel·lular adient, que actualment no existeix per a la soca salvatge del HAV.

Per la seva banda els norovirus humans són la causa més freqüent de casos epidèmics i esporàdics de gastroenteritis aguda a tot el món, i la principal causa de gastroenteritis transmesa pels aliments. Un cop aconseguida la vacuna contra el rotavirus, els norovirus s'han convertit en el patògen predominant en trastorns gastrointestinal, especialment en infants (158).

Els brots associats a aigua de beguda són menys freqüents que els transmesos per aliments, sobretot en països industrialitzats. No obstant, s'han descrit brots per consum d'aigües de fonts, de pous o algunes d'aigua embotellada (159) (80) i alguns relacionats amb aigües recreatives. Alguns estudis suggereixen que les soques de GI s'associen amb major freqüència amb els brots hídrics que GII (160).

No obstant, molts dels virus que causen brots alimentaris són difícils, o fins i tot impossibles, de replicar en cultiu cel·lular a dia d'avui. Per aquest motiu són de vital importància els mètodes moleculars (146).

La Direcció General de Salut i Seguretat Alimentària de la Comissió Europea (12655/2012), complint l'article 15 de la regulació nº 882/2004 ha implementat el monitoratge dels norovirus humans i del virus de l'hepatitis A en algunes importacions d'aliments seguint la metodologia estandarditzada del CEN (ISO 15216-1:2017 i la ISO 15216-2:2019). Malauradament l'aplicació d'aquest protocol en la monitorització regular d'aliments implica una gran despesa de temps i de recursos econòmics en haver-se proposat inicialment un assaig per cada un dels virus esmentats.

És per aquest motiu que vàrem treballar en l'optimització d'una RTqPCR multiplex que pogués detectar diferents virus entèrics simultàniament, concretament el HAV i norovirus GI i GII, així com el mengovirus emprat com a control de procés. La metodologia CEN està oberta a la utilització de diferents sets de sondes i primers sempre que tinguin com a diana el 5' NCR del HAV i la unió entre l'ORF1 i l'ORF2 dels norovirus GI i GII. Tot i això, no deixava de ser un repte aconseguir una òptima detecció de tots quatre virus obtenint una sensibilitat que fos acceptable. Fins aleshores, la informació que teníem de multiplex semblants per a la detecció del HAV i norovirus però no incloïen virus control (161), el que feia menys acurat a l'hora d'inferir, mitjançant les correccions pertinents, la quantitat de virus inicial a la mostra. Hi ha altres assajos que sí que incloïen virus control però no hi estaven representats els virus que nosaltres busquem detectar (162) (163) (164). Sabíem per estudis anteriors (165) (163) que a major numero de virus diana major seria límit de detecció i menor la sensibilitat de l'assaig, en comparació amb la

realització de RTqPCR monoplex per cada un dels virus. No obstant, la balança es seguia inclinant cap a la multiplex si aconseguíem poder fer d'un sol assaig la detecció dels virus més importants causants de brots alimentaris en una mateixa mostra.

Així doncs ens enfrontàvem a possibles competències entre les diferents dianes, a baixes sensibilitats amb límits de detecció tan alts que no haguessin fet útil aquest assaig.

Tot i que és complex, el que ja demostraven altres autors de la pèrdua del límit teòric de detecció de les multiplex respecte a les monoplex, en el nostre cas sobretot amb el HAV i norovirus GI, ens mantenim dintre del rang d'altres assaigs tríplex i quàdruplex descrits per diferents autors (166)(167). A més, com a norma general, en mostres d'aigua i aliments, sovint s'observa una pèrdua mitjana de 0.43 còpies del genoma entre els assaigs monoplex i els quàdruplex, independentment del virus que es vulguin detectar i del nombre de còpies presents.

Malgrat la pèrdua de sensibilitat esmentada, aquest assaig va suposar un estalvi de reactius en comparació a la monoplex. Seguint el protocol ISO per a que el resultat obtingut tingui més robustesa, cada mostra s'ha d'assajar dos cops, això significa dos reaccions de la placa de multiplex o bé 8 reaccions en la placa de monoplex. A més, cada mostra cal afegir-la amb una dilució 1/10 per duplicat per a detectar possibles inhibicions que pugui contenir la matriu alimentaria. De nou, serien 2 reaccions més a la multiplex i 8 reaccions més per la monoplex. Per tant, suposaria un gran estalvi en reactius i aigua purificada i desionitzada, a més del estalvi en temps que suposa per al personal que realitza l'assaig. Si hi afegim, el control de procés, el control extern i les corbes estàndard que recomana el CEN,

l'assaig quàdruplex representa un estalvi del 30% en comparació amb el monoplex, ja que es necessiten 65 per l'assaig de monoplex i 43 reaccions per a l'assaig de multiplex. Així doncs, aquesta eina esdevenia una alternativa específica i sensible als mètodes de cultiu cel·lular i la immunofluorescència, tècniques amb un cost econòmic important. Altrament, també aconseguíem restar molt de temps en l'obtenció de resultats en la detecció d'aquests virus en mostres d'aliments i aigua. No obstant, els mètodes moleculars tenen una greu limitació, la incapacitat de discriminar entre virus que són infecciosos i virus que han estat inactivats i no representen un perill per a la salut humana.

Per tant, a més de la millora de les tècniques moleculars per a la detecció de virus entèrics, també es va treballar en la millora de la inferència de la infectivitat en aquelles mostres que per mètodes moleculars haguessin donat positives. Ressaltant la importància de tenir una bona correlació en el numero de còpies víriques detectades per mètodes moleculars com els que acabem de veure i infectivitat. Degut a que els virus entèrics són considerablement més resistents als diversos tractaments de l'aigua que els bacteris coliforms, destaca doncs l'interès pels processos de tractament de l'aigua amb agents halogenats com el clor per a reduir la contaminació viral. No obstant, cal tenir present la persistència del DNA després de la mort cel·lular (168) (169) i per tant, la quantificació basada en el DNA pot donar una sobreestimació del risc patogen de la mostra mitjançant falsos positius. L'RNA, per altra banda, es degrada més ràpidament després que les cèl·lules han perdut la seva viabilitat RNA (170), però aquesta inestabilitat intrínseca pot comportar problemes tècnics si s'utilitza com a diana molecular.

Els agents intercalants de bases són una alternativa prometedora i senzilla d'utilitzar. Aquestes substàncies químiques són capaces de penetrar només en les

cèl·lules inviades que tinguin malmesa la integritat de la seva membrana cel·lular. L'EMA és un derivat del colorant de DNA més utilitzat fins fa poc als laboratoris, el bromur d'etidi, que amb l'addició d'un grup azida li permet la unió covalent a l'DNA. De la mateixa manera, el PMA és un derivat del iodur de propidi unit a un grup azida. El iodur de propidi és un colorant que s'utilitza habitualment microscòpia per a assajos de viabilitat cel·lular, i també és capaç d'unir-se covalentment a l'àcid nucleic (171).

A dia d'avui els intercalants de bases com l'EMA i el PMA s'utilitzen per a diferenciar entre agent infeccions i no infeccions en paràsits i bacteries (172) (153) (173)(174)(175) (176)(177), així com en virus (178) (150) (151) (179) (147) (148) (144). L'EMA s'ha demostrat tenir una alta toxicitat intrínseca per a algunes bacteries, subestimant el nombre tota de DNA viable en la mostra. Degut a la seva major carrega, el PMA és menys permeable a la membrana i té una toxicitat inherent més baixa que l'EMA (153), permetent una major eficiència en l'entrada a la cèl·lula i una estimació més precisa del nombre de cèl·lules viables, disminuint el nombre de falsos negatius (171).

Els experiments amb clor són un repte en tant en quant el clor lliure s'adhereix als diferents materials amb els que entra en contacte, així com la matèria orgànica que hi hagi present a la mostra, dificultant el càlcul exacte de clor lliure que està actuant sobre la nostra mostra. Aquest va ser un dels primers reptes que vàrem haver de superar posant en contacte els recipients amb clor.

En aquests recipients pretractats, a una temperatura constant de 4º C i sense contacte amb la llum es mantenia l'estoc de clor lliure necessari per als experiments. La caiguda del clor al llarg del temps es una variable que va ser mesurada minuciosament abans de començar els assajos d'inactivació del HAV

mitjançant el mètode DPD (N,N diethyl-p-phenylenediamine sulfat) utilitzant un fotòmetre.

Una altra qüestió a tenir en compte són els múltiples agents, reactius i productes que interaccionen entre ells al llarg de tot l'experiment. Des de l'addició del clor a la mostra fins l'extracció de l'àcid nucleic passant per la inactivació de la reacció amb clor o la suma del PMA. Basant-nos amb bibliografia anterior vàrem seguir tots els passos que altres científics i científiques recomanaven per a resoldre aquest problema. No obstant, aquest tipus d'experiment sempre serà més senzill en mostres concentrades a partir d'aigua que en mostres de matèria orgànica, on és més difícil arribar a saber quins components hi ha presents a la mostra que podrien fer variar els resultats o inclús actuar com a inhibidors en alguna de les etapes. També es van haver de fer proves prèvies per assegurar-nos que no hi hagués citotoxicitat degut al clor lliure i al tiosulfat en afegir la mostra tractada al cultiu cel·lular.

A l'assaig d'inactivació mitjançant calor, es veu clarament com el numero de còpies detectat per RTqPCR sense cap tractament previ difereix poc en totes quatre condicions, mentre que mitjançant la titulació per TCID₅₀ es veu clarament que la infectivitat ha baixat. Gràcies a l'existència d'un cultiu cel·lular adient per aquesta soca de HAV podíem saber la caiguda d'infectivitat de cada tractament d'inactivació. Però cal recordar que molts virus no disposen actualment de cultius cel·lulars on poder replicar.

En el cas de l'estudi dut a terme l'any 2016 pel Dr. Albert Blanco en mostres de norovirus provinents d'un brot iniciat a Andorra, però estès per tota Catalunya, també es va realitzar l'assaig amb PMA i Triton per tal d'inferir quin nombre de partícules víriques detectades eren infectives (80).

Els nostres resultats confirmen que, tant el tractament amb clor com amb alta temperatura, permeten l'entrada de l'agent intercalant a través de la càpsida malmesa i mostren que la correlació entre infectivitat i els mètodes moleculars depenen del mecanisme utilitzat per inactivar el virus. En el cas de la inactivació a temperatures superiors a 40°C afecta principalment a les càpsides del virus mentre que s'ha demostrat que el clor atacaria tant la càpsida com el genoma (156) (142).

Quan vàrem inactivar l'HAV amb clor lliure, la correlació entre TCID₅₀ i RTqPCR va ser estadísticament significativa fins i tot en absència de pretractament de PMA, cosa que confirma que el clor lliure degrada la regió diana utilitzada en la RTqPCR situada a 5'NCR del genoma, tal i com havien predit altres estudis (142). En el nostre estudi, en els assajos PMA-RTqPCR sense Triton X-100, es van observar millors correlacions per als virus inactivats amb clor lliure que per calor, i l'addició de Triton X-100 només va millorar el rendiment del PMA quan els virus es van desnaturalitzar tèrmicament tal i com mostraven altres estudis (178) (15), però no quan es van oxidar, un fet també experimentat anteriorment per diversos autors (180) (181) (147).

Tot i això, l'efecte de Triton X-100 encara no s'havia avaluat en altres processos d'inactivació diferents de la calor. Les bases moleculars de l'efecte diferencial de Triton X-100 observades en funció dels mecanismes d'inactivació no són clares. Atès que el PMA requereix àcids nucleics de doble cadena o estructurats per unir-se, la seva unió als àcids nucleics pot ser menys eficient quan els virus són inactivats per la calor a causa de la desnaturalització d'estructures secundàries estables presents als genomes. En aquest tipus de mostres, el Triton X-100 i altres

agents tensioactius poden facilitar el recobriment d'estructures secundàries de RNA a regions genòmiques, que són essencials per a la unió covalent de PMA.

Diversos estudis posteriors han utilitzat la PMA-RTqPCR per a quantificar virus en aigua i aliments. L'any passat es va publicar un estudi on s'avaluava la inactivació de dos virus entèrics d'humans l'adenovirus tipus 40 i coxsackievirus B5 mitjançant la inactivació per calor o per clor lliure (182).

No obstant, els diferents estudis mostren com l'efectivitat del pretractament amb PMA varia en funció del virus i del mètode d'inactivació utilitzat. En un estudi realitzat per el Dr. Mohammad R. Karim es va inactivar norovirus murí (MNV-1), poliovirus i norovirus humà (HuNoV) amb clor lliure, calor i llum UV. El MNV-1 va ser utilitzat com a subrogat del HuNoV al no estar àmpliament estès el cultiu amb HIEs per a mesurar la seva infectivitat (180). Poliovirus va ser exposat a 72°C durant 5 segons i va perdre la seva infectivitat, mentre que MNV-1 i HuNoV van estar en les mateixes condicions de temperatura però al llarg de 5 minuts. En aquest assaig MNV-1 va perdre la seva infectivitat i es va assumir que HuNoV també l'hauria perdut. En canvi per RT-PCR utilitzant el tractament previ amb PMA, no es veia una caiguda d'infectivitat ni per a MNV-1 ni per a HuNoV, i per RTqPCR la caiguda de títol era mínima. L'autor assenyalava que les diferències d'efectivitat del pretractament que s'havien observat amb poliovirus respecte a MNV-1 i HuNoV podrien ser degudes a la composició de la seva càpsida. Si bé és cert que tots tres virus són no embolcallats i els seus genomes d'RNA es troben protegits per la càpsida proteica, l'estructura de la càpsida del poliovirus és diferent del MNV-1 i del HuNoV i per tant els autors proposen que el dany causat per la inactivació podria ser diferent.

Un assaig fet amb enterovirus i norovirus prèviament sotmesos a diferents temperatures (19°C, 37°C i 72°C) o bé posat en contacte amb hipoclorit va donar com a resultat una caiguda de títols a tots els virus, excepte en la condició de 19°C l'assaig no va ser capaç de diferenciar entre virus infecciosos i no infecciosos mitjançant PMA-RTqPCR (147).

En el cas de l'estudi de les aigües d'Andorra (80) sí que es va detectar una caiguda del títol víric de HuNoV entre les RTqPCRs realitzades amb i sense pretractament amb PMA/ Triton on la proporció de virions infecciosos a les mostres d'aigua va ser del 0,3%-5,6% del nombre total de partícules físiques. El qual donaria a entendre que els virus recuperats estaven inactivats de manera natural tindrien danys suficientment importants com per a que el PMA pugues accedir a través de la càpsida.

Una altra hipòtesi que ha sorgit en els diferents assajos realitzats amb PMA és que l'intercalant de bases no s'estigués unint a la diana que amplifiquen els primers utilitzats i per tant no s'amplifiquessin genomes de partícules víriques que no eren infectives. Per tal de resoldre aquesta hipòtesi, el grup del Dr. Karim va posar en contacte PMA amb RNA nuu de HuNoV i MNV-1, i el resultat va ser que no es va detectar cap genoma ni per RT-PCR ni per RTqPCR. Per tant, la diferència de resultats no vindria de divergències en la unió covalent del PMA al genoma de diferents virus sinó en l'acció dels diferents agents inactivants sobre les càpsides dels virus (180).

Un altre camp que es suma al coneixement dels virus és la bioinformàtica, que desenvolupa mètodes i eines informàtiques per comprendre dades biològiques. Una aproximació més detallada de la composició i l'estructura del material genètic

del virus ens podrà donar més informació sobre la seva reactivitat als agents desinfectants.

Per altra banda, s'han publicat estructures de virus entèrics mitjançant cristal·lografia de raig X (183) (184) (185) que han aportat una informació molt valuosa sobre la ubicació i l'orientació de les proteïnes de la càpsida.

En el mateix context, la microscòpia crioelectrònica (cryoEM) també ens ha aportat molta informació, especialment en aquells virus que no es poden cristal·litzar degut a les formes complexes de la càpsida, una purificació insuficient o la presència d'estructures metaestables com processos d'entrada a cèl·lules o unió de virus (186) (187). Estudis de cryoEM han demostrat que alguns virus tenen genomes ordenats (188) i s'han descrit interaccions específiques entre les proteïnes de la càpsida i els genomes empaquetats (189). De moment no disposem d'estructures gairebé atòmiques per a alguns virus entèrics importants com l'HAV i el HuNoV, tot i que s'han reconstruït partícules recombinants (virus-like particles-VLP) (190). No obstant, cal tenir precaució en l'anàlisi de les estructures víriques a l'hora d'identificar l'accessibilitat que tindrà l'agent desinfectant als grups funcionals. Les càpsides dels virus poden tenir una naturalesa fluida i per tant, els grups funcionals que normalment estan protegits d'oxidants poden estar de manera temporal exposats a la superfície de la càpsida (191). A més a més les modificacions en les partícules víriques no sempre són causa d'inactivació. Hi ha estudis que demostren com, tot i fer un tractament amb ozó a poliovirus i alterar les proteïnes VP1 i VP2, la inactivació del virus es produeix en realitat per dany al genoma (192).

Es necessita més recerca per esbrinar l'efecte de l'estructura del virus, així com la seva funció associada, respecte la seva reactivitat a diferents mètodes

d'inactivació. L'aplicació d'aquesta doble mirada permet la identificació racional de llocs específics de dianes antivirals, així com vacunes específiques que tenen com a diana estructures rellevants per al virus que són comuns en diferents soques. Yang i col·laboradors van utilitzar aquesta visió amb coronavirus per tal de dissenyar una proteasa inhibidora de la replicació del virus (193). En aquest cas, un coneixement de les regions estructuralment més conservades del virus i la bioquímica de la proteasa permet el desenvolupament d'un únic antiviral d'ample espectre que es dirigeixi a tots els coronavirus (28). Un enfocament similar es podria aplicar al disseny de desinfectants contra els virus entèrics com a eina per adaptar-nos als canvis en seguretat alimentària que s'esbossen en un horitzó no molt llunyà.

Els fenòmens climatològics extrems derivats del canvi climàtic, les futures pandèmies degudes a malalties emergents i els conflictes bèl·lics per l'accés als escassos recursos naturals podrien també fer-nos retrocedir en el temps en patologies que a dia d'avui estan sota el nostre control.

Segons el CDC, el nombre de noves infeccions estimades pel virus de l'hepatitis A ha augmentat des del 2014, amb un increment gairebé del triple entre els anys 2017 i 2018. L'objectiu que s'havia establert per a l'any 2018 era el d'assolir com a màxim 6250 noves infeccions, però la dada per aquell any va ser de 24900 casos. La incidència de l'hepatitis A està subjecta a variacions d'un any a l'altre, en gran part a causa de l'aparició de brots. Des de finals del 2016, hi ha hagut brots generalitzats d'hepatitis A als Estats Units, que es van propagar, principalment, a través del contacte de persona a persona entre les persones que havien consumit drogues o bé amb persones sense llar. Dintre del pla estratègic per a l'any 2025 formulat per el mateix CDC, l'objectiu establert és la reducció en un 83.9% de les

infeccions cursades l'any 2018, per tant un màxim de 4000 persones infectades l'any 2023 i igual o menys de 2500 persones infectades l'any 2028 (194).

Per a fer-ho possible s'augmentarà la difusió de les recomanacions del CDC sobre la vacunació contra l'HAV a la població de risc i es reforçarà la detecció i la resposta als brots notificats (194).

Sense dubte, tècniques com la multiplex optimitzada per a la detecció del HAV i HuNoV i l'ús del pretractament amb PMA/ Triton , o aproximacions semblants, previ a la RTqPCR seran peces complementaries que ajudaran a l'assoliment de l'objectiu d'estimar acuradament el nivell de risc associat a la presència dels esmentats virus en mostres contaminades. En quant a l'anàlisi de la qualitat de l'aigua, la detecció d'*Escherichia coli* (o bé de coliformes termotolerants) no és un índex fiable per ell mateix de la presència o absència del virus de l'hepatitis A, ni d'altres virus entèrics, en aigües de consum, ja que els virus són més resistents a la desinfecció (195).

El fet poder exigir regulacions i controls més estrictes a països que es dediquen a l'exportació d'aliments és de vital importància, però ha d'anar acompanyat de que els protocols imposats siguin assolibles econòmicament per a tots els països. També, cal millorar la inferència entre organismes infectius i no infectius per tal de no sobreestimar les dades de contaminació en aliments i aigües, que d'altra banda podrien ser descartats amb les pèrdues econòmiques que podria suposar.

Només un baix percentatge dels virus compten amb un cultiu cel·lular adient on poder replicar en condicions de laboratori. Per tant, cal trobar altres maneres de poder inferir millor la infectivitat real de les partícules víriques que tenim en una nostra mostra. Hem vist que els agents intercalants poden ser una bona manera,

tot i que observem més efectivitat en unes condicions d'inactivació que en altres. En el cas de la inactivació amb clor observem la dificultat de l'adherència del clor als diferents components del medi i del recipient, així com la caiguda natural que té el clor al llarg del temps. Potser una forma de continuar aproximant una bona correlació entre infectivitat i número de còpies genòmiques detectades seria amplificant fragments més grans del genoma o bé, amplificant fragments que, degut a la conformació del RNA del virus, estiguessin més exposades a agents desinfectants, com per exemple el Clor.

Si amplifiquéssim fragments més llargs del genoma, amb la dificultat que això comporta degut a la baixa conservació que podrien tenir i a la possible pèrdua de sensibilitat causada per usar dianes més llargues, seria més fàcil detectar regions del RNA que estiguessin malmeses i per tant aquells genomes no serien amplificats. Per altra banda, conèixer la conformació 3D que adopta el RNA dintre del virus, ens permetria trobar regions més exposades i poder detectar aquelles que estan més conservades dintre de la espècie.

Segons l'informe Mundial de les Nacions Unides sobre el Desenvolupament dels recursos hídrics del 2020 (196), el canvi climàtic portarà cada cop més sovint fenòmens extrems relacionats amb l'aigua, fet que suposa una amenaça per a les infraestructures d'aigua potable, de sanejament e higiene així com la possibilitat que quedin malmeses les estacions de bombeig del clavegueram que podria portar a una expansió de femtes amb protozous, bacteris i virus constituint un greu risc per a la salut humana. Alhora si disminueix la qualitat de l'aigua ens haurem d'enfrontar a uns costos més elevats en els seus tractaments de purificació.

A més a més, l'augment de temperatura pot portar a un increment de l'evaporació de les aigües superficials i posar en risc els embornals d'aigua potable. L'augment

del nivell del mar podria afavorir la incursió d'aigua salada en els aqüífers costers que actualment tenim a la nostra disposició.

Així doncs cal treballar en la línia de la mitigació del canvi climàtic, alhora que paral·lelament es posen esforços en l'adaptació als seus efectes, molts dels quals ja hem pogut patir amb fenòmens extrems com el temporal Glòria (Gener 2020) on Girona es va quedar sense aigua potable en desbordar-se el riu Ter, i van ser malmeses dues plantes depuradores de la comunitat valenciana, o bé, més recentment, el temporal Filomena (Gener 2021) que ha provocat l'aflorament de les aigües residuals del clavegueram en alguns barris de la ciutat d'Alacant.

CONCLUSIONS

De cada un dels objectius proposats a l'inici de la tesi se'n extreuen les següents conclusions:

1. Disseny d'una RT-qPCR multiplex optimitzada per a la detecció de HAV, Norovirus GI i GII per a mostres de mol·luscs i aigua.
 - La RT-qPCR multiplex va mostrar certa pèrdua de sensibilitat en comparació amb les monoplex, tal i com s'esperava.
 - Aquesta pèrdua de sensibilitat va ser insignificant quan es van analitzar mostres contaminades de forma natural.
 - Finalment el balanç és positiu en reduir els costos dels reactius i de nombre de recursos necessaris.
 - L'assaig multiplex esdevé una eina molt valuosa per al cribratge virològic de mostres d'aliments i aigua.

2. Refinament dels mètodes per a millorar la detecció de la infectivitat d'HAV en mostres ambientals mitjançant la utilització d'agents intercalants combinats amb RTqPCR.
- El tractament de mostres amb PMA abans de l'amplificació mitjançant RTqPCR es pot utilitzar per inferir el rendiment dels tractaments de desinfecció del HAV.
 - L'addició de Triton durant el tractament amb PMA millora la correlació amb la infectivitat per als virus inactivats per calor, però no per als virus inactivats amb clor lliure.
 - Tot i que l'efecte positiu de Triton pot no ser universal, l'ús potencial dels assaigs PMA / Triton-RTqPCR com a mètode horitzontal per controlar la reducció de la infectivitat del virus és prometedor.
 - Els assaigs PMA / Triton-RTqPCR es poden utilitzar com a refinament per a una millor estimació de la concentració de partícules infeccioses en aigües contaminades de forma natural.
 - La quantificació precisa dels virus intactes presents a l'aigua tindrà un enorme valor en la realització i interpretació d'estudis quantitius d'avaluació de risc.

BIBLIOGRAFIA

1. Andino R, Domingo E. Viral quasispecies. *Virology* [Internet]. 2015 May;479–480:46–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682215001580>
2. Price-Hayward M, Hartnell R. Summary Report of Joint Scientific Workshop on Foodborne Viruses. *EFSA Support Publ* [Internet]. 2016 Oct;13(10). Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1103>
3. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades diarreicas [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 1]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
4. Desselberger U. Viral gastroenteritis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017 Nov;45(11):690–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303917302207>
5. Appleton H, Higgins PG. VIRUSES AND GASTROENTERITIS IN INFANTS. *Lancet* [Internet]. 1975 Jun;305(7919):1297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673675925817>
6. Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: Gastroenteritis and beyond. *Viruses*. 2017;9(2):1–23.
7. Nakata S, Chiba S, Terashima H, Sakuma Y, Kogasaka R, Nakao T. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of human calicivirus in stools. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1983 Feb;17(2):198–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833476>
8. Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, et al. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol* [Internet]. 2010 Aug;54(8):483–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646214>

9. Sano D, Pérez-Sautu U, Guix S, Pintó RM, Miura T, Okabe S, et al. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Feb;77(3):1111–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148702>
10. Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund K-O, Thorhagen M, Siebenga J, et al. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Jun;48(6):2191–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392905>
11. Franck KT, Lisby M, Fonager J, Schultz AC, Böttiger B, Villif A, et al. Sources of Calicivirus Contamination in Foodborne Outbreaks in Denmark, 2005–2011—The Role of the Asymptomatic Food Handler. *J Infect Dis* [Internet]. 2015 Feb 15;211(4):563–70. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu479>
12. Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinjé J, et al. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 May;18(5):873–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516204>
13. Dey SK, Phathamavong O, Nguyen TD, Thongprachum A, Chan-It W, Okitsu S, et al. Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003–2009. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2012 Jan;140(1):74–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21371364>
14. Medici MC, Tummo F, Albonetti V, Abelli LA, Chezzi C, Calderaro A. Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008–2009. *J Med Virol*

- [Internet]. 2012 Apr;84(4):643–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.23231>
15. Sala MR, Broner S, Moreno A, Arias C, Godoy P, Minguell S, et al. Cases of acute gastroenteritis due to calicivirus in outbreaks: clinical differences by age and aetiological agent. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Aug;20(8):793–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603748>
 16. Aliabadi N, Tate JE, Haynes AK, Parashar UD, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sustained decrease in laboratory detection of rotavirus after implementation of routine vaccination—United States, 2000–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2015;64(13):337–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25856253><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4584623>
 17. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*. 2015;12.
 18. Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W. Mortality and morbidity among military personnel and civilians during the 1930s and World War II from transmission of hepatitis during yellow fever vaccination: Systematic review. *Am J Public Health*. 2013;103(3).
 19. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* [Internet]. 2006 Jan;16(1):5–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.482>

20. Qi Y, Zhang F, Zhang L, Harrison TJ, Huang W, Zhao C, et al. Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. Meng X-J, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jul 10;10(7):e0132503. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132503>
21. Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. Virology [Internet]. 2004 Dec;330(2):501–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682204006749>
22. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, et al. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An age- and sex-matched case-control study. J Med Virol [Internet]. 2004 Sep;74(1):67–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.20147>
23. Boland F, Martinez A, Pomeroy L, O’Flaherty N. Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. Transfus Med Hemotherapy [Internet]. 2019;46(2):95–103. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/499121>
24. Dalton HR, Kamar N, Baylis SA, Moradpour D, Wedemeyer H, Negro F. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. J Hepatol [Internet]. 2018;68(6):1256–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
25. States M, Strategic WHO, Group A, Grade T, II E. Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(18):185–200.
26. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Foodborne viruses. Curr Opin Food Sci. 2016;8:110–9.
27. Ceuppens S, Li D, Uyttendaele M, Renault P, Ross P, Ranst M Van, et al. Molecular

-
- Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2014 Jul;13(4):551–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12072>
28. Wigginton KR, Kohn T. Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition, structure, and function. *Curr Opin Virol*. 2012;2(1):84–9.
 29. Poduri CD. Jaundice: A brief historical perspective. *Apollo Med* [Internet]. 2016;13(2):76–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apme.2014.05.014>
 30. Sherlock S. *Epidemiol Infect* (460-375). 2015;2.
 31. McDonald S. Acute Yellow Atrophy. *Edinb Med J*. 1908;15:208.
 32. Schmid R. History of viral hepatitis: A tale of dogmas and misinterpretations. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(7):718–22.
 33. Findlay GM, Dunlop JL, Brown HC. Observations on epidemic catarrhal jaundice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1931;25(1):7–28.
 34. MacCallum FO, BW. Transmission of Infective Hepatitis to Human Volunteers. Effect on Rheumatoid Arthritis. *Lancet*. 1944;2: 228.
 35. Mulder GD. Clinical studies. *J Wound, Ostomy Cont Nurs*. 1988;15(6):260.
 36. Pintó RM, Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, Bosch A. Hepatitis A virus: State of the art. *Food Environ Virol*. 2010;2(3):127–35.
 37. Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. Genome Variability and Capsid Structural Constraints of Hepatitis A Virus. *J Virol*. 2003;77(1):452–9.
 38. Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, Van Den Brand JMA, Gmyl AP, Brunink S, et al. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proc Natl Acad Sci U*

-
- S A. 2015;112(49):15190–5.
39. de Oliveira Carneiro I, Sander A-L, Silva N, Moreira-Soto A, Normann A, Flehmig B, et al. A Novel Marsupial Hepatitis A Virus Corroborates Complex Evolutionary Patterns Shaping the Genus Hepatovirus . *J Virol*. 2018;92(13).
40. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(1):167–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>
41. Borman AM, Kean KM. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology*. 1997;237(1):129–36.
42. Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM. Naked viruses that aren't always naked: Quasi-enveloped agents of acute hepatitis. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):539–60.
43. Hollinger FB TJ. Hepatitis A virus. In: *Fields Virology*. *Fields Virology*. 1996. 735–782 p.
44. Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. 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. *J Virol*. 1994;68(2):1066–74.
45. Ehrenfeld E, Teterina NL. Initiation of Translation of Picornavirus RNAs: Structure and Function of the Internal Ribosome Entry Site. In: *Molecular Biology of Picornavirus* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 157–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817916.ch14>

46. Asher LVS, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol* [Internet]. 1995 Nov;47(3):260–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.1890470312>
47. Lanford RE, Feng Z, Chavez D, Guerra B, Brasky KM, Zhou Y, et al. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11223–8.
48. Coulepis AG, Locarnini SA, Lehmann NI, Gust ID. Detection of Hepatitis A Virus in the Feces of Patients with Naturally Acquired Infections. *J Infect Dis* [Internet]. 1980 Feb 1;141(2):151–6. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/141.2.151>
49. Lemon SM, Binn LN. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization. *Infect Immun* [Internet]. 1983 Oct;42(1):418–20. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.42.1.418-420.1983>
50. Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* [Internet]. 2015;517(7532):85–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13806>
51. Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A. IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Virol*. 2005;86(10):2747–51.
52. Emerson SU, Huang YK, McRill C, Lewis M, Purcell RH. Mutations in both the 2B

- and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture. *J Virol.* 1992;66(2):650–4.
53. Schiff ER. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine* [Internet]. 1992;10:S18–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0264410X9290534Q>
54. SJOGREN MH. Hepatitis A Virus in Stool During Clinical Relapse. *Ann Intern Med* [Internet]. 1987 Feb 1;106(2):221. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-106-2-221>
55. Jacobson IM, Nath BJ, Dienstag JL. Relapsing viral hepatitis type A. *J Med Virol* [Internet]. 1985 Jun;16(2):163–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.1890160208>
56. Cobden I, James OFW. A biphasic illness associated with acute hepatitis a virus infection. *J Hepatol* [Internet]. 1986 Jan;2(1):19–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827886800046>
57. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing Hepatitis A Review of 14 Cases and Literature Survey. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 1992 Jan;71(1):14–23. Available from: <http://journals.lww.com/00005792-199201000-00002>
58. Previsani, N., Lavanchy, D., & Siegl G. Hepatitis A. In I. K. Mushahwar (Ed.), *Viral hepatitis molecular biology diagnosis epidemiology and control*. Elsevier, editor. California; 2004. 1–30 p.
59. D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination

- of preadolescents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6842–54.
60. Bower WA, Nainan O V., Han X, Margolis HS. Duration of Viremia in Hepatitis A Virus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 Jul;182(1):12–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315701>
61. Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Jun;72(6):3846–55. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02660-05>
62. Akriviadis EA. Fulminant Hepatitis A in Intravenous Drug Users with Chronic Liver Disease. *Ann Intern Med* [Internet]. 1989 May 15;110(10):838. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-110-10-838>
63. Carmona R, Cano R AP. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia Epidemiológico de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018. 2020;
64. Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD PU. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS One*. 2016;
65. Mawatari M, Kato Y. Norovirus Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis Clin Case Stud*. 2014;203–12.
66. Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, Pothier P. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Aug;20(8):724–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603608>

-
67. Indesmith LISAL, Oe CHM, Arionneau SEM, Uvoen NAR, lang XIJ, Indblad LAL, et al. Unknown - Unknown - nm860.pdf(2).pdf. 2003;9(5).
68. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008 Oct;14(10):1553–7. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/10/08-0117_article.htm
69. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus Vaccine against Experimental Human Norwalk Virus Illness. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2178–87.
70. Blasco JBB. Epidemiología de las gastroenteritis Agudas Víricas. 2007. 99–114 p.
71. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: An historic perspective. *J Infect Dis*. 2000;181(SUPPL. 2).
72. 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.
73. Melish, Marian E MD et al. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UNIVERSITY OF BRISTOL on December 15, 2014. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *N Engl J Med*. 1974;306(13):802–5.
74. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross challenge in volunteers. *J Infect Dis*. 1974;129(6):709–14.

75. Lopman B, Simmons K, Gambhir M, Vinjé J, Parashar U. Epidemiologic Implications of Asymptomatic Reinfection: A Mathematical Modeling Study of Norovirus. *Am J Epidemiol.* 2014;179(4):507–12.
76. 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.
77. Kapikian AZ, Greenberg HB, Cline WL, Kalica AR, Wyatt RG, James HD, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *J Med Virol.* 1978;2(4):281–94.
78. Numata K, Hardy ME, Nakata S, Chiba S, Estes MK. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus sapporo. *Arch Virol.* 1997;142(8):1537–52.
79. Goodgame R. Norovirus gastroenteritis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2006;8(5):401–8.
80. Blanco A, Guix S, Fuster N, Fuentes C, Bartolomé R, Cornejo T, et al. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(9).
81. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (80-).* 2016;353(6306):1387–93.
82. Costantini V, Morantz EK, Browne H, Ettayebi K, Zeng XL, Atmar RL, et al. Human norovirus replication in human intestinal enteroids as model to evaluate virus inactivation. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1453–64.
83. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J*

- Clin Microbiol. 2015;53(2):373–81.
84. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. FEMS Microbiol Lett. 2005;253(1):1–8.
85. de Graaf M, Villabruna N, Koopmans MP. Capturing norovirus transmission. Curr Opin Virol [Internet]. 2017;22:64–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.11.008>
86. Kirby AE, Shi J, Montes J, Lichtenstein M, Moe CL. Disease course and viral shedding in experimental Norwalk virus and Snow Mountain virus infection. J Med Virol [Internet]. 2014 Dec;86(12):2055–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.23905>
87. TEUNIS PFM, SUKHRIE FHA, VENNEMA H, BOGERMAN J, BEERSMA MFC, KOOPMANS MPG. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. Epidemiol Infect [Internet]. 2015 Jun 22;143(8):1710–7. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S095026881400274X/type/journal_article
88. Lai C-C, Wang Y-H, Wu C-Y, Hung C-H, Jiang DD-S, Wu F-T. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. J Clin Virol [Internet]. 2013 Feb;56(2):96–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653212003927>
89. Bok K, Green KY. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. N Engl J Med [Internet]. 2012 Nov 29;367(22):2126–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1207742>
90. de Graaf M, van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and

- evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 23;14(7):421–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.48>
91. Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet* [Internet]. 2018 Jul;392(10142):175–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618311280>
92. Lindsay L, Wolter J, De Coster I, Van Damme P, Verstraeten T. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Dec 14;15(1):425. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1168-5>
93. Newman KL, Moe CL, Kirby AE, Flanders WD, Parkos CA, Leon JS. Norovirus in symptomatic and asymptomatic individuals: cytokines and viral shedding. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2016 Jun 25;184(3):347–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cei.12772>
94. Chan MCW, Sung JJY, Lam RKY, Chan PKS, Lee NLS, Lai RWM, et al. Fecal Viral Load and Norovirus-associated Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006 Aug;12(8):1278–80. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/8/06-0081_article.htm
95. Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, Lee LE, Bierhoff M, Biggs C, et al. Epidemiologic, Virologic, and Host Genetic Factors of Norovirus Outbreaks in Long-term Care Facilities. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016 Jan 1;62(1):1–10. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ747>
96. Gustavsson L, Nordén R, Westin J, Lindh M, Andersson L-M. Slow Clearance of

- Norovirus following Infection with Emerging Variants of Genotype GII.4 Strains. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 May;55(5):1533–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00061-17>
97. Cheung SKC, Kwok K, Zhang L-Y, Mohammad KN, Lui GCY, Lee N, et al. Higher Viral Load of Emerging Norovirus GII.P16-GII.2 than Pandemic GII.4 and Epidemic GII.17, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2018 Jan;25(1):119–22. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/1/18-0395_article.htm
98. Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, et al. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J Clin Virol* [Internet]. 2014 Jun;60(2):96–104. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138665321400105X>
99. Arias A, Thorne L, Ghurburrun E, Bailey D, Goodfellow I. Norovirus Polymerase Fidelity Contributes to Viral Transmission In Vivo. Duprex WP, editor. *mSphere* [Internet]. 2016 Oct 26;1(5). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00279-16>
100. Lee N, Chan MCW, Wong B, Choi KW, Sin W, Lui G, et al. Fecal Viral Concentration and Diarrhea in Norovirus Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2007 Sep;13(9):1399–401. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/9/06-1535_article.htm
101. Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, et al. Norovirus shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;82:119–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.012>

-
102. Debbink K, Lindesmith LC, Ferris MT, Swanstrom J, Beltramello M, Corti D, et al. Within-Host Evolution Results in Antigenically Distinct GII.4 Noroviruses. *J Virol*. 2014;88(13):7244–55.
103. Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, Iturriza-Gomara M, et al. Community Incidence of Norovirus-associated Infectious Intestinal Disease in England: Improved Estimates Using Viral Load for Norovirus Diagnosis. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2010 May 1;171(9):1014–22. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwq021>
104. Cates JE, Vinjé J, Parashar U, Hall AJ. Recent advances in human norovirus research and implications for candidate vaccines. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2020;19(6):539–48. Available from: <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1777860>
105. Food E, Authority S. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J*. 2018;16(12).
106. ACSA-UAB. Mapa de perills alimentaris Perill biològic: Norovirus. 2019;1–3.
107. O’Brien SJ. The Challenge of Estimating the Burden of an Underreported Disease. In: Koopmans, M., Cliver, D.O., Bosch A, editor. *Food-Borne Viruses*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 87–115.
108. Lopman B, Atmar R, Baric R, Estes M, Green K, Glass R, et al. Global burden of norovirus and prospects for vaccine development. *Cdc*. 2015;1–46.
109. Arias C, Sala MR, Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, et al. Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: A population-based

- study. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):39–44.
110. Hall AJ, Wikswo ME, Pringle K, Gould LH, Parashar UD, Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases C. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2014 Jun 6;63(22):491–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898166>
111. Ruggeri FM, Di Bartolo I, Ponterio E, Angeloni G, Trevisani M, Ostanello F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol*. 2013;36(4):331–44.
112. Van Der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis e virus transmission. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2014;4:91–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.006>
113. Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1994 Oct;60(10):3704–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986043>
114. Hawker J, Slack R, Rylott R. An outbreak of hepatitis A. *Commun Dis Rep CDR Rev*. 1992;2(2):113–7.
115. Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, Bremer V, Bruisten S, Ngui S-L, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol* [Internet]. 2007 Apr;79(4):356–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.20781>
116. Tortajada C, de Olalla PG, Pinto RM, Bosch A, Caylà J. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008 – March

2009. Eurosurveillance [Internet]. 2009 Apr 16;14(15). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.14.15.19175-en>
117. Fusco G, Anastasio A, Kingsley DH, Amoroso MG, Pepe T, Fratamico PM, et al. Detection of hepatitis a virus and other enteric viruses in shellfish collected in the gulf of naples, italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(14).
118. Comelli A, Izzo I, Casari S, Spinetti A, Bergamasco A, Castelli F. Hepatitis a outbreak in men who have sex with men (MSM) in Brescia (Northern Italy), July 2016-July 2017. *Infez Med*. 2018;26(1):46–51.
119. Noble RC. Posttransfusion Hepatitis A in a Neonatal Intensive Care Unit. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1984 Nov 16;252(19):2711. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1984.03350190013011>
120. Sherertz RJ, Russell BA, Reuman PD. Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Arch Intern Med* [Internet]. 1984 Aug;144(8):1579–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087755>
121. Comisión Europea. RASFF: The Rapid Alert System for Food and Feed 2018 Annual Report [Internet]. 2019. 49 p. Available from: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf
122. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*. 2000;181(SUPPL. 2):1–4.
123. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, E. Miller S, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus:

- How infectious is it? *J Med Virol* [Internet]. 2008 Aug;80(8):1468–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.21237>
124. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Determination of the 50% Human Infectious Dose for Norwalk Virus. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 Apr 1;209(7):1016–22. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit620>
125. Godoy P, Carmona G, Manzanares S, Jane M, Borràs E, Camps N, et al. Trends and risk factors of hepatitis A in Catalonia after the introduction of a hepatitis A+B vaccination programme. *J Viral Hepat* [Internet]. 2018 Sep;25(9):1001–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvh.12900>
126. VAQTA [Hepatitis A Vaccine , Inactivated] is indicated for the prevention of disease caused by hepatitis A virus (HAV) in persons 12 months of age and older . The primary dose should be given at least 2 weeks prior to expected exposure to HAV . FOR IN. 1996;1–17.
127. Monograph P. Product monograph. Toxicology. 2010;1–55.
128. Snyder CS, Moodie DS. American academy of pediatrics. *Congenit Heart Dis*. 2012;7(2):200–1.
129. Departament de Salut G de C. Calendari de vacunacions sistemàtiques. General Catalunya Dep Salut [Internet]. 2014;(V):1. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/ciutadania/la_salut_de_la_a_a_la_z/v/vacunacions/documents/calendari_vacunacions_2014_12_11.pdf
130. Lopman B, Atmar R, Baric R, Estes M, Green K, Glass R, et al. Global burden of

- norovirus and prospects for vaccine development. *Cdc*. 2016;1–46.
131. RAPHAELDOLIN, NEIL R. BLACKLOW, HERBERT DUPONT RB, RICHARDG. WYATT, JULIUS A. KASEL, RICHARDHORNICK ARC. *Vitro* (6, 7) . (36508).
 132. Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 1985;50(2):261–4.
 133. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*. 2004;58(1):42–9.
 134. KY. G. Caliciviridae: The noroviruses. In: RA L, MA M, B R, editors. *Fields Virology*. Philadelphia; 2007. p. 949–979.
 135. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J* [Internet]. 2011 Jul;9(7). Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2190>
 136. Bozkurt H, D’Souza DH, Davidson PM. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *J Food Prot* [Internet]. 2015 Aug;78(8):1597–617. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219377>
 137. Cook N, Bertrand I, Gantzer C, Pinto RM, Bosch A. Persistence of Hepatitis A Virus in Fresh Produce and Production Environments, and the Effect of Disinfection Procedures: A Review. *Food Environ Virol* [Internet]. 2018 Sep 14;10(3):253–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12560-018-9349-1>
 138. Tauxe R V. *Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge*.

-
- Emerg Infect Dis. 1997;3(4):425–34.
139. Nguyen-the C, Carlin F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 1994 Jul;34(4):371–401. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399409527668>
140. Cheremisinoff NP. Water Sterilization Technologies BT - Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies [Internet]. Chapter. 2002. 446–495 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B863T-4P9VBKJ-M/2/5b92b1adaedc13a16779be8f9da86104>
141. Niedz RP, Bausher MG. Control of In vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* [Internet]. 2002 Sep;38(5):468–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1079/IVP2002316>
142. Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Oct;68(10):4951–5. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002>
143. Cromeans T, Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, et al. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(18):5743–51.
144. Fuentes C, Pérez-Rodríguez FJ, Sabrià A, Beguiristain N, Pintó RM, Guix S, et al. Inactivation of Hepatitis A Virus and Human Norovirus in Clams Subjected to Heat Treatment. *Front Microbiol*. 2021;11(January):1–6.
145. Randazzo W, Falcó I, Pérez-Cataluña A, Sánchez G. Virus entéricos humanos en alimentos: detección y métodos de inactivación. *Arbor*. 2020;196(795):539.

146. Hamza IA, Jurzik L, Überla K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2011;214(6):424–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014>
147. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2010 Jul;76(13):4318–26. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02800-09>
148. Sánchez G, Elizaquível P, Aznar R. Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food Environ Virol* [Internet]. 2012 Mar 17;4(1):21–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12560-011-9074-5>
149. Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):1997–2004.
150. Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, Adrados B, Peñuela GA, Morató J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods*. 2010;168(1–2):228–32.
151. Graiver DA, Saunders SE, Topliff CL, Kelling CL, Bartelt-Hunt SL. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *J Virol Methods* [Internet]. 2010 Mar;164(1–2):51–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093409005084>

-
152. Hamza IA, Bibby K. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *J Virol Methods*. 2019;266(October 2018):11–24.
153. Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2006 Nov;67(2):310–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206001254>
154. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods* [Internet]. 2002 Jul;104(2):217–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093402000897>
155. Pecson BM, Martin LV, Kohn T. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009 Sep;75(17):5544–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592538>
156. Pintó RM, D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Ribes E, Guix S, et al. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol* [Internet]. 2012 Mar;7(3):331–46. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.12.5>
157. WHO, UNICEF. Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017. Special focus on inequalities. New York: United Nations Children’s Fund (UNICEF) and World Health Organization, 2019. 2017;1–71.
158. Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, et al.

- Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children. *N Engl J Med*. 2013;368(12):1121–30.
159. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff C. Outbreak of Viral Gastroenteritis Due to Drinking Water Contaminated by Norwalk-like Viruses. *J Infect Dis* [Internet]. 1999 Dec;180(6):1771–6. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315145>
160. Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff C-H. Norovirus Outbreaks from Drinking Water. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005 Nov;11(11):1716–21. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/11/05-0487_article.htm
161. Morales-Rayas R, Wolffs PFG, Griffiths MW. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010 Apr 30;139(1–2):48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510000929>
162. Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, et al. Sensitive Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for the Detection of Human and Animal Noroviruses in Clinical and Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Sep;73(17):5464–70. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00572-07>
163. Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Werbrouck H, Herman L, Uyttendaele M, et al. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J Virol Methods*. 2009;161(2):247–53.
164. Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, Okabe S, Atmar RL, Le Guyader FS. Environmental Detection of Genogroup I, II, and IV Noroviruses by Using a Generic

- Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Nov;79(21):6585–92. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02112-13>
165. Spackman E, Suarez DL. Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction proficiency study. *J Vet Diagnostic Investig.* 2005;17(1):76–80.
166. Huber I, Campe H, Sebah D, Hartberger C, Konrad R, Bayer M, et al. A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Eurosurveillance* [Internet]. 2011 Feb 17;16(7). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.07.19798-en>
167. Thonur L, Maley M, Gilray J, Crook T, Laming E, Turnbull D, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet Res* [Internet]. 2012;8(1):37. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-8-37>
168. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(10):3513–5.
169. Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* [Internet]. 1994 Jul;77(1):73–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03047.x>
170. Belasco, J. mRNA degradation in prokaryotic cells: an overview. In: Belasco J, Brawerman G, editors. *Control of Messenger RNA Stability*. Academic P. San Diego,

-
- Calif; 1993. p. 3–12.
171. Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples . *Microbiol Insights*. 2014;7:MBI.S17723.
172. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN. *Cryptosporidium* Propidium Monoazide-PCR, a Molecular Biology-Based Technique for Genotyping of Viable *Cryptosporidium* Oocysts. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009 Nov;75(21):6856–63. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00540-09>
173. Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods*. 2007;70(2):252–60.
174. Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2009;76(3):253–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.004>
175. Pan Y, Breidt F. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Dec 15;73(24):8028–31. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01198-07>
176. Vesper S, McKinstry C, Hartmann C, Neace M, Yoder S, Vesper A. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods* [Internet]. 2008

- Feb;72(2):180–4. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207003934>
177. Opsteegh M, Dam-Deisz C, de Boer P, DeCraeye S, Faré A, Hengeveld P, et al. Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing. *Int J Parasitol* [Internet]. 2020;50(5):357–69. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.04.001>
178. Coudray-Meunier C, Fraisse A, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiol* [Internet]. 2013 Dec 1;13(1):216. Available from:
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-216>
179. Kim SY, Ko G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2012 Sep;55(3):182–8. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2012.03276.x>
180. Karim MR, Fout GS, Johnson CH, White KM, Parshionikar SU. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J Virol Methods* [Internet]. 2015;219:51–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.020>
181. Leifels M, Jurzik L, Wilhelm M, Hamza IA. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2015;218(8):686–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.003>

-
182. Shirasaki N, Matsushita T, Matsui Y, Koriki S. Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Res* [Internet]. 2020;186:116409. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116409>
183. Hendry E, Hatanaka H, Fry E, Smyth M, Tate J, Stanway G, et al. The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure* [Internet]. 1999 Jan;7(12):1527–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212600883434>
184. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Aug 4;106(31):12986–91. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903699106>
185. Reddy VS, Natchiar SK, Stewart PL, Nemerow GR. Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. *Science* (80-) [Internet]. 2010 Aug 27;329(5995):1071–5. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1187292>
186. Zhang X, Jin L, Fang Q, Hui WH, Zhou ZH. 3.3 Å Cryo-EM Structure of a Nonenveloped Virus Reveals a Priming Mechanism for Cell Entry. *Cell* [Internet]. 2010 Apr;141(3):472–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410003600>
187. Fu C, Johnson JE. Viral life cycles captured in three-dimensions with electron microscopy tomography. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2011 Aug;1(2):125–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625711000502>

188. Prasad BVV, Rothnagel R, Zeng CQ-Y, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* [Internet]. 1996 Aug;382(6590):471–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/382471a0>
189. Pan J, Dong L, Lin L, Ochoa WF, Sinkovits RS, Havens WM, et al. Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Mar 17;106(11):4225–30. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812071106>
190. Prasad BV V. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science* (80-) [Internet]. 1999 Oct 8;286(5438):287–90. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.286.5438.287>
191. Broo K, Wei J, Marshall D, Brown F, Smith TJ, Johnson JE, et al. Viral capsid mobility: A dynamic conduit for inactivation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001 Feb 27;98(5):2274–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051598298>
192. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1981 Mar;41(3):718–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261692>
193. Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, et al. Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. Bjorkman P, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2005 Sep 6;3(10):e324. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0030324>
194. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 – 2025 Strategic Plan. Cdc.

2020;30.

195. Gorchev HG, Ozolins G. WHO guidelines for drinking- water quality. WHO Chron. 1984;38(3):104–8.
196. UNESCO. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2020 [Internet]. Agua y Cambio Climático. 2020. 243 p. Available from:
<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000373611/PDF/373611spa.pdf.mult>
i