



Contaminació viral del medi ambient: persistència i traçabilitat

Environmental viral pollution: persistence and source tracking

Anna Carratalà Ripollès

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Anna Carratalà Ripollès

**Contaminació viral del medi ambient:
persistència i traçabilitat**

*Environmental viral pollution: persistence
and source tracking*



**Contaminació viral del medi ambient: persistència i
traçabilitat**

*Environmental viral pollution: persistence and source
tracking*

Per/By Anna Carratalà Ripollès

Gener, 2013



Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i
Biotecnologia

TESI DOCTORAL/ THESIS

CONTAMINACIÓ VIRAL DEL MEDI AMBIENT: PERSISTÈNCIA I TRAÇABILITAT

ENVIRONMENTAL VIRAL POLLUTION: PERSISTENCE AND SOURCE TRACKING

Memòria presentada per
Memory presented by

Anna Carratalà Ripollès

per optar al grau de
to obtain the degree of

Doctora en Biologia
Doctor in Biology

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosina Gironés Llop (Catedràtica en Microbiologia)
al Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

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

Directora,
Supervisor,

Autora,
Author,

Rosina Gironés Llop

Anna Carratalà Ripollès



UNIVERSITAT DE BARCELONA



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

DECLARES THAT,

Anna Carratalà Ripollès has performed the work entitled “Environmental viral pollution: persistence and source tracking” under my direction in order to obtain the degree of Doctor in Biology, and that this thesis fulfills the requirements to obtain the “European Doctor” mention. This work is ready to be presented from the present day.

Signature,

Rosina Gironés Llop

Barcelona, 20 de Gener del 2013

Per als meus pares.

ABREVIACIONS

°C	Graus Centígrads
μW	Micro-vats
AAV	Virus adeno-associats
ADN	Àcid desoxiribonucleic (de l'anglès Desoxirribonucleic Acid)
AdV	Adenovirus
AgT	Antigen tumoral T
Agt	Antigen tumoral t
ARN	Àcid ribonucleic (de l'anglès Ribonucleic Acid)
AstV	Astrovirus
BKPyV	Poliomavirus BK (de l'anglès BK Polyomavirus)
BOE	Butlletí Oficial de l'Estat
CEN	Comitè europeu de normalització
ChPV	Parvovirus de pollastre (de l'anglès Chicken parvovirus)
cm²	Centímetre quadrat
dsDNA	ADN bicatenari (de l'anglès, single strand DNA)
dsRNA	ARN mono-catenari (de l'anglès, single strand RNA)
E. coli	Escherichia coli
ET	Tractament enzimàtic (de l'anglès Enzymatic treatment)
et al.	I col·laboradors
EV	Enterovirus
FCV	Calicivirus felí (de l'anglès Feline Calicivirus)
FFU	Unitats formadores de fluorescència (de l'anglès Fluorescence forming units)
g	Grams
GC	Còpies genòmiques (de l'anglès Genomic Copies)
GPV	Parvovirus d'oca (de l'anglès Goose parvovirus)
HAdV	Adenovirus humà (de l'anglès Human Adenovirus)
HAV	Virus de la hepatitis A (de l'anglès Hepatitis A Virus)
HEV	Virus de la hepatitis E (de l'anglès Hepatitis E Virus)
ISO	De l'anglès International Standard Organization
J	Joules
JCPyV	Poliomavirus JC (de l'anglès JC Polyomavirus)
Kb	Quilo-bases
KDa	Quilo-daltons

L	Litre
Log	Logaritme
MDPV	Parvovirus d'ànec Muscovy (de l'anglès Muscovy duck parvovirus)
m²	Metre quadrat
mg	Mil·ligrams
min	Minuts
ml	Mil·lilitres
MNV	Norovirus murí (de l'anglès murine norovirus)
NaOH	Hidròxid de sodi
nm	Nanòmetres
NoV	Norovirus
ORF	Pauta de lectura oberta (de l'anglès Open Reading Frame)
Pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès Polymerase Chain Reaction)
PFU	Unitats formadores de placa (de l'anglès Plaque formin units)
pH	Potencial hidrogeniònic
PyV	Poliomavirus
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
RV	Rotavirus
ssDNA	ADN monocatenari (de l'anglès, single strand DNA)
TuPV	Parvovirus de gall d'indi (de l'anglès Turkey Parvovirus)
UV	Radiació ultraviolada
WHO	Organització mundial de la salut (de l'anglès World Health Organisation)

AGRAÏMENTS

Uf! Ha arribat el moment de donar les gràcies a tots els que m'heu acompanyat, d'una o altra manera, durant aquesta tesi... La veritat és que això no és fàcil i espero no oblidar-me a ningú!

En primer lloc, vull donar les gràcies a la Rosina Girones, que em va obrir les portes del grup com a estudiant de pràctiques i que em va oferir la possibilitat de fer una tesi doctoral. Gràcies a tu Rosina, vaig començar aquesta aventura però també ha estat en bona part gràcies a tu que l'he aconseguit finalitzar. M'has donat una "petita" empenta sempre que ho he necessitat. Ha costat, però m'has encomanat el plaer de fer aquesta feina!

El camí ha estat definitivament millor gràcies a tots els companys del laboratori 8, que han fet el dia a dia genial i dels quals he après moltíssim, tan en l'àmbit personal com en el professional. La feina, els cafès del matí i les birres, ja no seran el mateix sense tots vosaltres; Ayalke, Bairiton, Chus, Sílvia, Laura, Sandra, Marta i Persi. Gràcies a tots! Altres ex-membres del grup també han estat importants per a mi durant aquest temps, en especial al principi quan tot el que sabia era extraure àcids nucleics! Parlo d'en Carles, en Néstor i la Pili. Entre tots la incorporació a l'equip va ser molt més agradable.

Inevitablement, el fet de cohabitar amb les Araujos, fa pinya! Vull agrair a la Sílvia Cervero, el Tarik, l'Alejandra i la Sari moltíssims bons moments que hem compartit a dins i fora del laboratori, així com a d'altres companys del departament; Andrés, Nerea, Míriam, Arnau, Raquel, Annes, Martes, Alex, gent de la Fase II en general, i molt especialment a l'Aiora i l'Eli (les xerradetes al passadís sempre alegren el dia a dia!). També vull donar les gràcies a la Rosa Araujo pel seu tracte amable i pels consells que m'ha donat en el seguiment de la tesi.

Durant aquests 5 anys han circulat pel laboratori un nombre considerable de visitants, que ens han deixat el seu granet de sorra. En especial, m'agradaria recordar a la Marize, la Celia i la Adriana, elles van canviar el laboratori amb la seva alegria i optimisme! Igualment, han estat molt importants per mi les diferents estades que he pogut fer al llarg de la tesi. El que he après a tots els nivells no té preu. Vull agrair als grups de la Marize Miagostovich, Celia Barardi, Ana Maria de Roda (molt especialment a la Katharina) i Nigel Grimsley, l'oportunitat de treballar amb ells, la benvinguda i les experiències viscudes. També vull agrair als Drs. Jan Vinjé i l'Apostolos Vantarakis les converses que hem compartit en reunions i congressos, que han contribuït en la meua manera de veure i viure la investigació.

Vull agrair també a tot l'equip de la secretaria del departament de Microbiologia per la seva feina, molt especialment a la Bea per tota la paciència que ha tingut amb nosaltres en la recopilació de targetes d'embarcament, factures d'hotel, etc.

A nivell personal, vull agrair a tota la meva família tot l'esforç, estima i respecte que m'han dedicat sempre; especialment al meu pare, Jordi, la meva mare, Isabel i la meva germana, Laia. Fem molt bon equip! També a les meves àvies, Montse i Pepita, i amb un record molt sentit, als meus avis, Jordi i Jaume. A tots, us estimo. També als pares del Marc, Salvador i M^a Àngels, i a la Berta. Gràcies a tots.

Els amics no són una part menys important en les nostres vides i vull agrair a tota una colla d'imprescindibles, tots els sopars, calçotades, cases rurals, viatges, TOT! el que hem fet junts des de ja fa un munt d'anys. Feu que em pugui considerar una persona afortunada (una abraçada per tots; Élida, Sílvia, Ariadna, Ricky, Glòria, Maria, Juanpe, Cèlia, Oscar, Dani, Marta, Jordi, Alfred, Martina, Víctor, Núria, Andrea i Iban).

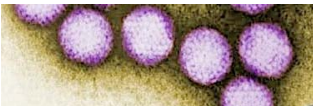
I gràcies a tu, Marc. Tu més que ningú has viscut aquesta tesi de ben a prop; escoltant, comprenent, revisant moltíssimes presentacions i animant-me sempre. Ara toca començar una nova aventura junts, però de moment no ens ha anat gens malament! T'estimo, cuc!

A tots vosaltres, i aquells que em pugui descuidar, gràcies.

CONTINGUTS

Agraïments/Acknowledgments	i-ii
Abreviacions	iii-iv
1. Introducció general	3-36
1.1 Els virus com a contaminants del medi ambient	3
1.2 Principals virus transmesos per aigua i aliments	5
1.2.1 Els norovirus.....	7
1.2.2 El virus de l'hepatitis E.....	8
1.2.3 Els adenovirus humans.....	10
1.3 Principals vehicles en la transmissió ambiental de virus patògens.....	13
1.3.1 Els aliments.....	17
1.4 El control de la qualitat microbiològica d'aigua i aliments.....	18
1.4.1 Mètodes de concentració.....	19
1.4.2 Mètodes de detecció i quantificació.....	21
1.5 Inactivació natural dels virus al medi ambient: llum solar.....	23
1.6 Tractaments de desinfecció d'aigua	25
1.6.1 Tractaments químics: clor	27
1.6.2 Tractaments físics: radiació ultraviolada.....	28
1.6.3 Microorganismes models.....	30
1.7 Virus humans i animals com a eines de MST.....	31
1.7.1 Indicadors virals de contaminació fecal d'origen humà.....	32
1.7.2 Indicadors virals de contaminació fecal d'origen animal.....	34
1.7.3 Els parvovirus d'aus.....	35
2. Objectius/Objectives	39-40
• Català.....	39
• English.....	40
3. Publicacions	43-50
3.1 Llistat de les publicacions.....	43
3.2 Informe de coautoria.....	45
3.3 Informe del factor d'impacte de les publicacions.....	49

❖ Capítol 1: Inactivació natural de virus a l'aigua i en aliments vegetals	53-102
• Resum estudi 1.....	53
• Estudi 1: "Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters"	55
• Resum estudi 2	75
• Estudi 2: "Multicenter collaborative trial evaluation of a method for detection of human adenoviruses in berry fruit".....	77
• Resum estudi 3.....	85
• Estudi 3: "Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces"	87
❖ Capítol 2: Tractaments de desinfecció de virus.....	105-138
• Resum estudi 4.....	105
• Estudi 4: "Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus and human JC polyomavirus by chlorine in seawater"	107
• Resum estudi 5.....	115
• Estudi 5: "Chlorine disinfection of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water"	117
• Resum estudi 6.....	127
• Estudi 6: "UV inactivation of viral contaminants in the environment"	129
❖ Capítol 3: Desenvolupament d'un nou mètode per a identificar contaminació fecal d'aviram al medi ambient	141-146
• Resum estudi 7.	141
• Estudi 7: "A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment"	143
4. Discussió general	149-164
5. Conclusions	167-170
• Català.....	167
• English.....	169
6. Referències	173-242
7. Annex	245
• Altres publicacions no incloses a la tesi.....	245



1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1 Els virus com a contaminants del medi ambient.

Les poblacions humanes i animals excreten una gran diversitat de virus patògens en les seves femtes i orina, de manera que l'aigua residual que generen representa un dels principals vehicles de la disseminació de patògens a les aigües superficials, subterrànies o costaneres i consegüentment, als aliments (Carter, 2005). La contaminació del medi ambient suposa un risc greu de salut pública. S'ha estimat que en el conjunt del planeta, aproximadament 3.000 milions de persones no disposen d'aigua potable i que el 95% de l'aigua residual domèstica és abocada al medi ambient sense tractar (Langford et al. 2005).

Tot i les mesures destinades per a millorar la qualitat de l'aigua i la seguretat alimentària, recurrentment s'identifica, a nivell mundial, brots causats per virus transmesos per aigua o aliments (Koroglu et al. 2011; Nenonen et al. 2012; Fournet et al. 2012; Carvalho et al. 2012). Addicionalment, la presència d'aigua residual al medi ambient no només suposa un risc per la seva càrrega microbiològica, si no que també interacciona amb l'entorn ocasionant desequilibris en ecosistemes delicats com els esculls de corall (Reopanichkul et al. 2009) i suposa una font important de contaminants com nitrogen, fòsfor i metalls pesants (Gwenzi i Munondo, 2008).

A nivell mundial, les malalties transmeses per l'aigua o aliments constitueixen un problema que en els darrers 20 anys, lluny de disminuir per la millora de les condicions higièniques de molts països, s'ha complicat considerablement (Newell et al. 2010). Entre els principals factors responsables d'aquesta tendència podem destacar els següents:

- Creixement i envelliment de la població humana.
- Comerç internacional de vegetals, carn, aliments exòtics i animals de granja entre països amb estàndards microbiològics diferents.
- Canvis en certes pràctiques agrícoles per abaratir costos.
- Canvi climàtic.

Molts dels virus presents a l'aigua residual no disposen d'embolcall nuclear i per tant, les seves partícules víriques són molt estables en condicions ambientals (Rzetzuka i Cook, 2004). A més, ocasionalment aquests patògens no són eliminats de manera efectiva pels tractaments de desinfecció aplicats habitualment a les plantes depuradores, basats en l'eliminació de paràmetres bacterians i s'ha detectat virus infecciosos en aigua residual tractada (Rodríguez-Manzano et al. 2012).

Les fonts de contaminació dels virus amb transmissió ambiental són molt diverses i poden classificar-se segons si el seu origen és puntual o difós. Les fonts de contaminació puntuals són habitualment més fàcils d'identificar i s'originen per l'excreció directa dels patògens al medi o per les descàrregues d'aigua residual tractada o sense tractar. D'altra banda, les fonts de contaminació difoses s'originen principalment durant episodis de precipitacions que poden rentar el sòl (tant urbà com terres de cultiu). S'ha demostrat que la població pot contraure infeccions per vies molt diverses (Figura 1), per exemple pel consum o contacte amb aigua contaminada, consum de mol·luscs bivalves crus o poc cuinats que hagin estat cultivats en aigües contaminades o consum de vegetals irrigats amb aigües contaminades o abonats amb biosòlids.

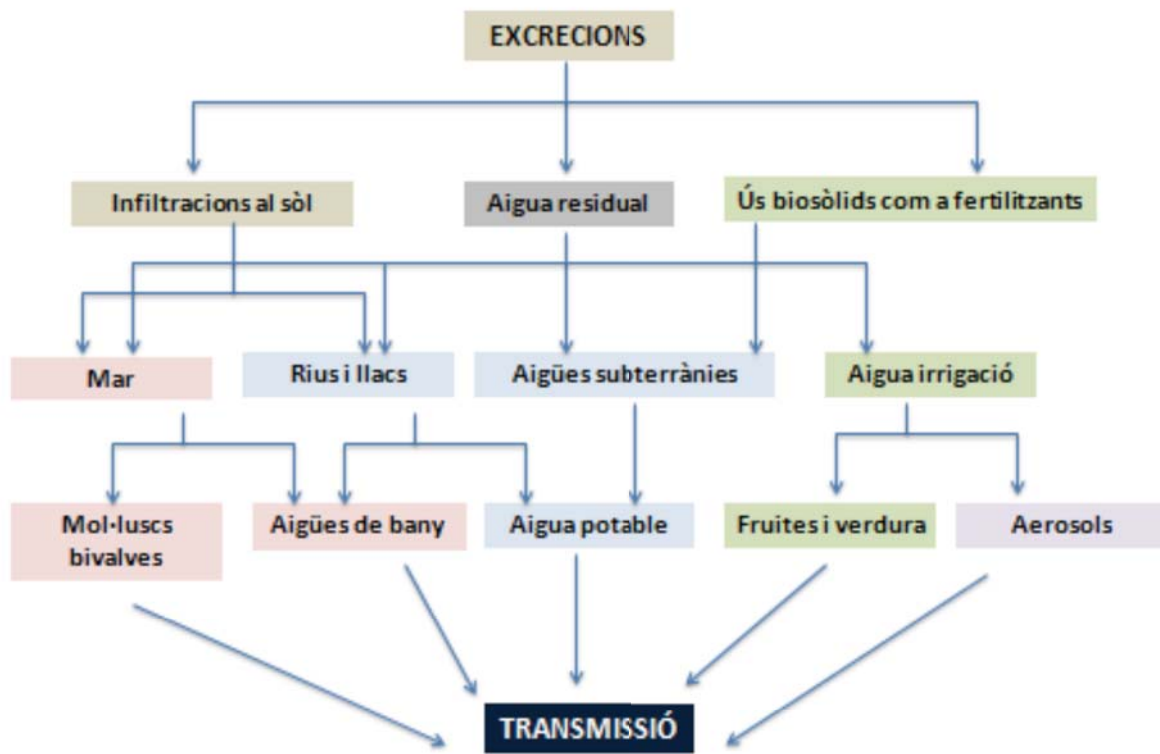


Figura 1. Vies de disseminació dels virus entèrics humans i animals al medi ambient. Modificat a partir de MeInick et al. 1978.

1.2 Principals virus humans patògens transmesos per aigua i aliments.

Els virus patògens que es transmeten per l'ús o consum d'aigua i aliments contaminats són molt diversos i s'agrupen en relació als símptomes que ocasionen. Els més freqüents solen causar gastroenteritis i hepatitis, però també n'hi ha d'altres que repliquen a l'intestí humà i originen la malaltia un cop han migrat a altres òrgans, com per exemple al sistema nerviós central. Tot i que generalment es caracteritzen per provocar infeccions asimptomàtiques o de pronòstic lleu, en alguns casos i en general en grups de risc com els nens, els ancians, les dones embarassades o els pacients immuno-suprimits poden produir complicacions més greus i ocasionalment fins i tot la mort (Koopmans M i Duizer E. 2004).

La majoria de virus humans transmesos per aigua i aliments pertanyen a les famílies *Adenoviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae*, *Picornaviridae* i *Reoviridae* (Taula 1). Entre els més importants, podem distingir virus amb genoma d'ADN com els adenovirus (AdV) i els poliomavirus (PyV), i virus amb genoma d'ARN com els virus de la hepatitis A (HAV) i E (HEV), norovirus (NoV), rotavirus (RV), enterovirus (EV) i astrovirus (AstV) entre altres.

Cada una d'aquestes famílies inclou virus que poden diferir en la seva persistència i estacionalitat al medi ambient, així com en la seva patogenicitat. Els adenovirus humans (HAdV) i els poliomavirus humans JC i BK (JCPyV i BKPyV) es detecten al llarg de l'any a una gran diversitat de mostres ambientals amb una elevada prevalença a totes les àrees geogràfiques estudiades (Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2000). Pel contrari, altres virus com els EV, NoV, RV i AstV, han demostrat una prevalença més variable que depèn de l'època de l'any i la presència de brots epidèmics a la població (Okoh et al. 2010). La presència del HAV varia en funció de l'àrea geogràfica estudiada, essent molt freqüent en aigua residual urbana de zones endèmiques. El HEV, com en el cas del HAV, és més abundant en zones amb condicions de sanejament pobres que en àrees amb un nivell sanitari elevat.

Molts dels virus considerats contaminants ambientals són responsables d'infeccions subclíniques i ocasionen símptomes clínics en una petita part de la població afectada. Alguns virus, com certs HAdV i PyV produeixen infeccions durant la infantesa que poden esdevenir infeccions persistents. L'exposició, fins i tot en dosis molt baixes, a certs virus com els Norovirus (NoV), pot ocasionar la infecció i malaltia dels individus afectats (Teunis et al. 2008). En tots els casos, l'evolució de la infecció depèn de factors com la via de transmissió, la dosi infecciosa del patogen, l'edat, la salut i l'estat immunològic del pacient i finalment, la possibilitat d'accedir a atenció sanitària.

Nom	Família (gènere)	Transmissió per aliments	Mida (genoma)	Malaltia associada
Poliovirus, Enterovirus humans (A-D)	<i>Picornaviridae</i> (<i>Enterovirus</i>)	Si, principalment aigua i marisc	28 nm (ssRNA)	Principalment asimptomàtic. Poden ocasionar cardiopaties, meningitis, dolors musculars
Aichivirus	<i>Picornaviridae</i> (<i>Kobuvirus</i>)	Si, marisc	28 nm (ssRNA)	Gastroenteritis
Virus de la hepatitis A	<i>Picornavirus</i> (<i>Hepatovirus</i>)	Si	28 nm (ssRNA)	Hepatitis, lleu en individus joves
Virus de la hepatitis E	<i>Hepeviridae</i> (<i>Hepevirus</i>)	Si, principalment aigua i carn de porc crua	34 nm (ssRNA)	Hepatitis, greu en dones embarassades
Rotavirus	<i>Reoviridae</i> (<i>Rotavirus</i>)	Rar, sovint aigua	70 nm (dsRNA)	Diarrea, freqüent en individus joves, disminueix en adults i habitual en la vellesa
Adenovirus (A-G)	<i>Adenoviridae</i> (<i>Mastadenovirus</i>)	Desconegut	100 nm (dsDNA)	Gastroenteritis, infeccions respiratòries i conjuntivitis
Saporovirus	<i>Caliciviridae</i> (<i>Saporovirus</i>)	Rar, principalment marisc	34 nm (ssRNA)	Gastroenteritis
Norovirus	<i>Caliciviridae</i> (<i>Norovirus</i>)	Si	34 nm (ssRNA)	Gastroenteritis, vòmits explosius
Astrovirus	<i>Astroviridae</i> (<i>Mamastrovirus</i>)	Ocasionalment, aigua i marisc	28 nm (ssRNA)	Gastroenteritis, principalment en nens

Taula 1. Característiques dels principals grups de virus contaminants. Modificat a partir de Carter, 2005.

1.2.1 Els norovirus

Els norovirus pertanyen a la família *Caliciviridae*, que inclou diversos gèneres: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus* i els recentment proposats *Nebovirus* (Patel et al., 2009). El gènere norovirus inclou els patògens més importants per a l'home. Són virus petits (27-30 nm), no embolcallats amb simetria icosaèdrica que tenen un genoma lineal d'ARN de cadena senzilla (ssRNA) amb polaritat positiva d'entre 7,3 i 8,3 kb. El genoma conté tres pautes obertes de lectura (ORF1 – ORF3) que codifiquen de 5' a 3' per per gens no estructurals i estructurals (Figura 2). A l'extrem terminal 5' conté una proteïna vírica unida covalentment (VPg), mentre que a l'extrem 3' hi ha una cua poli-adenilada (poli-A). L'ORF1 es tradueix en una poliproteïna que serà digerida per una proteasa vírica (PRO) per a donar lloc a 6 proteïnes més: p48, nucleòsid-trifosfatasa (NTPasa), VPg, una RNA polimerasa RNA-depenent (POL) i la pròpia proteasa vírica. La càpsida conté 90 dímers de VP1 formant una coberta de la qual surten 90 capsòmers a mode de protuberàncies de forma arquejada. Aquests capsòmers es troben disposats de tal manera que formen 32 cavitats en la superfície de la partícula viral.

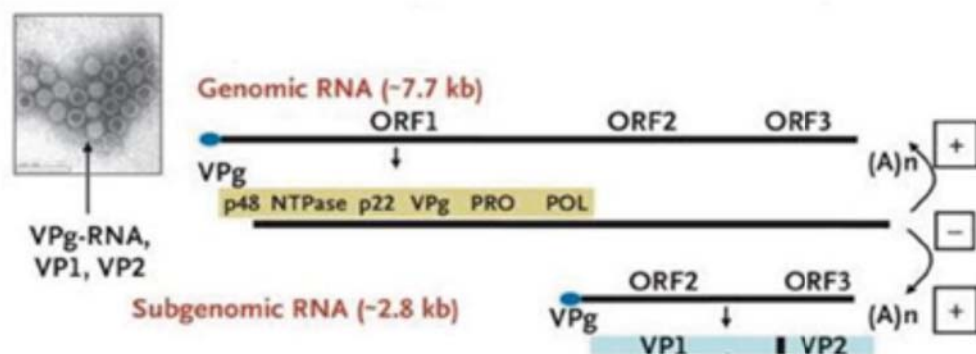


Figura 2. Organització genòmica dels NoV (Glass et al. 2009).

El gènere *Norovirus* presenta una elevada variabilitat genètica que s'explica per mutacions puntuals i per recombinació entre diferents fragments homòlegs d'ARN que, per coinfecció, hagin entrat a una mateixa cèl·lula. Aquest gènere es subdivideix en 5 genogrups i diversos serotips. Entre ells, els genogrups GI, GII i GIV, que inclouen més de 20 genotips de NoV, infecten específicament humans (Zheng et al. 2006). Tanmateix, la majoria d'infeccions a les poblacions humanes són causades pels genogrups GI i GII. Donada aquesta alta variabilitat, els mètodes per a la detecció dels NoV poden no ser suficientment efectius per a amplificar les variants menys freqüents de manera que la seva prevalença pot estar subestimada (La Rosa et al. 2008).

Els norovirus són els principals responsables de brots de gastroenteritis a tot el món causant el 50% dels casos totals de gastroenteritis i el 90% dels casos de gastroenteritis vírica (Patel et al. 2009). La major part de brots causats per norovirus tenen lloc en hospitals, llars d'infants, restaurants i creuers. En general, els NoV poden transmetre's entre persona-persona i també per contacte amb aerosols formats durant el vòmit (Blanton et al. 2006; Yen et al. 2011), així com per consum o contacte amb aliments, aigua i superfícies contaminades fecalment o per vòmit, (Rutjes et al. 2006; D'Souza et al. 2006;). El virus es transmet fàcilment ja que la dosi infecciosa és baixa (entre 10 i 100 partícules víriques), donada la seva resistència a la desinfecció i la seva estabilitat al medi ambient (Whitehead i McCue, 2010; D'Souza et al. 2006; Repp i Keene, 2012). El període d'incubació oscil·la entre 24 i 48 hores, i la malaltia es manifesta clínicament per l'aparició brusca de nàusees (79%), vòmits (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), febre (37%) i dolor abdominal (30%) (Kaplan et al., 1982).

1.2.2 El virus de l'hepatitis E

El virus de la hepatitis E és petit (27-34 nm), icosaèdric i no embolcallat, amb un genoma d'ARN de cadena senzilla d'aproximadament 7.2 kb. Es classifica dins de la família *Hepeviridae* sent l'únic membre del gènere *Hepevirus*. El genoma de l'HEV està format per una única cadena d'ARN de polaritat positiva poli-adenilada a l'extrem 3' carboxi-terminal i que presenta un cap a l'extrem 5' amino-terminal amb una 7-metilguanosina (Kabrane-Lazizi et al., 1999). El genoma està organitzat en 3 pautes de lectura obertes, diferents i solapades entre sí (Figura 3). L'ORF1 es troba localitzada a l'extrem 5' i codifica per a proteïnes enzimàticament actives implicades, probablement, en la replicació viral i el processament proteic. L'ORF2 es localitza prop de l'extrem 3' del genoma i codifica per a una proteïna estructural. L'ORF3 codifica per una proteïna de funció reguladora que sembla desenvolupar diverses funcions en l'establiment i progressió de la infecció i que està localitzada al centre del genoma del HEV (Chandra, 2010). L'ORF3 es caracteritza per estar solapada a l'extrem 5' amb l'ORF1 i a l'extrem 3' amb l'ORF2.

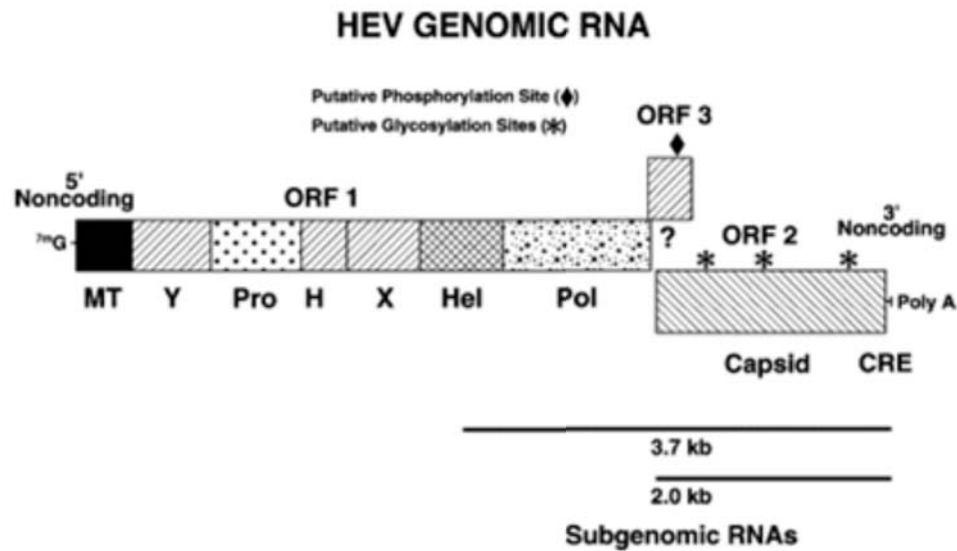


Figura 3. Organització del genoma del HEV en tres pautes obertes de lectura (Purcell i Emerson, 2008).

El HEV es pot classificar en 4 genotips reconeguts (Figura 4) i dos potencials nous genotips. El genotip 1 consta de soques africanes i asiàtiques amb una diversitat molt baixa. El genotip 2 està format per la soca Mexicana i algunes soques aïllades a Nigèria. El genotip 3 el formen soques nord-americanes, europees, japoneses i argentines. El genotip 4 està format per soques xineses i japoneses. A més dels 4 genotips esmentats, el genotip aïllat al 2001 que infecta a aus (Haqshenas et al. 2001) s'ha classificat posteriorment com a representant del genotip 5. Tot i que s'ha descrit 5 genotips confirmats, la teoria més acceptada només reconeix un sol serotip (Mushahwar, 2008).

El HEV és una causa important d'hepatitis aguda molt freqüent en regions amb sistemes de distribució d'aigua inadequats i condicions sanitàries pobres (Purcell i Emerson, 2008; Guthman et al. 2006; Kamar et al. 2012). S'ha descrit una major proporció d'afectats entre joves adults d'entre 15 i 40 anys, tot i que la mortalitat és més elevada en dones embarassades, especialment durant el tercer trimestre. El HEV és el responsable de més del 50% de les hepatitis agudes virals que tenen lloc en països en vies de desenvolupament, que es consideren endèmics (Yarborough, 1999). En aquestes regions provoca casos esporàdics d'hepatitis i brots epidèmics. Els brots solen associar-se amb el consum d'aigua contaminada fecalment (Schlauder i Mushahwar, 2001). També és típica l'aparició de brots després de desastres naturals o en situacions de desplaçaments massius de refugiats.

Tot i que tradicionalment, els casos en països industrialitzats s'han relacionat amb viatges a països en vies de desenvolupament, cal destacar que cada vegada hi ha més evidències de casos d'hepatitis causats per soques del HEV endèmiques no importades (Pina et al. 2000; Clemente-Casares et al. 2003; Ijaz et al. 2005; Waar et al. 2005, Pérez-Gracia et al. 2007).

La presència del HEV s'ha identificat en aigua i animals com per exemple porcs, pollastres, conills, rates i peix (Rutjes et al. 2009, Rodríguez-Manzano et al. 2010; Cossaboom et al. 2012). Fins avui, les seqüències aïllades a partir de porcs pertanyen als genotips 3 i 4. A més, el virus de la hepatitis E s'ha aïllat a partir de porcs destinats al consum humà en diferents països no endèmics (Feagins et al. 2008).

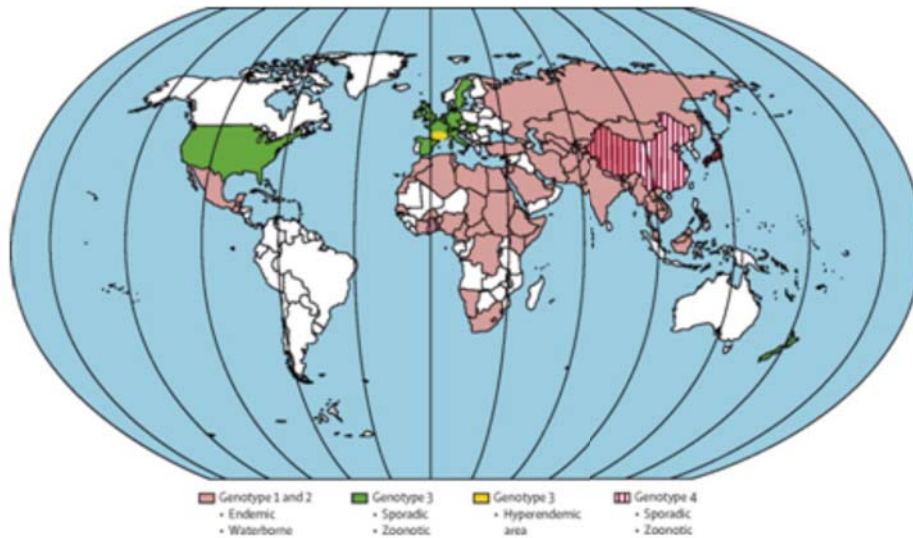


Figura 4. Distribució geogràfica de cadascun dels genotips del HEV (Kamar et al. 2012).

La seqüenciació de les soques aïllades a partir de mostres de porcs ha demostrat que les soques porcines són genèticament indiferenciables de certes soques humanes aïllades a partir de mostres clíniques de pacients humans amb hepatitis aguda (Meng et al., 1997; Hsieh et al., 1999; Pina et al., 2000; Okamoto et al., 2001). A més, s'ha descrit casos de persones que han desenvolupat hepatitis E després de consumir carn de porc senglar i de cérvol crua o poc cuinada (Tei et al. 2004). Tenint en compte aquests indicis, es considera que el porc pot ser un reservori important del HEV i que els casos de hepatitis E a països industrialitzats no relacionats amb viatges poden ser d'origen zoonòtic (Vasickova et al. 2009).

1.2.3 Els adenovirus humans

Els adenovirus (AdV) són virus icosaèdrics no embolcallats amb un genoma d'ADN bicatenari lineal d'entre 36-45 kb que es classifiquen dins la família *Adenoviridae*. Infecten a l'ésser humà i a un ampli rang d'espècies animals. El seu genoma (Figura X) codifica com a mínim 10 polipèptids

estructurals diferents i 35 proteïnes no estructurals (Wold i Horwitz, 2007). Presenta una proteïna de 55 KDa unida covalentment a l'extrem 5' de cada una de les cadenes i repeticions invertides d'entre 103 i 165 pb als extrems. Els dos extrems de les cadenes poden funcionar com a orígens de replicació i les dues cadenes de ADN es transcriuen.

Els gèneres de la família són el gènere Aviadenovirus (espècie tipus Adenovirus A aviar), el gènere Atadenovirus (espècie tipus Adenovirus D ovi), el gènere Mastadenovirus (espècie tipus Adenovirus C humà) i finalment el gènere Siadenovirus (espècie tipus Adenovirus de la granota).

Les partícules víriques presenten una càpsida complexa amb un diàmetre d'aproximadament 100 nm, amb un pes molecular d'entre 175 i 185 KDa. La partícula completa està constituïda per, com a mínim, 10 polipèptids estructurals diferents. La càpsida està constituïda per 252 capsòmers dels quals en surten unes projeccions filamentoses característiques. Els 12 vèrtex del virió contenen un capsòmer amb una projecció en forma d'antena (fibra), que està envoltat per altres 5 capsòmers formant un pentó (Figura 5).

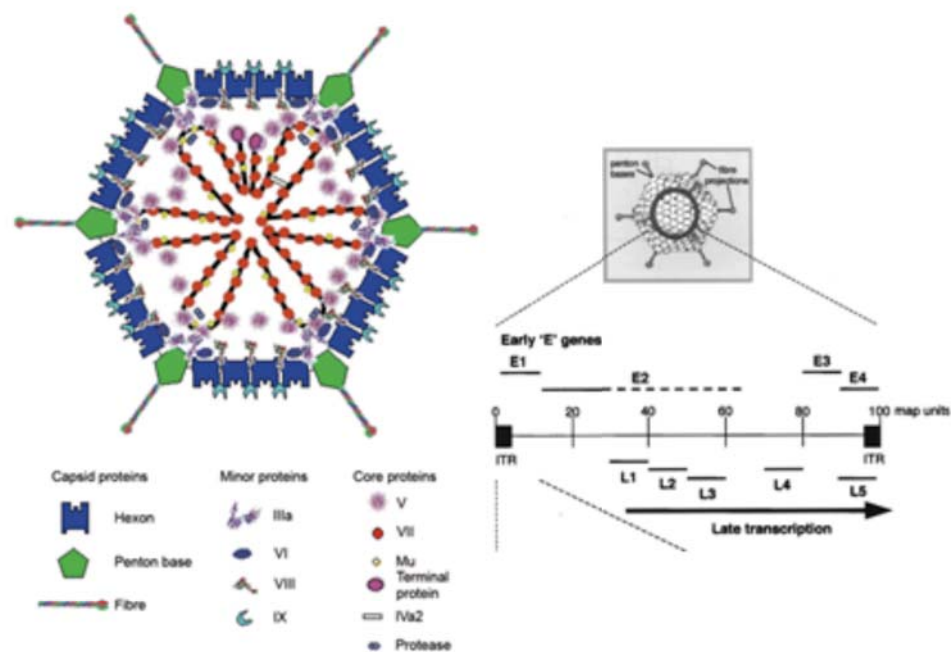


Figura 5. Esquerra. Esquema de la estructura dels adenovirus. Russell, 2009. **Dreta.** Organització genòmica dels adenovirus tipus-5 (Shenk, 1996).

Les infeccions per HAdV estan globalment esteses i sovint són causants de malalties respiratòries tot i que també són responsables d'altres malalties com gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis i afeccions dèrmiques en funció del serotip (Taula 2). Al voltant d'un 60% de les infeccions per HAdV tenen lloc en nens menors a 4 anys i entre el 47-55% de les infeccions són asimptomàtiques. La transmissió dels adenovirus pot tenir lloc a partir de casos esporàdics o en brots epidèmics però la

via de transmissió depèn en bona part del serotip, per exemple per contacte amb secrecions orgàniques, transmissió hídrica o transmissió fecal-oral (Hunter, 1997). S'ha descrit brots de conjuntivitis causats per infeccions amb HAdV relacionades amb l'exposició a aigua contaminada, habitualment durant l'ús recreatiu (Crabtree et al. 1997).

Els serotips HAdV40 i HAdV41, inclosos al subgrup F, són un dels principals agents causants de gastroenteritis en nens petits, menors de dos anys, i es transmeten per la via fecal-oral, essent excretats en concentracions molt elevades. La incubació pot durar entre 3 i 10 dies i els símptomes clínics, principalment diarrea aquosa, poden allargar-se fins a una setmana.

Els adenovirus són detectats molt freqüentment en mostres ambientals amb presència de contaminació fecal i són el patogen més freqüentment detectat en mol·luscs bivalves (Pina et al. 1998; Papapetropoulou i Vantarakis, 1998; Chapron et al. 2000).

Donada l'elevada prevalença dels HAdV en mostres ambientals i aliments, la seva elevada estabilitat i la seva especificitat d'hoste, aquests virus han estat proposats com a indicadors virals de contaminació fecal al medi (Pina et al. 1998; Puig et al. 1994). Molts adenovirus poden ser excretats durant mesos o anys en femtes, sense produir símptomes clínics (Wadell et al. 1988).

Malaltia	Individus de risc	Serotips
Faringitis aguda	Nens petits	1-3, 5-7
Febre faringo-conjuntiva	Nens en edat escolar	3, 7, 14
Malalties respiratòries agudes	Militars	3, 4, 7, 14, 21
Pneumònia	Nens petits	1-3, 7
Pneumònia	Militars	4, 7
Querato-conjuntivitis	Tots	8, 11, 19, 37
Síndrome <i>Pertussis-like</i>	Nens petits	5
Cistitis hemorràgica aguda	Nens petits	11, 21
Gastroenteritis	Nens petits	40, 41
Meningo-encefalitis	Nens i persones immuno-suprimides	7, 12, 32
Hepatitis	Nens, trasplantats de fetge	1, 2,
Miocarditis	Nens	Desconegut

Taula 2. Infeccions provocades per diversos serotips de HAdV (Wold i Horwitz, 2007).

1.3 Principals vehicles en la transmissió ambiental de virus patògens

L'augment sostingut de la població humana mundial està convertint l'aigua potable en un dels bens més escassos de cara als propers segles (Pereira et al. 2009). La majoria de residus generats en la nostra societat, acaben sent incorporats a ambients aquàtics (rius, llacs, aigües subterrànies i mars) a través de l'abocament directe d'aigües residuals urbanes, agrícoles o industrials tractades o sense tractar, o bé a través de fonts de contaminació difuses. La presència de virus patògens a diferents ambients aquàtics ha estat àmpliament descrita (Taula 3) i cada any s'identifiquen nous brots de gastroenteritis relacionats amb l'ús o consum d'aigua contaminada (ter Waarbeek et al. 2010; Riera-Montes et al. 2011; Nenonen et al. 2012). La majoria dels virus entèrics es detecten en aigua residual, fins i tot després de ser tractada (Pina et al. 1998; Lodder et al. 1999; Wyn-Jones et al. 2000; Le Cann et al. 2004, Rodríguez-Manzano et al. 2012).

Els virus patògens són excretats a través de les femtes, orina, saliva, suor i llàgrimes, sovint en concentracions elevades i es disseminen al medi ambient representant un risc de reinfecció per a les poblacions (de Roda Husman i Bartram, 2007). En general, les principals matrius ambientals que poden estar contaminades amb virus patògens són l'aigua residual, aigües superficials, costaneres, biosòlids i fertilitzants, i de manera especialment rellevant pel nombre de brots que ocasionen, aliments com vegetals i mol·luscs bivalves (Carter, 2005).

Els virus són paràsits estrictes i no disposen de metabolisme ni de requeriments nutricionals per a la seva subsistència. No obstant, tenen un grau de robustesa que els permet mantenir-se infectius al medi ambient entre la infecció d'un hoste i el següent. L'estabilitat de les partícules víriques determina el període durant el qual la contaminació fecal ambiental suposa un risc de cara a la salut pública, i l'eficàcia dels diferents tractaments de desinfecció d'aigua o aliments (Carter, 2005). Per tant, és cabdal estudiar l'estabilitat dels virus per a avaluar el risc de transmissió ambiental d'aquests patògens.

Hi ha evidències que indiquen que la transmissió dels virus per aigua o aliments contaminats pot estar afectada de manera important per diversos factors ambientals com la temperatura i la humitat (Bertrand et al. 2012) i per factors meteorològics com ara l'estació de l'any (Badawy et al. 1990) o la pluviositat. La incidència de cadascun d'aquests factors dependrà del tipus d'aigua o aliment i de l'espècie concreta de virus. Les interaccions de les partícules víriques amb les diferents matrius són extremadament diverses i tindran molta influència en la inactivació natural dels patògens i en la seva desinfecció.

La necessitat de depurar l'aigua residual per a evitar la contaminació ambiental és, doncs, un fet inqüestionable. Actualment, els mecanismes responsables de la inactivació de virus durant els tractaments de l'aigua residual no estan ben caracteritzats i probablement diversos factors ambientals poden alterar l'efectivitat del procés.

S'ha suggerit que l'aigua dels sistemes de distribució pot ser responsable d'entre el 14 i el 40% de les infeccions gastrointestinals i els esforços per a assegurar la qualitat microbiològica d'aquest recurs són vitals (Payment et al. 1997). La qualitat de l'aigua de beguda depèn considerablement de la font, que s'ha d'obtenir el més neta i allunyada de punts de contaminació possible. Actualment, és recomana que els tractaments que s'apliquin per a la desinfecció d'aigua assoleixin l'eliminació del 99.99% dels patògens presents, però malauradament els estàndards microbiològics actuals es basen exclusivament en indicadors bacterians.

Els processos de filtració poden assolir una reducció d'un logaritme dels contingut microbiològic i gràcies a tractaments de desinfecció actius es pot arribar a obtenir una reducció de 3 logaritmes (per exemple mitjançant l'ús de clor, ozó o radiació ultraviolada). Entre aquests tractaments el clor ha estat tradicionalment el més utilitzat a unes concentracions d'aproximadament 1 mg/l durant 60-240 minuts de contacte (Thurston-Enriquez et al. 2003) i habitualment, l'aigua en els sistemes de distribució té una concentració de clor residual de 0.2 mg /l per complir amb els requeriments per al control dels bacteris coliforms. Certs estudis han demostrat la presència de virus entèrics en aigua de beguda (1-20 PFU per 1000l) (Gerba i Rose, 1990; Payment et al. 1997; Mena i Gerba, 2009) i s'ha dut a terme estudis per avaluar la correlació entre la presència de ARN de diversos virus a l'aigua de distribució, com per exemple els astrovirus, amb el risc d'infecció gastrointestinal (Gofti-Laroche et al. 2003). La OMS estableix unes recomanacions, seguides per molts països, considerant el risc de contaminació viral acceptable. Es considera acceptable un nivell de risc d'infecció de 1×10^{-4} per persona i any (WHO, EPA 1991; Staatscourant, 2001). En certs estudis, pel que fa a les infeccions de rotavirus, la reducció de 4 logaritmes va demostrar ser coherent amb aquest nivell de risc (Raphael et al. 1985; Gerba et al. 1996). No obstant, estimacions realitzades amb enterovirus suggereixen que caldria una reducció més elevada per assolir el mateix nivell de risc d'infecció (Regli et al. 1991). En aquest aspecte, cal destacar que mètodes de cultiu cel·lular poc eficients poden infravalorar els nivells de virus presents a l'aigua, subestimant el risc d'infecció. És important disposar de més dades experimentals per a determinar nivells de contaminació acceptables i segurs per a la població.

La major part de brots deguts a aigua de beguda documentats, han estat atribuïts a situacions de precipitacions elevades o d'inundacions (Cannon et al. 1991; Kukkula et al. 1997, 1999) o bé pel mal funcionament dels processos de tractament (Kaplan et al. 1982; Bitton, 1999).

L'estabilitat de les partícules víriques contaminants d'ambients aquàtics és molt variable en funció de la qualitat matriu i del virus analitzat. No obstant, certs estudis han demostrat que els virus entèrics poden mantenir-se estables a l'aigua de riu durant períodes de temps prolongats i que certs paràmetres fisico-químics, com la conductivitat i la terbolesa de l'aigua, poden condicionar o afavorir l'estabilitat dels patògens (Kutz i Gerba, 1988; Hurst et al. 1989).

L'abocament d'aigua contaminada al mar permet la disseminació dels virus patògens a les aigües costaneres i conseqüentment als mol·luscs bivalves filtradors que es cultiven en zones contaminades (Chung et al. 1996; Griffin et al. 1999; revisat per Lees, 2000). La capacitat de determinats virus contaminants de mantenir la seva estabilitat durant períodes considerables en aigües costaneres ha estat documentada (Slomka i Appleton, 1998; Enriquez et al. 1995). Tanmateix, hi ha evidències que indiquen que l'aigua de mar conté agents biològics amb efecte antiviral que, en certes situacions, poden afectar de manera dràstica a l'estabilitat dels patògens que contaminen les aigües costaneres (Fujioka et al. 1980).

Es necessari optimitzar els tractaments de desinfecció de l'aigua per a disminuir la disseminació de virus al medi ambient i als aliments. També cal disposar de dades experimentals acurades sobre l'estabilitat dels virus entèrics patògens en diferents matrius i condicions per a identificar escenaris crítics per a la seva transmissió, desenvolupar indicadors vírics alternatius de contaminació fecal, així com determinar quin són els nivells d'acceptació més adients d'aquests indicadors.

Virus	Tipus de mostra	Àrea geogràfica	Concentració	% mostres positives	Referència
	Aigua residual		10^4 - 10^7 GC/100ml	100	
	Aigua residual, secundari	Catalunya	10^3 GC/100ml	100	Bofill-Mas et al. 2006
	Biosòlids		10^4 - 10^7 GC/100g	100	
HAdV	Aigua riu		10^1 - 10^4 GC/l	90	Albinana-Gimenez et al. 2009
	Aigua mar		10^1 - 10^3 GC/l		Calgua et al 2008
	Aigua residual	Estats Units	10^4 - 10^5 GC/100ml		Fong et al. 2010
	Aigua residual, terciari		10^3 - 10^4 GC/100ml		
	Aigua residual	Catalunya	10^5 GC/100 ml	100	Bofill-Mas et al. 2006
	Biosòlids		10^3 - 10^5 GC/100g	100	
	Aigua riu		10^0 - 10^3 GC/l	90	Albinana-Gimenez et al. 2009
JC PyV	Aigua residual	Brasil	10^4 - 10^7 GC/100ml	96	Fumian et al. 2010
	Aigua residual, secundari		10^4 - 10^5 GC/100ml	39	
	Aigua riu	Japó	10^2 - 10^3 GC/l	11	Haramoto et al. 2010
HAV	Aigua residual	Catalunya	10^4 GC/100ml		Rodriguez-Manzano et al. 2010
HEV	Aigua residual		10^3 GC/100ml		Rodriguez-Manzano et al. 2010
NoV	Aigua residual	Regne Unit	10^6 GC/100ml		Laverick et al. 2004
PAdV BPyV	Aigua residual escorxador	Catalunya	10^3 GC/ml		Hundesa et al. 2009 Hundesa et al. 2010

Taula 3. Exemples de la concentració de virus a l'aigua residual, aigua de riu i aigua de mar per QPCR. Els resultats s'expressen en còpies genòmiques. A partir de Girones et al. 2010, Hundesa et al. 2009 i Hundesa et al. 2010.

1.3.1 Els aliments com a vehicles de la transmissió d'infeccions víriques

Els aliments són una de les principals fonts de transmissió de virus humans patògens (Koopmans i Duizer, 2004). Cada any es descriuen nous brots associats al consum d'aliments contaminats, generalment al consum de mol·luscs bivalves (Vivancos et al. 2009; Ethelberg et al. 2010; Gallot et al. 2011; Smith et al. 2012). Determinats productes agrícoles com els fruits silvestres i altres vegetals són, després del marisc, el grup d'aliments que més freqüentment es relacionen amb l'aparició de brots. Recentment, a Europa s'ha identificat brots de gastroenteritis vírica causats pel consum d'enciams (Ethelberg et al. 2010), tomàquets secs contaminats (Gallot et al. 2011) i gerds congelats (Sarvikivi et al. 2012). Certs estudis recents han determinat la presència d'àcids nucleics de norovirus entre el 6,6 -34,5% dels fruits silvestres i entre el 28-50% dels vegetals de fulla verda analitzats a Bèlgica, Canadà i França (Baert et al. 2011).

Els aliments vegetals molt sovint són manipulats abans d'arribar al consumidor, la qual cosa pot representar un punt important d'introducció de patògens en les cadenes de producció d'aliments. A més, els fruits i altres vegetals, com els enciams i els tomàquets, es consumeixen poc processats o molt habitualment crus i tenen un gran contingut en aigua que absorbeixen del sòl durant el seu creixement. Al contrari que altres aliments, sovint es consumeixen sense pelar, una acció que en molts casos contribueix a reduir el contingut microbiològic potencialment present a la seva superfície (Carter, 2005).

Els productes agrícoles poden contaminar-se de diverses maneres al llarg de la cadena de producció. Durant el cultiu, els conreus poden contaminar-se mitjançant la irrigació per aspersió amb aigua contaminada, però també poden absorbir els virus patògens per les arrels o a través de ferides (Urbanucci et al. 2009). En aliments com les maduixes, que creixen propers a terra, la contaminació pot originar-se per contacte de la superfície de l'aliment amb aigua o fertilitzants contaminats (Appleton, 2000). A més, la contaminació d'aliments també pot ser deguda a males pràctiques durant el processament dels productes o bé en el punt de venda o consum (Boxman et al. 2009), com per exemple per contaminació creuada amb instruments contaminats o per la manipulació en males condicions d'higiene.

Els fertilitzants, d'origen humà o animal, són constituïts per materials fecals i orina produïts per l'home i tractats a les depuradores, o per animals localitzats en ambients artificials com per exemple granges o zoològics (Rodríguez-Lázaro et al. 2012) i poden constituir una font de patògens important als productes agrícoles. Els fertilitzants animals són emmagatzemats durant llargs períodes i s'utilitzen per a abonar sòl d'ús agrícola. La inactivació de les partícules víriques contaminants que es troben als fertilitzants poden diferir segons el tipus de virus i les condicions ambientals, però

poden ser estables durant molt temps, fins i tot anys, a temperatures baixes al voltant dels 4°C, especialment en absència de radiació ultraviolada (Rzetzuka i Cook, 2004).

Un cop adherits a la superfícies de fruits i altres vegetals, els virus poden ser estables, un cop recol·lectats, durant dies i fins i tot setmanes (revisat per Carter, 2005). Tanmateix, l'estabilitat de les partícules víriques en aquest tipus d'aliments pot veure's afectat per diversos factors com per la radiació solar, la presència de substàncies antivirals naturals i la dessecació (revisat a Rzetzuka i Cook, 2004). Els virus no són destruïts per la refrigeració o congelació i s'ha descrit la transmissió de patògens com els NoV i HAV per consum de mores i maduixes congelades (Reid i Robinson, 1987; Ponka et al. 1999). No és freqüent l'ús de processos de desinfecció en aquest tipus d'aliments i fins i tot, quan hi ha tractaments disponibles (Deboosere et al. 2004; Butot et al. 2009), avaluar-ne l'eficàcia és complicat.

En conjunt, la informació sobre l'estabilitat dels virus patògens en aquest tipus d'aliments, en les condicions ambientals dels conreus i de conservació abans del consum, és limitada. Tampoc hi ha informació disponible sobre l'efecte de determinades estructures de la superfície dels vegetals, com ceres i altres productes naturals, sobre l'estabilitat de les partícules víriques. No obstant, hi ha evidències que apunten a la temperatura com un dels factors més rellevants en la inactivació dels virus entèrics en vegetals (Bertrand et al. 2012) i a que en baixes temperatures, com les que s'utilitzen habitualment a les càmeres de refrigeració, aquests patògens poden mantenir-se estables durant més d'un any (Charles et al. 2009).

1.4 El control de la qualitat microbiològica d'aigua i aliments

Diversos organismes internacionals com la "International Organisation for Standardisation" (ISO), el "European Committee for the Normalisation" (CEN) i la "European Food Safety Authority" (EFSA), així com nacionals, han definit normatives per a assegurar la qualitat de l'aigua i aliments. A Catalunya, actualment s'apliquen les normatives dictades pel govern espanyol. En el cas de l'aigua, recentment amb el "Real Decreto 1620/2007" (Anònim, 2007) s'ha concretat els potencials usos admesos per a l'aigua depurada i s'han establert els criteris de qualitat que cal complir per assegurar que representa una aigua segura pel que fa a la presència de microorganismes patògens. Particularment, en el "Real Decreto 1620/2007" es distingeix l'ús urbà, agrícola, industrial, recreatiu i ambiental de l'aigua residual regenerada, i els criteris de qualitat aplicables a cadascun d'ells. Els criteris definits tenen la consideració de mínims obligatoris exigibles i inclouen paràmetres fisico-químics i sanitaris. A més, per a la resta de paràmetres és necessari que les aigües depurades

compleixin amb les condicions específiques per a l'abocament d'aigües residuals segons es determina al "Real Decreto 1315/1992" (Anònim, 1992).

Per a aliments com els fruits silvestres i altres verdures el reglament vigent és el "Real Decreto 1441/2007" (Anònim, 2007) que presenta criteris de qualitat microbiològica basats en l'absència dels bacteris *E.coli*, *Salmonella* i *Listeria monocytogenes*. Addicionalment, també s'han realitzat normatives que especifiquen estàndards per al mostreig i l'anàlisi microbiològic d'aliments. Aquest és el cas de les normes ISO 5667 i ISO 18593:2004, entre altres.

Tanmateix, als estàndards actuals no hi figura cap menció específica per als virus entèrics patògens humans. Per a facilitar la inclusió dels patògens virals en futures normatives, el comitè CEN/ISO, constituït per un grup d'experts en virus contaminants d'aliments "CEN/TC 275/WG6/TAG4", treballa actualment en el primer estàndard internacional d'un mètode horitzontal per a la detecció de NoV i HAV en diferents aliments, aigua envasada i en superfícies.

Per aconseguir establir intervencions en salut pública efectives per a reduir el risc de transmissió d'aquests virus patògens humans, així com facilitar-ne la prevenció i control, és molt important ser capaços d'identificar els agents virals infecciosos d'una manera ràpida i acurada, i per tant només gràcies als avenços tecnològics dels darrers anys (mètodes de detecció mitjançant tècniques moleculars d'amplificació genòmica), s'ha pogut millorar la detecció i diagnòstic dels microorganismes patògens presents en aigua i aliments (Girones et al. 2010).

1.4.1 Mètodes de concentració de virus en aigua i aliments

L'absència de mètodes estandarditzats de concentració de partícules víriques que siguin de fàcil implementació als laboratoris, econòmics i amb bones recuperacions és una de les principals dificultats a l'hora d'analitzar i detectar virus en mostres ambientals. Els virus patògens humans poden contaminar l'aigua i els aliments en baixes concentracions i distribuir-se en aquestes matrius de manera molt heterogènia. És per tant, molt important que la mostra analitzada sigui representativa de la matriu original i que el procés seguit durant el mostreig no n'alteri les condicions ni l'anàlisi subseqüent. A més, és necessari separar i concentrar els virus de les mostres d'aigua o aliments en volums reduïts, abans de procedir a realitzar els assajos de detecció.

A l'hora de seleccionar un mètode de concentració cal tenir en compte les característiques i composició de la mostra, el virus d'interès i el mètode final d'anàlisi (cultiu cel·lular, mètodes immunològics o moleculars). Un dels aspectes més importants a considerar és la presència en la mostra de components que poden interferir en la detecció dels virus (Goyal, 2006) i que poden concentrar-se conjuntament amb les partícules víriques inhibint les reaccions de PCR. Certs components presents al medi coneguts com a inhibidors són els polisacàrids, els fenols i cations.

Els mètodes més habituals per a concentrar virus a partir de mostres d'aigua es basen principalment en quatre punts; adsorció dels virus a un filtre, elució dels virus mitjançant una solució tampó rica en proteïnes, reconcentració dels virus per floculació, precipitació o filtració i extracció dels virus, per exemple amb cloroform o mitjançant mètodes comercials optimitzats per a tal efecte (Crocí et al. 2008). En matrius sòlides com ara les fruites i hortalisses, el processament de la mostra sovint s'inicia amb un rentat de l'aliment o un pas d'homogeneïtzació i seguidament, per la concentració de les partícules víriques (Rodríguez-Lázaro et al. 2007).

Els virus es comporten al medi com col·loides hidròfils en els que la seva càrrega elèctrica neta varia en funció del pH i de la força iònica del propi medi. Així doncs, les partícules víriques posseeixen una determinada polaritat i poden absorbir-se a una gran varietat de matrius amb càrrega, que poden ser immòbils com per exemple les membranes o bé fluides, com la pols de vidre.

Hi ha certes generalitats que qualsevol mètode de concentració ideal ha de complir (Wyn-Jones i Sellwood, 2001):

- Ser fàcilment realitzables en poc temps.
- Demostrar una eficiència de recuperació elevada.
- Concentrar la major diversitat possible de virus
- Obtenir un volum final petit
- No ser econòmicament costós
- Ser capaç de concentrar un gran volum o quantitat de mostra
- Ser repetible (dins un laboratori) i reproducible (entre laboratoris)

Als diferents estudis desenvolupats en aquesta tesi s'ha utilitzat mètodes de concentració basats principalment en processos d'adsorció i elució, en el cas dels aliments, i en ultracentrifugació, en el cas de mostres d'aigua residual. En els processos d'adsorció i elució, els virus presents a la mostra es posen en contacte amb una matriu en la qual seran adsorbits sota condicions de pH específiques. Un cop adsorbits, es descarta la solució en la que estaven suspesos originàriament i tot seguit són recuperats de la matriu en un volum final petit. És molt habitual en l'elució o rentats l'ús de solucions que contenen extracte de carn o llet descremada a pH elevat que desplacen els virus adsorbits a la matriu. També s'utilitzen solucions de glicina/NaOH. Ocasionalment, la concentració que s'assoleix després d'aquest procediment no és suficient per a la posterior detecció dels virus. En aquests casos, és necessari desenvolupar passos de concentració secundaris. Els protocols de concentració basats en ultracentrifugació són mètodes poc selectius, tot i que són capaços de concentrar una gran diversitat de virus aplicant la força de la gravetat i temps (per exemple 100.000 xg durant una hora). El volum que es pot processar és limitat, per la qual cosa és un mètode associat

a mostres de poc volum o com un mètode de concentració secundari (Pina et al. 1998). La principal limitació d'aquest mètode rau en la necessitat de disposar d'una ultracentrífuga, un aparell d'alt cost que difícilment es poden permetre laboratoris d'anàlisi rutinari o en països de baixa renda.

1.4.2 Mètodes de detecció i quantificació de virus en aigua i aliments

Existeixen diverses aproximacions que tradicionalment s'han utilitzat per a detectar virus entèrics humans en mostres ambientals concentrades; des de l'observació de partícules víriques mitjançant microscopia electrònica, fins a la detecció de l'efecte citopàtic en línies cel·lulars o els mètodes moleculars. En general, la majoria d'aquestes tècniques presenten inconvenients importants que poden limitar o condicionar el seu ús. En primer lloc, la microscopia electrònica requereix molt esforç, temps i recursos i ha demostrat una sensibilitat limitada (Atmar i Estes, 2001). Per a la majoria de virus contaminants presents a l'aigua residual i al medi, el cultiu cel·lular i l'observació d'efecte citopàtic no és possible i/o té un cost molt elevat en comparació amb altres tècniques. En les darreres dècades, s'ha desenvolupat assajos immunològics comercials per a la detecció de virus entèrics en mostres clíniques, però no tenen la sensibilitat necessària per a ser aplicats a mostres ambientals i per tant, no són una alternativa satisfactòria.

El desenvolupament i optimització de mètodes moleculars ha permès superar alguns dels inconvenients plantejats per altres mètodes. Actualment, la PCR quantitativa (qPCR) és una de les tècniques utilitzada més rutinàriament als laboratoris de virologia i permet quantificar el nombre de còpies genòmiques (GC) presents a una mostra (Heid et al. 1996) de manera ràpida i poc costosa econòmicament. És una tècnica sensible i específica si els primers i sonda que s'utilitzen estan correctament dissenyats, es pot estandarditzar fàcilment i permet analitzar un gran nombre de mostres al mateix temps (Girones et al. 2010). No obstant, també presenta certes limitacions. Per una banda, la presència de substàncies inhibidores pot interferir en l'amplificació. D'altra banda, la capacitat de distingir entre virus infectius i no infectius és limitada. Aquest fet és principalment degut a la presència de genomes de virus inactivats que romanen parcialment o totalment intactes. Durant la PCR, les regions genòmiques intactes de virus inactivats poden amplificar-se i produeixen resultats positius falsos (Shin i Sobsey, 2003; Duizer et al. 2004; Bhattacharya et al. 2004).

En els darrers anys, s'han utilitzat diverses estratègies per a millorar la capacitat de la qPCR d'informar sobre la infectivitat dels virus detectats (revisades a Rodríguez et al. 2009), però a dia d'avui cap mètode ha representat un avenç important en aquest sentit. Algunes d'aquestes aproximacions s'han resumit a la Taula 4.

Les estratègies utilitzades inclouen l'amplificació de múltiples regions del genoma (Sobsey et al. 1998) o de regions del genoma més grans (Duizer et al. 2004; Simonet i Gantzer, 2006) i PCR amb

immunocaptura (Sobsey et al. 1998). Un estudi realitzat per Nuanualsuwan i Cliver (2002), va demostrar que els senyals falsos-positius de PCR es podien reduir després de sotmetre virus inactivats a tractaments enzimàtics (ET) basats en l'ús de proteïnasa K i RNAsa abans de l'extracció dels àcids nucleics. Aquest mètode diferencia virus infectius de virus inactivats en base a la capacitat de la seva càpsida de protegir-los davant dels tractaments enzimàtics. Una susceptibilitat proteolítica major, s'ha observat en proteïnes danyades per calor (Davies et al. 1987) o per espècies reactives de l'oxigen (ROS) (Prinsze et al. 1990). Per tant, els tractaments enzimàtics poden destruir més fàcilment càpsides de virus inactivats per alguns d'aquests mètodes (Pecson et al. 2009). Amb la càpsida danyada, el genoma és més fàcilment degradat per l'acció de nucleases (Nuanualsuwan i Cliver, 2003). Tanmateix, l'ús d'aquest mètode ha general resultats contradictoris (Poschetto et al. 2007; Lamhoujeb et al. 2008; Baert et al. 2008) i calen més estudis per a desenvolupar intervencions per a obtenir informació sobre la infectivitat de virus inactivats mitjançant mètodes moleculars.

Tractament	Mètode detecció	Tipus de mostra	Virus analitzat	Referència
Proteinasa i RNasa	RT-PCR	Cultiu cel·lular	FCV, HAV, MNoV, poliovirus 1	Nuanualsuwan i Cliver. 2002, 2003; Baert et al. 2008
Proteinasa i RNasa	qNASBA	Mostres fecals i cultiu cel·lular	NoV, FCV	Lamhoujeb et al. 2008, 2009
Assaig de protecció davant RNAsa	qRT-PCR	Mostres fecals i cultiu cel·lular	NoV, FCV	Topping et al. 2009
	5' NTR RT-PCR	Cultiu cel·lular	HAV	Bhattacharya et al. 2004; Li et al. 2002, 2004.
	Long target region (LTR) qRT-PCR	Cultiu cel·lular	HAV, poliovirus 1, fags RNA F-específics	Li et al. 2002; Simonet i Gantzer, 2006.

Taula 4. Pretractaments per a l'ús de tècniques moleculars en l'avaluació de la infectivitat de partícules víriques.

1.5 Inactivació natural dels virus al medi ambient: llum solar

La inactivació natural dels virus patògens al medi ambient és un procés rellevant en la disseminació de malalties infeccioses. Certs estudis han descrit cinètiques d'inactivació viral diferents en aigua i aliments estudiades sota diferents condicions, i els resultats obtinguts indiquen que agents com la temperatura, la humitat i la dessecació poden ser determinants en la reducció natural del contingut de patògens (Crocì et al. 2002; Gordon i Toze, 2003; Bertrand et al. 2012). Tanmateix, la contribució relativa de cada paràmetre és pràcticament desconeguda.

La llum solar pot ser un factor determinant en l'estabilitat de virus patògens presents tant en aigua de riu com en aigua de mar. Aquest procés de desinfecció, ha tingut en els darrers anys un creixent interès i ha estat explotat per a diverses aplicacions com per exemple en llacunes d'estabilització d'aigua residual (Davies-Colley et al. 1999; Kohn i Nelson, 2007; Da Silva et al. 2008) i en la desinfecció solar d'aigua de beguda (SODIS) (Wegelin et al. 1994; revisat a McGuigan et al. 2012).

L'espectre de la llum solar natural es compon per una diversitat de longituds d'ona que comprenen la radiació ultraviolada (A, B i C), la llum visible i radiació infraroja (Figura 7). Pel que fa a la inactivació natural dels microorganismes, la fracció corresponent a la llum ultraviolada C de la llum solar juga pràcticament nul ja que és absorbida quasi en la seva totalitat a les capes superiors de l'atmosfera.

Els mecanismes de foto-inactivació de patògens per l'acció de la llum solar poden ser deguts a diferents processos (Davies-Colley et al. 1999; Kohn i Nelson, 2007). En primer lloc, per l'acció directa de la llum ultraviolada que pot danyar determinats components de la partícula vírica. Concretament, en el cas de la UVC s'ha demostrat que el dany directe origina la inhibició de la replicació i de la injecció del genoma dels bacteriòfags MS2 (Wigginton et al. 2012).

D'altra banda, la foto-inactivació també pot ser causada per mecanismes indirectes, que potencialment poden iniciar-se tant per l'acció de la llum ultraviolada com de la llum visible. En presència d'oxigen, l'excitació de determinats compostos sensibilitzadors (compostos que absorbeixen la llum i que transfereixen l'energia a altres molècules) comporta la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) que poden danyar els constituents de les partícules víriques. La foto-inactivació endògena té lloc per substàncies sensibilitzadores que es troben localitzades dins dels microorganismes, per exemple flavines en el cas de bacteris (Jagger, 1985) mentre que en la foto-inactivació exògena els compostos sensibilitzadors es localitzen a l'entorn del patògen, com per exemple les substàncies húmiques (Curtis et al. 1992; Cooper et al. 1989).

Les espècies reactives de l'oxigen inclouen l'oxigen molecular (O_2), el superòxid (O_2^-), el radical hidroxil (OH), el radical peròxid (RO_2^-) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Les vies de formació de

les ROS normalment es basen en l'absorció d'un fotó per les molècules sensibilitzadores i la subseqüent reacció, sigui per la transferència d'energia o per reaccions de transferència d'electrons amb l'oxigen (Hoigné et al. 1989).

La contribució particular de cadascun dels mecanismes de foto-inactivació és desconeguda tot i que es sap que pot variar en funció de la matriu o del microorganisme (Davies-Colley et al. 1997). En general, s'ha observat que els processos de foto-inactivació estan influenciats per la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua (Reed et al. 1997), el pH (Davies-Colley et al. 1999), la salinitat (Sinton et al. 2002) i la longitud d'ona de la llum (Davies-Colley et al. 1999). A més, durant processos de desinfecció basats en l'acció directa de la llum ultraviolada, l'associació dels patògens amb partícules dissoltes o la interferència d'aquestes amb la mateixa llum, inhibeix l'eficiència dels tractaments (Templeton et al. 2005). Pel contrari, estudis recents han demostrat que si s'exposa aigua residual a llum solar artificial, la matèria orgànica present, augmenta la presència de ROS i per tant la inactivació dels patògens estudiats és major (Kohn i Nelson, 2007).

Altres estudis han demostrat que en aigües superficials naturals, la llum UVB penetra només a la capa menys profunda de la zona fòtica ja que s'extingeix a causa de la matèria orgànica present, mentre que la llum UVA i la llum visible poden penetrar més profundament i generen ROS mitjançant reaccions indirectes (Wigginton et al. 2010). No obstant, la informació disponible sobre el paper de la llum solar en la inactivació dels virus contaminants en diferents ambients aquàtics naturals és molt limitada i és un dels principals objectius d'aquesta tesi doctoral.

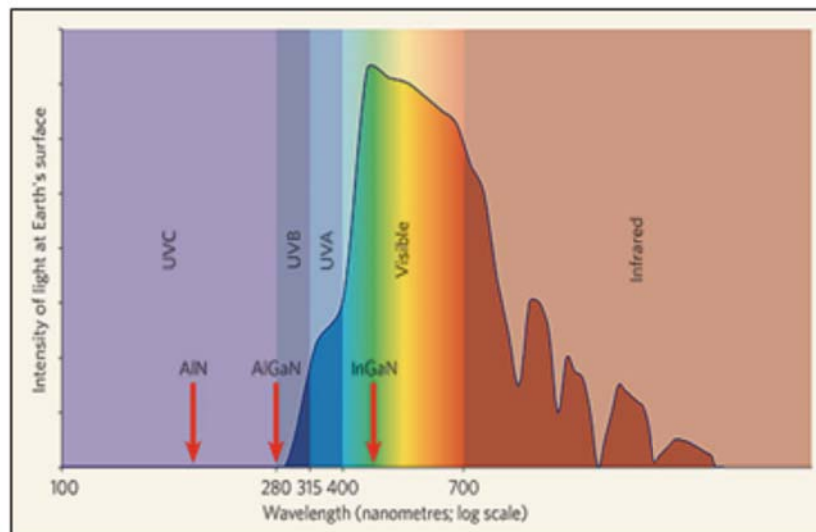


Figura 6. Espectre de radiació de la llum solar (Khan, 2006).

1.6 Tractaments de desinfecció d'aigua

La destrucció dels virus patògens contaminants de l'aigua i aliments és essencial per al control de la transmissió de les malalties infeccioses que ocasionen. En general, tradicionalment els tractaments de desinfecció més utilitzats s'han basat en l'ús de la temperatura, l'aplicació de productes químics, la filtració o la radiació ultraviolada (Koopmans i Duizer, 2004; Koivunen i Heinonen-Tanski, 2005; Bertrand et al. 2012). Molt sovint, durant els processos d'inactivació interactuen passos fisico-químics i biològics, i cadascun dels tractaments actua per diferents mecanismes sigui sobre les partícules víriques desnaturalitzant les proteïnes víriques, com interaccionant sobre els àcids nucleics.

Amb l'objectiu de predir, determinar i comparar l'eficiència d'un procés de desinfecció s'ha definit models matemàtics d'inactivació basats en dades experimentals (Haas i Karra, 1984; Haas et al. 1995). El principal model usat actualment és el de Chick-Watson, un model combinat en base a les propostes de Chick i Watson (1908), que expressa la cinètica d'inactivació dels microorganismes com una reacció química de primer ordre:

$$N_t/N_0 = e^{-kt}$$

O bé:

$$\ln N_t/N_0 = -kt$$

En aquesta expressió matemàtica, N_0 representa el nombre inicial de microorganismes i N_t el nombre de microorganismes a temps t . El valor k representa una constant d'inactivació (1/temps) i t representa el temps. En condicions de laboratori i de camp, les dades obtingudes sovint s'allunyen d'aquest model d'inactivació de primer ordre (Figura 6). Altres tipus de cinètiques poden observar-se als estudis de desinfecció per causa de diversos mecanismes com la agregació dels microorganismes, la absorció de la llum per la compostos presents a la matriu aquosa o per l'aparició d'una subpoblació resistent resultat de la recombinació o reparació dins les cèl·lules hostes (Mattle i Kohn, 2012).

L'efectivitat d'un desinfectant pot expressar-se com a $C \cdot t$, on C correspon a la concentració de desinfectant utilitzat i t el temps necessari per a assolir la inactivació d'un cert percentatge de la població del patogen sota unes condicions determinades (pH i temperatura). Normalment, el percentatge d'inactivació més freqüentment utilitzat en aquesta expressió és el 99%. En general, com menor és un valor de $C \cdot t$, més efectiu és el desinfectant en qüestió. Els valors $C \cdot t$ permeten realitzar comparacions de l'efectivitat de diferents desinfectants sobre diversos agent microbians (Black et al. 2009).



Figura 7. Tipus de corbes d'inactivació observades per a microorganismes. Modificat a partir de Gerba CP, 2009.

Hi ha diversos factors que poden afectar l'efectivitat d'un tractament de desinfecció. Entre ells, la temperatura pot jugar un paper important ja que controla el desenvolupament de reaccions químiques. Així doncs en general, a mida que la temperatura incrementa, l'efectivitat dels tractaments químics de desinfecció millora. El pH és un altre factor important que pot afectar a la ionització de certs desinfectants i conseqüentment, a la viabilitat dels microorganismes. En el cas de compostos halogenats com el clor, el pH controla la quantitat de HOCl (àcid hipoclorós) i OCl^- (hipoclorit) d'una solució. El HOCl és un desinfectant més efectiu que el OCl^- . Per tant, en el cas del clor, el valor de C·t augmenta proporcional amb el pH. La unió dels microorganismes a superfícies o a matèria dissolta particulada en una solució també pot contribuir a la protecció dels patògens davant dels desinfectants tant per la seva reacció amb el desinfectant, com protegint físicament als microorganismes. Per a assolir una correcta desinfecció, caldrà caracteritzar els diversos factors que poden incidir durant els processos del tractament i controlar-los mitjançant processos previs al tractament com per exemple per filtració (Shin i Sobsey, 2008).

Tot i que certs desinfectants s'han estat utilitzant des de fa dècades, els mecanismes responsables de la inactivació dels patògens són desconeguts, especialment pel que fa als virus. La inactivació de virus es complica considerablement si tenim en compte que virus molt relacionats entre ells poden demostrar cinètiques d'inactivació molt diferents quan es tracten amb el mateix agent desinfectant (Baxter et al. 2007; Cromeans et al. 2010). Aquesta observació suggereix que variacions genòmiques o estructurals poden tenir un efecte rellevant en la resistència de determinats virus a la desinfecció. El tipus i la quantitat de dany que pot resistir un virus abans de perdre la seva infectivitat és pràcticament desconeguda i els mecanismes específics que determinen la inactivació d'una partícula vírica també. Alguns estudis han demostrat que l'exposició a agents oxidants i a la

radiació origina modificacions de les proteïnes víriques (Nuanualsuwan i Cliver, 2003; Sano et al. 2009; Hotze et al. 2009; Wigginton et al. 2010) i dels àcids nucleics (O'Brien et al. 1979; Nuanualsuwan i Cliver, 2003; Li et al. 2004) però en molts casos no s'ha determinat quina de les modificacions observades han determinat la pèrdua de la infectivitat. Recentment, s'ha identificat certes modificacions a nivell molecular en les proteïnes o al genoma viral que inhibeixen certes funcions com el reconeixement i la unió entre el virus i la cèl·lula hoste i que poden determinar la inactivació de les partícules víriques (Wigginton et al. 2012). En aquest mateix estudi, s'ha observat que diferents agents generen un patró de modificacions moleculars diferents.

1.6.1 Tractaments químics: clor.

El clor i els seus compostos derivats són els desinfectants més utilitzats en el tractament de l'aigua de beguda i l'aigua residual. El clor és un agent oxidant molt potent que en solucions aquoses actua per l'efecte del HOCl format. L'àcid hipoclorós es dissocia produint H^+ i OCl^- de manera clarament dependent del pH de l'aigua (Deborde i von Gunten, 2008). La quantitat de HOCl disponible és major en condicions de pH neutres o àcides i per tant, en aquestes condicions podem esperar una efectivitat major.

El clor en forma de HOCl o com a OCl^- s'anomena *clor lliure disponible*. El HOCl pot combinar-se amb amoni i altres compostos orgànics produint les formes anomenades *clor combinat* (Gerba, 2009). Les reaccions del clor amb amoni i compostos orgànics nitrogenats tenen molta importància en els processos de desinfecció de l'aigua. Aquestes reaccions originen mono-cloramines, di-cloramines, tri-cloramines, etc. Les cloramines han demostrat una certa capacitat de desinfecció, tot i que són molt menys efectives que el clor, molt efectiu en la desinfecció de patògens bacterians (Koivunen i Heinonen-Tanski, 2005) i han estat utilitzades principalment com a desinfectants secundaris en casos on es desitja un romanent de desinfectant que actuï al llarg del sistema de desinfecció.

Alguns virus entèrics patògens, com els adenovirus, són molt més resistents als tractaments de desinfecció amb clor que els estàndards bacterians tradicionals (Tree et al. 2003; Sirikanjana et al. 2008) i poden detectar-se habitualment als efluent de plantes depuradores d'aigua residual, fins i tot després dels tractaments terciaris (Rodríguez-Manzano et al. 2012).

El mecanisme d'acció concret del clor lliure als processos de desinfecció pot ser degut a la interacció del desinfectant amb les proteïnes de la càpsida (Nuanualsuwan i Cliver, 2003; Page et al. 2010) o els àcids nucleics (Li et al. 2002) i depèn de la concentració i tipus de desinfectant així com del virus (Gerba, 2009; Wigginton et al. 2012). S'ha observat que el clor lliure inhibeix funcions relacionades amb la replicació i la injecció del genoma de bacteriòfags MS2 a la cèl·lula hoste

(Wigginton et al. 2012) i que la inhibició de la replicació coincideix amb dany extens al genoma. Els resultats d'aquest estudi indiquen que els mecanismes d'inactivació del clor lliure són semblants als observats amb O₂ però són diferent als de UV. Aquest fet suggereix que l'acció dels oxidants químics està limitada pel contacte amb zones accessibles de la partícula viral.

El diòxid de clor és un agent oxidant extremadament soluble a l'aigua. Al contrari del clor, no reacciona amb l'amoni i altres compostos orgànics generant tri-halometans, un compost molt carcinogen. Per aquest motiu, ha estat ben acceptat en la desinfecció d'aigua de beguda. El diòxid de clor s'ha de generar al mateix lloc d'aplicació ja que no es pot emmagatzemar, seguint la següent reacció química:



Certs estudis han demostrat que el diòxid de clor és tant o més efectiu que el clor inactivant tant bacteris com virus. Aquest compost actua inactivant els microorganismes mitjançant la degradació d'algunes regions de les seves proteïnes (Steward i Olson, 1996; Bernade et al. 1967; Wigginton et al. 2012). Certs estudis han demostrat que el diòxid de clor no reacciona amb els àcids nucleics sinó que actua majoritàriament sobre els aminoàcids (Stewart et al. 2008) i més específicament sobre residus de cisteïna, triptòfan i tirosina. L'activitat virucida del diòxid de clor està influenciada pel pH de manera que s'incrementa a valors de pH majors (Chen i Vaughn, 1990).

1.6.2 Tractaments físics: radiació ultraviolada

La llum ultraviolada es classifica en tres grups segons la seva longitud d'ona. La UVA (315-290 nm) i la UVB (280-315 nm) juguen un paper menys rellevant en els processos de desinfecció que la radiació ultraviolada C (100-280 nm). La radiació ultraviolada C de baixa pressió (LP) és quasi monocromàtica a una longitud d'ona de 253.7 nm (molt a prop dels 260 nm, la longitud d'ona que més absorbeixen els àcids nucleics) i produeix danys al genoma dels microorganismes, causant la dimerització de timines. La radiació ultraviolada de mitja pressió (MP) pel contrari, és policromàtica i emet en un rang de longituds d'ona, incloent aquelles absorbides per les proteïnes, de manera que potencialment pot danyar tant les proteïnes víriques com els seus àcids nucleics (Eischeid et al. 2009).

L'ús de la radiació ultraviolada C com a tractament desinfectant d'aigua ha guanyat popularitat en els darrers anys ja que no genera cap subproducte carcinogen o tòxic en comparació a l'ús de compostos halogenats com el clor (Sedlak i von Gunten, 2011). A més, dades experimentals

han demostrat la seva efectivitat inactivant patògens molt resistents als tractament de clor, com els oocists de *Cryptosporidium* i *Giardia* (Clancy et al. 1998; Shin et al. 2001). Malauradament, aquest sistema de desinfecció presenta altes limitacions i inconvenients. En primer lloc, el seu cost és més elevat i no es genera cap desinfectant residual que pugui utilitzar-se de manera secundària en els sistemes de distribució de l'aigua. En segon lloc, determinar la dosi exacta necessària per al tractament, i la neteja i manteniment de les làmpades, pot ser complicat. Tot i aquests inconvenients l'ús de la radiació ultraviolada s'ha estès en la indústria farmacèutica, cosmètica, alimentària i electrònica, a més del seu ús en el tractament d'aigua residual terciària o d'aigua de beguda.

La inactivació dels microorganismes per l'efecte de la radiació ultraviolada és proporcional a la dosi aplicada ($\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$), de manera que es pot expressar:

$$\text{Dosi UV} = I \cdot t$$

En aquesta expressió I correspon a $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ i t al temps d'exposició. Segons aquesta relació, la cinètica d'inactivació d'un microorganisme davant la radiació ultraviolada és pràcticament lineal quan es representen en funció de la dosi aplicada. No obstant, certs estudis experimentals han obtingut cinètiques que no responen a aquesta relació i en les que s'observa una reducció de la inactivació a les dosis de UV més elevades (Nieuwstad i Havelaar, 1994; Battigelli et al. 1993).

Hi ha diversos factors que poden afectar la inactivació per exposició a radiació ultraviolada. Entre ells, cal destacar l'agregació dels microorganismes, la presència de sòlids en suspensió, la turbulència i l'absorció de la radiació per la pròpia matriu aquosa (Gerba, 2009). L'efectivitat de la radiació ultraviolada disminueix als efluent de les plantes depuradores d'aigua per la presència de substàncies que afecten la transmissió de l'UV a l'aigua, com per exemple substàncies húmiques, compostos fenòlics i sulfonats lígnics. Cal tenir en compte aquests factors a l'hora de determinar les dosis de radiació ultraviolada necessàries per a assolir una reducció del 99.99% dels microorganismes (revisat a Hijnen et al. 2006).

Els virus amb genomes bicatenaris de ADN són menys susceptibles a la inactivació per UV que els virus monocatenaris degut a l'acció de determinats enzims presents a les cèl·lules hostes que poden reparar seccions de genomes bicatenaris danyats utilitzant la cadena no danyada com a motlle (Roessler i Severin, 1996). En bacteris, existeix un fenomen anomenat fotoreactivació que té lloc quan certs bacteris afectats per la radiació UV s'exposen a longituds d'ona d'entre 300 i 500 nm. En aquests casos, els danys ocasionats per la llum ultraviolada poden reparar-se mitjançant l'acció d'un enzim foto-reactiu que s'uneix als dímers de timina i els repara (Bitton, 1994).

Per al tractament de l'aigua de beguda, s'ha definit una dosi de radiació UV recomanable, $16.000 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ ja que permet assolir una reducció del 99.9% dels coliforms presents a l'aigua.

Tanmateix, s'ha demostrat que aquesta dosi no és suficient per a la inactivació de virus entèrics (Abbaszadegan et al. 1997) i calen nous estudis que permetin definir una dosi de llum UV adient per a la inactivació eficaç dels patògens més resistents.

1.6.3 Ús de microorganismes models en estudis de desinfecció

A dia d'avui, els norovirus i altres virus entèrics patògens importants no són cultivables al laboratori i consegüentment, generar dades experimentals sobre la seva estabilitat davant factors ambientals i determinats tractaments de desinfecció és molt complicat. Amb aquest objectiu, s'han utilitzat altres virus de característiques semblants als patògens d'interès com a models en estudis d'estabilitat i desinfecció (Nuanualsuwan i Cliver, 2003; Cromeans et al. 2010). Entre els models més utilitzats en la literatura tenen un paper molt destacable els norovirus murins i certs bacteriòfags com els MS2 i Φ X174.

Els norovirus murins són dels pocs calicivirus, i els únics norovirus, que poden replicar-se mitjançant cultiu cel·lular (en cèl·lules RAW 264.7) al laboratori i comparteixen certes similituds amb els norovirus humans (Hsu et al. 2007). Els MNV tenen una mida (al voltant de 28 a 30 nm de diàmetre), forma de la càpsida (icosaèdrica) i densitat semblant als norovirus humans (Wobus et al. 2006). Addicionalment, el genoma dels MNV conté tres pautes obertes de lectura, com és el cas dels NoV humans. La ORF 1 codifica per una poliproteïna de 187,5 KDa que conté 2C helicasa, 3C proteasa i 3D polimerasa, com altres calicivirus i picornavirus. La ORF2 codifica per la proteïna de la càpsida de 58,9 KDa i la ORF3 codifica per una proteïna bàsica de 22.1 KDa (Figura 8).

Els bacteriòfags MS2 pertanyen a la família de bacteriòfags *Leviviridae* i han estat un model molt habitual de virus entèrics en estudis d'estabilitat i inactivació (Dawson et al. 2005; Napier et al. 2006; Casteel et al. 2008) ja que infecten *E. Coli*, són fàcilment cultivats al laboratori, de manera que pot es estudiar la persistència de la seva infectivitat en condicions diferents. Aquests virus tenen un genoma d'ARN molt similar al dels picornavirus, calicivirus i astrovirus, i tenen les partícules víriques en el mateix rang de mides. Els MS2 són uns virus icosaèdrics amb un genoma de ARN lineal d'una sola cadena de 3690 nucleòtids. El genoma codifica per 4 proteïnes; una proteïna protectora "CP" (13.7 KDa), una proteïna de maduració "AP" (44 KDa), una replicasa i una liticasa (Toropova et al. 2008). Els bacteriòfags es detecten freqüentment en mostres ambientals i aliments contaminats fecalment i s'assumeix que poden presentar una estabilitat semblant a la d'alguns virus entèrics.

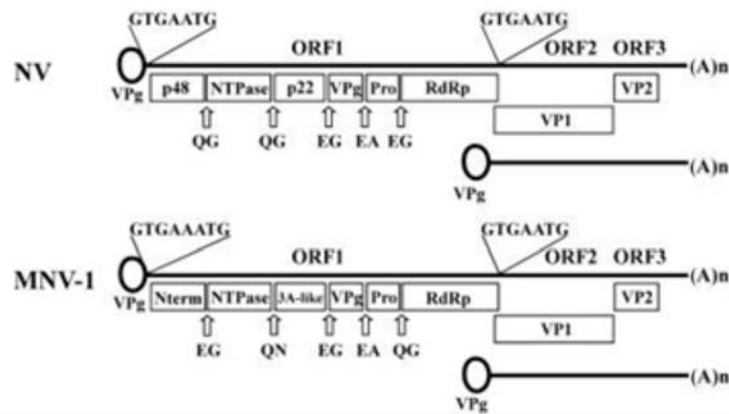


Figura 8: Esquema comparatiu de la organització dels genomes dels norovirus humans (NV) i norovirus murins (MNV), (Wobus et al. 2006).

1.7 Virus humans i animals com a eines de MST

La contaminació viral d'origen humà o animal a l'ambient representa un risc de salut pública important. En aquest sentit, les directives més recents de la Unió Europea i dels Estats Units per al control de la qualitat de les aigües, estan enfocades no tant al control de de la contaminació en punts concrets sinó més aviat a zones més amples, considerant les fonts i dinàmiques de difusió dels patògens d'interès més rellevants (Stapleton, 2007).

La identificació de l'origen de les fonts de contaminació fecal té un paper essencial en el control i la remediació de la qualitat de l'aigua. El conjunt d'estratègies utilitzades per a la identificació d'aquesta contaminació al medi ambient es coneix sota el nom anglès "Microbial Source Tracking" (MST). Aquest concepte engloba les metodologies focalitzades en la identificació de l'origen de la contaminació fecal i en la quantificació de les fonts predominants d'una àrea determinada (Stoeckel i Harwood, 2007).

Els microorganismes indicadors clàssics, com els bacteris entèrics *Escherichia coli* i enterococs, han estat utilitzats tradicionalment tant per a avaluar el nivell de contaminació fecal com per a determinar les eficiències dels tractaments d'aigua en la eliminació de patògens. Malauradament, la ubiqüitat dels indicadors bacterians clàssics com *Escherichia coli* i els enterococs complica associar aquests microorganismes a fonts de contaminació concretes (Field i Samadpour, 2007; Roslev i Bukh, 2011). Per aquests motius, la identificació de la contaminació fecal d'origen animal és essencial per a establir mesures efectives de remediació i ha captat molt interès en els darrers 15 anys.

Al llarg de la darrera dècada, els mètodes de MST han incrementat quasi exponencialment i s'han classificat en dos grans grups; els mètodes dependents de llibreries i els mètodes considerats

independents. Aquests darrers inclouen marcadors químics i altres marcadors genètics moleculars, entesos com a seqüències úniques d'àcids nucleics que s'associen exclusivament a una font biològica específica (hoste). En una situació ideal aquests marcadors són estables i universals a l'espai i al temps. Els assajos basats en aquest tipus de mètodes són els més prometedors en l'actualitat (Field i Samadpour, 2007; Roslev i Bukh, 2011). Els marcadors moleculars poden tenir com a diana seqüències d'àcids nucleics de microorganismes associats als hostes d'interès o bé seqüències derivades directament dels hostes. Els més populars són marcadors moleculars de procariotes, per exemple seqüències de bacteris de l'orde *Bacteroidales* que presenten especificitat d'hoste, (Bernhard i Field, 2000), d'eucariotes com ara el DNA mitocondrial (Martellini et al. 2005) i virus.

La majoria de virus humans i animals tenen una especificitat d'hoste molt elevada, la qual cosa els fa uns molt bon candidats com a eines de MST (Fong i Lipp, 2005). A més, la detecció d'aquests microorganismes es realitza amb mètodes no dependents de cultiu cel·lular i hi ha assajos de qPCR disponibles per a alguns dels grups d'interès.

1.7.1 Indicadors virals de contaminació fecal d'origen humà

L'optimització de mètodes moleculars per a la detecció de virus en mostres ambientals i aliments ha donat molta popularitat a nous grups de virus humans, amb genoma de ADN, que poden ser quantificats amb un cost econòmic baix i que són excretats en concentracions significatives durant tot l'any a nivell mundial. En aquest grup trobem els adenovirus humans i els poliomavirus JC (JCPyV). Aquests virus es detecten en el 98% de les mostres d'aigua residual analitzada (Bofill-Mas et al. 2000) i han estat proposats com a indicadors de la contaminació fecal d'origen humà (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2000).

En els darrers anys, s'ha desenvolupat mètodes per a la quantificació mitjançant qPCR dels HAdV presents en aigua residual, marisc, aigua de riu, aigua de beguda i en aigua de mar (Puig et al. 2004; Pina et al. 1998; Formiga-Cruz et al. 2002; Albinana-Gimenez et al. 2009b; Calgua et al. 2008). Gràcies a aquests estudis, sabem que els HAdV són presents a l'aigua residual en concentracions de 10^2 - 10^5 còpies genòmiques/ml i que segueixen presents als efluent de les plantes depuradores amb títols de 10^2 - 10^3 còpies genòmiques/L i en aigua de riu, on s'han utilitzat per a avaluar l'eficiència de les plantes de tractament, tant d'aigua residual com d'aigua de beguda (Bofill-Mas et al. 2006; Albinana-Gimenez et al. 2009; Rodriguez-Manzano et al. 2012). Recentment també s'han obtingut dades experimentals que indiquen que els HAdV són uns virus molt estables al medi ambient i resistents als tractaments de desinfecció d'aigua, en especial a la radiació ultraviolada de baixa pressió (Thompson et al. 2003; Mena i Gerba, 2009).

En els treballs desenvolupats per a identificar la contaminació fecal d'origen humà, al nostre grup s'han proposat dos marcadors virals; els adenovirus humans i el poliomavirus JC, que pertanyen a la família dels *Polyomaviridae* i infecten únicament l'ésser humà. Les partícules virals tenen un diàmetre aproximat d'entre 42-45 nm, no són embolcallades i tenen un genoma circular de 5,3 kb d'ADN bicatenari superenrotllat i associat a 4 histones cel·lulars (H2A, H2B, H3 i H4) formant un minicromosoma. El genoma dels poliomavirus (Figura 9) es troba subdividit en una regió primerenca que codifica per als antígens tumorals T i t (AgT i Agt) i una regió tardana que codifica per a les proteïnes de la càpsida (VP1, VP2 i VP3).

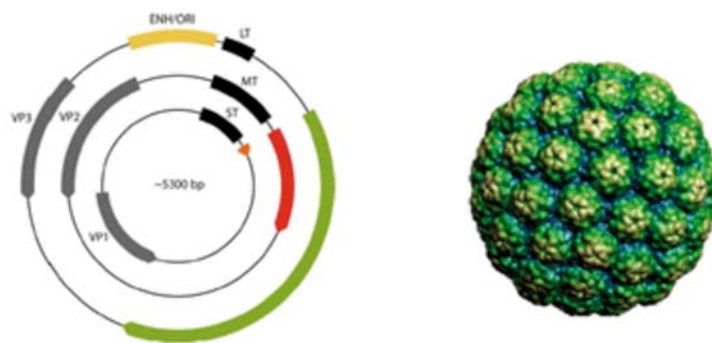


Figura 9. Esquerra: Esquema de la organització genòmica dels poliomavirus (Fluck i Schauff, 2009). Dreta: Estructura cristal·logràfica de l'aspecte que ofereixen les partícules víriques de poliomavirus murí (VIPERdb, 2012).

Tot i que les vies de transmissió dels poliomavirus són encara desconegudes, la majoria d'investigadors coincideixen en que l'entrada a l'organisme podria tenir lloc a través del tracte respiratori o intestinal (Sundsford et al. 1994). Es sap que els JCPyV i altres poliomavirus humans com els BK (BKPyV) infecten de manera persistent el tracte urinari i en el cas dels JCPyV també el cervell. Els JCPyV s'han quantificat en aigua residual urbana (10^3 - 10^4 còpies genòmiques/ml), en aigua residual tractada (10^2 - 10^3 còpies genòmiques/L) i en els biosòlids resultants en concentracions de 10^3 còpies genòmiques/g (Bofill-Mas et al. 2006).

Els dos paràmetres virals, HAdV i JCPyV, són virus amb genoma de ADN fàcilment quantificables per qPCR, amb més efectivitat i un cost menor que altres virus amb genoma de ARN, produeixen infeccions persistents essent excretats en femta i orina, respectivament, durant tot l'any i en totes les àrees geogràfiques estudiades (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2000; Bofill-Mas et al. 2006).

Incloure l'ús de determinats virus com a eines de MST en les futures regulacions per a la qualitat microbiològica d'aigües i aliments és un pas molt important per a la millora del control mediambiental. No obstant, a dia d'avui encara calen més estudis que permetin definir nivells acceptables dels virus indicadors i identificar en quins escenaris concrets aquests nivells són apropiats.

1.7.2 Indicadors virals de contaminació fecal d'origen animal

Les excrecions d'origen animal i els residus generats en el sector de la ramaderia representen un risc per a la salut pública (Guan et al. 2000; Tei et al. 2004; Li et al. 2005) i una font de contaminants químics al medi ambient. En els darrers anys, s'han proposat diversos virus per a identificar la contaminació d'origen animal al medi ambient, com els bacteriòfags F-específics (Havelaar et al. 1990), certs enterovirus (Jimenez-Clavero et al. 2003; Ley et al. 2002) i bacteriòfags que infecten *Bacteroides fragilis* (Payan et al. 2005). Tanmateix, la majoria d'aquests assajos no han demostrat ser totalment específics i en certes ocasions és necessari realitzar diversos anàlisis de manera complementaria. Per aquesta raó, en el nostre grup s'ha desenvolupat altres eines més específiques per a la detecció i quantificació de contaminació en mostres ambientals, com per exemple els adenovirus porcins per a contaminació d'origen porcí, i els poliomavirus bovins per a identificar contaminació bovina (Hundesda et al. 2006; Hundesa et al. 2009; Hundesa et al. 2010).

Les granges i escorxadors d'aviram constitueixen una indústria que genera un gran volum de residus, que poden arribar a utilitzar-se com a fertilitzants per a l'agricultura i per tant, són una font de patògens molt important de cara a les cadenes de producció d'aliments i a l'ambient (Carter MJ, 2005; Guan et al. 2000). A Catalunya, les granges d'aviram produeixen anualment al voltant de 242.695 tones d'aus representant la segona indústria càrnia del país, per darrera de la producció de porcí (Informe Anual de la Indústria, Distribució i Consum Agroalimentari a Catalunya, 2009). A la Taula 5 s'especifiquen dades anuals del sacrifici d'aus als escorxadors de Catalunya.

Tot i la importància d'aquest sector agroalimentari, les eines microbiològiques disponibles per a identificar les fonts de contaminació fecal d'aviram són molt limitades (Baker-Austin et al. 2010; Layton et al. 2010; Muniesa et al. 2009). Per aquests motius, és d'especial rellevància disposar de nous indicadors que puguin ser aplicats de manera específica en mostres ambientals per a millorar la qualitat i seguretat ambiental. Un dels objectius d'aquesta tesi doctoral ha estat el desenvolupament de virus marcadors de contaminació d'origen aviar. Concretament, s'ha proposat la utilització dels parvovirus d'aus com a nova eina de MST.

Àmbit territorial	Sacrifici de bestiar (Caps sacrificats en milers d'unitats)	
	Total d'aus	Pollastres d'engreix
Barcelona	42.835	40.930
Girona	8.638	8.549
Lleida	113.845	68.294
Tarragona	46.863	39.590
Catalunya	212.182	157.364

Taula 5. Dades de sacrificis anuals en escorxadors d'aviram. Any 2011. (Estudis i Prospectiva Secretaria General del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural, Generalitat de Catalunya).

1.7.3 Els parvovirus d'aus

Els parvovirus són virus petits amb un diàmetre d'entre 18-26 nm i simetria icosaèdrica. No disposen d'embolcall i tenen un genoma lineal unicatenari de DNA (ssDNA) d'unes 5 kb. Pertanyen a la família *Parvoviridae* que consta de dues subfamílies, els *Parvovirinae* i els *Densovirinae*, que principalment comprèn virus d'invertebrats. La subfamília *Parvovirinae* es divideix en 5 gèneres: els *Parvovirus*, els *Erythrovirus*, els *Dependovirus*, els *Ambdovirus* i els *Betaparvovirus*. Els virus que pertanyen a aquests gèneres, excepte els components del gènere *Dependovirus*, són virus autònoms que no requereixen la presència d'altres virus auxiliars per produir la infecció. Pel contrari, la replicació dels virus adeno-associats (AAV) requereix la coinfecció amb un virus auxiliar, sovint un adenovirus o certs herpesvirus (Tattersall, 2006; Berns i Parrish, 2007).

Els parvovirus d'aus descrits fins al dia d'avui es classifiquen en diversos grups: parvovirus que infecten pollastres (ChPV) i gall d'indi (TuPV) per una banda, i els parvovirus d'ànec Muscovy (MDPV) i d'oca (GPV) per una altra. Tots ells són virus autònoms, tot i que els MDPV i els GPV tenen seqüències de DNA més semblants a certs AAV humans que a d'altres membres del gènere *parvovirus* i es classifiquen dins dels *Dependovirus* i del gènere *Erythrovirus*. Pel que fa als ChPV i TuPV es classifiquen dins del gènere *parvovirus*.

Els parvovirus autònoms tenen càpsides petites i estructuralment molt estables que s'uneixen de manera molt específica als receptors dels seus hostes. Tenen genomes petits que codifiquen principalment 2 gens; un gen no estructural (NS1), conservat entre els parvovirus, i un gen per a la proteïna estructural (VP1) (Cotmore i Tattersall, 2006). Tots tenen una estructura genòmica similar (Figura 10) amb repeticions terminals necessàries per a la seva replicació, gens que codifiquen per a proteïnes no estructurals localitzades a la regió 5' del genoma, i gens que codifiquen per a les

proteïnes de la càpsida a la regió 3'. La majoria causa infeccions lleus o asimptomàtiques i es transmeten per la ruta fecal-oral, per l'orina i pel tracte respiratori principalment. Són molt estables al medi ambient i poden transmetre's per contacte amb superfícies contaminades.

Fins fa poc temps, s'havia considerat que els parvovirus d'aus eren els principals patògens causants de malalties entèriques en pollastres, galls d'indi i determinades espècies d'ànecs (Zsak et al. 2008). En contradicció amb aquesta creença, estudis recents han descrit una elevada prevalença de parvovirus en pollastres i galls d'indi sans a diversos països com els Estats Units, Croàcia, Hongria i Polònia (Bidin et al. 2011; Palade et al. 2011 a, b; Tarasiuk et al. 2012; Zsak et al. 2009) i s'ha determinat i analitzat el genoma complet dels parvovirus de pollastre (Day i Zsak, 2010). La prevalença d'aquests virus en pollastres sans i l'estabilitat descrita per a altres parvovirus animals davant diversos tractaments de desinfecció permet hipotetitzar amb el seu ús com a eines de MST. El desenvolupament de tècniques de detecció i quantificació d'aquests virus en mostres ambientals per avaluar el seu ús com a indicadors de contaminació d'aviram és un dels objectius principals d'aquesta tesi.

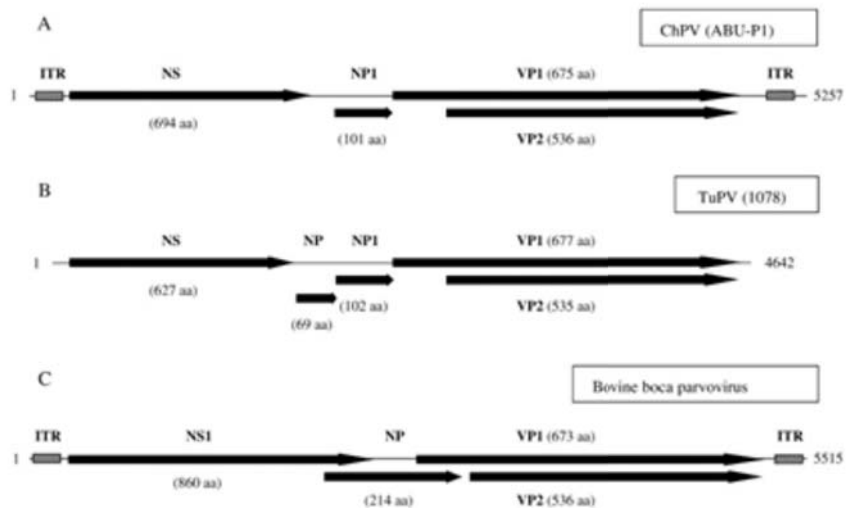
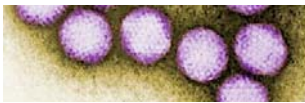


Figura 10. Representació gràfica de la organització genòmica de (A) ChPV ABU-P1, (B) TuPV 1078 i (C) bocavirus boví (Day i Zsak, 2010).



2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

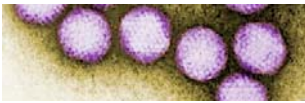
Els objectius plantejats en aquesta tesi s'organitzen en dos àmbits d'estudi. En primer lloc, en l'estudi de l'estabilitat dels virus en ambients naturals i davant de processos de desinfecció, i en segon lloc, en la descripció d'un nou marcador de contaminació fecal d'origen aviar com a eina de MST. Els objectius específics són:

- 1) Definir els paràmetres d'inactivació natural dels adenovirus humans per l'efecte de la llum solar i la temperatura, en aigües i aliments vegetals.
- 2) Determinar l'efectivitat del clor en la inactivació dels HAdV, JCPyV i MNV en aigua de mar per al seu ús en la depuració de marisc.
- 3) Estudiar l'efectivitat del clor en la inactivació del HEV i HAdV en aigua amb contaminació fecal.
- 4) Estudiar l'efectivitat de la llum ultraviolada en la inactivació dels HAdV, JCPyV i bacteriòfags MS2.
- 5) Avaluar l'eficiència i la robustesa dels mètodes moleculars basats en la PCR per a la quantificació de virus a partir d'aliments vegetals.
- 6) Analitzar l'eficàcia dels tractaments enzimàtics en la qPCR per a aproximar els resultats obtinguts mitjançant tècniques moleculars als resultats d'infectivitat en els processos de desinfecció per clor i llum ultraviolada.
- 7) Desenvolupar tècniques moleculars per a la detecció i quantificació dels parvovirus de pollastre i gall d'indi en les principals fonts de contaminació.
- 8) Avaluar l'ús dels parvovirus de pollastre i gall d'indi com a indicadors de contaminació fecal d'aviram en mostres ambientals.

2. OBJECTIVES

The objectives of this thesis are organized in two research fields. First, on the study of viral persistence in natural environments and during disinfection processes, and secondly, on the descriptions of a novel indicator of fecal contamination of poultry origin as a MST tool. The specific objectives are:

- 1) To characterize parameters for the natural inactivation of HAdV due to the effect of sunlight and in water and fresh produce.
- 2) To determine the effect of chlorine on the inactivation kinetics of HAdV, JCPyV and MNV in seawater to be used in shellfish depuration.
- 3) To study the effect of chlorine on the inactivation kinetics of HEV and HAdV in water with fecal contamination.
- 4) To study the effect of ultraviolet radiation on the inactivation of dispersed HAdV, JCPyV and MS2 bacteriophages.
- 5) To evaluate the efficiency and robustness of molecular methods based on the PCR for the quantification of viral particles from fresh produce.
- 6) To analyze the effectiveness of different enzymatic treatments performed before qPCR, to approach the obtained results to those observed by infectivity assays in disinfection processes with chlorine and ultraviolet light.
- 7) To develop molecular techniques for the detection and quantification of Ch/Tu PaV in fecal and slaughterhouse samples.
- 8) To evaluate the use of Ch/Tu PaV as indicators of poultry fecal contamination in environmental samples.



3. PUBLICACIONES

3. PUBLICACIONS

3.1 Llistat de publicacions

La present tesi doctoral està fonamentada en les publicacions detallades per ordre cronològic a continuació:

- 1) **D'Agostino M, Cook N, Di Bartolo I, Ruggeri F, Martelli F, Banks M, Vasickova P, Kralik P, Pavlik I, Kokkinos P, Vantarakis A, Söderberg K, Maunula L, Verhaelen K, Rutjes S, de Roda Husman AM, Hakze R, Van der Poel W, Kozyra I, Rzeżutka A, Prodanov J, Lazic S, Petrovic T, Carratala A, Girones R, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D.** Multicenter collaborative trial evaluation of a method for detection of human adenovirus in berry fruit. *Food Analytical Methods*. 2012; 9:1-7.
- 2) **Correa AA, Carratala A, Monte-Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S.** 2012. Chlorine Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus and Human JC Polyomavirus in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(18): 6450-7.
- 3) **Carratalà A, Rusinol M, Hundesa A, Biarnes M, Vantarakis A, Kern A, Suñen E, Girones R, Bofill-Mas S.** A novel tool to trace poultry fecal contamination in the environment: specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(20): 7496-9.
- 4) **Girones R, Carratalà A, Calgua B, Calvo M, Rodriguez-Manzano J, Emerson S.** Chlorine disinfection of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *Manuscrit sotmès*, 2013.
- 5) **Carratalà A, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Fresno S, Girones R.** Effect of temperature and sunlight on HAdV and MS2 stability as fecal contaminants on fresh produce surfaces. *Manuscrit acceptat a International Journal of Food Microbiology*, 2013.
- 6) **Carratalà A, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Sommer R, Girones R.** Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters. *Manuscrit sotmès*, 2013.
- 7) **Calgua B, Carratalà A, Guerrero L, de Abreu Corrêa A, Kohn T, Sommer R, Girones R.** Inactivation of JC polyomavirus, human adenoviruses and noroviruses exposed to ultraviolet radiation as measured by infectivity and qPCR assays. *Manuscrit en preparació*.

3.2 Informe de coautoría

D'Agostino M, Cook N, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Martelli F, Banks M, Vasickova P, Kralik P, Pavlik I, Kokkinos P, Vantarakis A, Söderberg K, Maunula L, Verhaelen K, Rutjes S, de Roda Husman AM, Hakze R, Van der Poel W, Kozyra I, Rzeżutka A, Prodanov J, Lazic S, Petrovic T, Carratala A, Girones R, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D. Multicenter collaborative trial evaluation of a method for detection of human adenoviruses in berry fruit. *Food Analytical Methods*. 2012; 9: 1-7.

Aquest estudi inter-laboratori es part del treball de la doctoranda al projecte europeu VITAL i en la implementació i selecció de mètodes per a l'anàlisi de virus en aliments. La doctoranda ha estat la responsable del treball experimental realitzat al laboratori de Barcelona. Ha participat en la preparació de les suspensions víriques de HAdV que s'han distribuït entre els altres laboratoris participants en l'assaig i en la redacció del protocol seguit durant l'estudi. S'ha encarregat de la recepció dels materials necessaris per a l'estudi col·laboratiu, en la seva concentració, processament i anàlisi. També ha participat en la redacció i revisió de l'article prèviament a la seva publicació.

Correa AA, Carratala A, Monte-Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S. 2012. Chlorine Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus and Human JC Polyomavirus in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(18): 6450-7.

La doctoranda ha col·laborat en bona part de la feina experimental, especialment en l'estudi dels adenovirus humans. També ha contribuït de manera significativa en l'anàlisi dels resultats obtinguts.

Carratalà A, Rusinol M, Hundesa A, Biarnes M, Vantarakis A, Kern A, Suñen E, Girones R, Bofill-Mas S. A novel tool to trace poultry fecal contamination in the environment: specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(20): 7496-9.

La doctoranda ha realitzat la major part del treball experimental incloent la realització dels mostresjos, el desenvolupament experimental i l'anàlisi dels resultats. Addicionalment, també ha contribuït en els assajos filogenètics i ha redactat el manuscrit sota la supervisió de la Dra. Sílvia Bofill i de la directora de tesi.

Rosina Girones, Anna Carratalà, Byron Calgua, Miquel Calvo, Jesús Rodríguez-Manzano, Suzanne Emerson. Chlorine disinfection of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. Manuscrit sotmès, 2013.

La doctoranda ha col·laborat en els anàlisis de la inactivació dels adenovirus humans en aigua per clor, contribuint en la discussió del disseny experimental i avaluant la desinfecció dels adenovirus mitjançant assajos d'infectivitat i assajos de qPCR. La doctoranda també ha participat en la elaboració del manuscrit juntament amb la directora de tesi.

Carratalà A, Rodríguez-Manzano J, Hundesa A, Rusiñol M, Fresno S, Cook N, Girones R. Effect of temperature and sunlight on HAdV and MS2 stability as fecal contaminants on fresh produce surfaces. Manuscrit acceptat a International Journal of Food Microbiology, 2013.

L'estudi és part del treball desenvolupat al projecte europeu VITAL en el que la doctoranda ha participat activament. La doctoranda ha realitzat la major part del treball experimental. Ha contribuït definint el disseny experimental, preparant les suspensions virals requerides durant l'estudi i ha participat molt activament en els assajos d'infectivitat i de qPCR per avaluar la inactivació dels adenovirus humans i del bacteriòfag MS2. Finalment, ha elaborat el manuscrit sota la supervisió de la directora de tesi.

Carratalà A, Rusiñol M, Rodríguez-Manzano J, Guerrero-Latorre L, Sommer R, Girones R. Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters. Manuscrit sotmès, 2013.

L'estudi es part del projecte europeu VIROCLIME en el que la doctoranda ha participat activament. La doctoranda ha desenvolupat el disseny experimental juntament amb els altres coautors i ha realitzat la major part del treball experimental; preparació de les suspensions víriques requerides durant l'estudi i realització dels assajos d'infectivitat i qPCR. La doctoranda ha participat en la discussió dels resultats obtinguts i ha elaborat el manuscrit juntament amb la directora de tesi.

Calgua B, Carratalà A, Guerrero L, de Abreu Corrêa A, Sommer R, Girones R. Inactivation of JC polyomavirus, human adenoviruses and noroviruses exposed to ultraviolet radiation as measured by infectivity and qPCR assays. Manuscrit en preparació.

La doctoranda ha col·laborat en la preparació de les suspensions virals utilitzades en l'estudi i en el manteniment de les línies cel·lular. Addicionalment, ha dut a terme l'anàlisi dels norovirus i dels

bacteriòfags MS2. La doctoranda també ha contribuït en l'anàlisi dels resultats obtinguts i en la redacció de l'article juntament amb el primer signant del treball i la directora de tesi.

Cap dels coautors dels articles ha utilitzat les dades descrites en aquestes publicacions per a l'elaboració de la seva tesi doctoral.

Prof. Rosina Girones Llop

Barcelona, a 20 de Gener del 2013.

3.3 Informe sobre el factor d'impacte

Les publicacions que formen part de la present tesi doctoral, presentada per l'Anna Carratalà Ripollès, han estat publicats o s'han sotmès a publicació en revistes científiques rellevants per a la línia d'investigació en la qual ha participat.

Els articles **“Chlorine Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus and Human JC Polyomavirus in seawater”** i **“A novel tool to trace poultry fecal contamination in the environment: specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses”** han estat publicats a la revista ***Applied and Environmental Microbiology*** a l'any 2012. A l'any 2011, l'índex d'impacte era de **3,829**. L'article **“Multicenter collaborative trial evaluation of a method for detection of human adenoviruses in berry fruit”** ha estat publicat a la revista ***Food Analytical Methods*** durant l'any 2012. L'índex d'impacte d'aquesta revista a l'any 2011 era de **1,943**. L'article **“Effect of temperature and sunlight on HAdV and MS2 stability as fecal contaminants on fresh produce surfaces”** està acceptat a la revista ***International Journal of Food Microbiology*** que l'any 2011 presentava un índex d'impacte de 3.327.

Els articles **“Chlorine disinfection of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water”** i **“Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters”** estan sotmesos per a la seva publicació.

Finalment, l'article **“Inactivation of JC polyomavirus, human adenoviruses and noroviruses exposed to ultraviolet radiation as measured by infectivity and qPCR assays”** estan actualment en preparació.

Signat,

Prof. Rosina Girones Llop

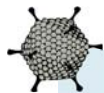
Barcelona, 20 de Gener del 2013.



CAPÍTOL 1

Inactivació natural dels virus al medi ambient

- RESUM ESTUDI 1



“Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters”.

Carratalà A, Rusiñol M, Rodríguez-Manzano J, Guerrero-Latorre L, Sommer R, Girones.

Manuscrit sotmès, 2013.

L'estabilitat de les partícules víriques a les diverses condicions ambientals i als tractaments de desinfecció és molt important per a la transmissió de les malalties infeccioses. Certs estudis han descrit que determinats factors biòtics i abiòtics poden suposar un repte per a la persistència dels virus contaminants al medi ambient però la inactivació natural dels virus contaminants a l'aigua no està ben caracteritzada. En aquest estudi, s'ha investigat l'efecte de la temperatura i la radiació solar, en la inactivació dels adenovirus humans en diversos ambients aquàtics per a definir paràmetres d'estabilitat aplicables a models de disseminació de virus a l'aigua.

Els experiments es van dur a terme analitzant l'estabilitat dels HAdV en reactors que contenien PBS, aigua mineral, aigua residual, aigua residual diluïda i aigua de mar a 7, 20 i 37°C, situats a la foscor o sota llum solar artificial, mitjançant assajos d'infectivitat i qPCR.

A la foscor, no es va observar inactivació dels HAdV a 7 i 20°C en cap dels tipus d'aigua estudiada. Els resultats eren diferents a 37°C i al final de l'experiment (24 hores) es va identificar una reducció dels HAdV de 6 logaritmes als reactors que contenien d'aigua residual, aigua residual diluïda i aigua de mar. Pel contrari, a aquesta temperatura no es va observar una reducció del nombre de partícules víriques infeccioses als reactors amb matrius més simples com el PBS o l'aigua mineral.

La llum solar té un paper rellevant en la inactivació natural dels HAdV i s'ha observat una inactivació de 2 logaritmes en tots els reactors a 7 i 20°C, mentre que no es va observar cap reducció en condicions de foscor. Una reducció equivalent es va identificar a 37°C en els reactors amb aigua mineral i PBS. Pel contrari, els resultats observats a partir dels reactors amb aigües complexes (aigua residual i aigua de mar) estudiats a 37°C van ser molt semblants als observats a la foscor, la qual cosa indica que la inactivació observada possiblement és deguda a l'acció de microorganismes presents a la mostra. S'ha definit els temps d'inactivació ($t_{90-t_{99,99}}$) en les diferents condicions estudiades.

La inactivació natural dels HAdV és un procés complex i multifactorial en el que la llum solar juga un paper important, però altres factors com la càrrega microbiana poden ser molt rellevants especialment a temperatures elevades i en aigües complexes.

Sunlight inactivation of human adenoviruses in natural waters

Anna Carratalà^a, Marta Rusiñol^a, Jesús Rodríguez-Manzano^a, Laura Guerrero-Latorre, Regina Sommer^b, Rosina Girones^{a*}.

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

^b Medical University Vienna, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Water Hygiene, Vienna, Austria.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1483; fax: +34 93 403 9047.

E-mail address: rgirones@ub.edu

Keywords

Sunlight, inactivation, human adenoviruses, temperature, kinetics, infectivity, qPCR

Abstract

Human adenoviruses are widely detected in recreational waters and have a double role as pathogens and as viral indicators of human fecal contamination. In this work, the effect of temperature (7, 20 and 37°C) and sunlight, as major factors on the natural inactivation of pathogens, has been evaluated in water matrices comprising PBS, mineral water, wastewater, 1000-fold diluted wastewater and seawater. The stability of human adenovirus 2 was monitored in 150 ml reactors, both in the dark and exposed to a solar simulator lamp sunlight during 24 hours, by immunofluorescence assays (IFA) and secondarily, by qPCR. In the dark, no inactivation of HAdV was observed in reactors containing PBS or mineral water at any of the temperatures studied whereas at 37°C, decays between 2.5 and 6 logarithms were achieved in wastewater, diluted wastewater and seawater reactors. A clear effect of sunlight was observed in the experiments. At 7 and 20°C, a decay of 2-log was identified in all reactors while at 37°C, results in wastewater, diluted wastewater and seawater reactors were equivalent to those observed in the dark. Inactivation parameters are calculated for each assay. The environmental relevance and mechanisms behind the natural inactivation of HAdV in water are identified and further discussed in this paper.

Text

Introduction

Water used for irrigating, drinking and recreational purposes, has been widely linked to the transmission of infectious viral diseases among human populations (ter Waarbeek et al. 2010; Riera-Montes et al. 2011; Nenonen et al. 2012). Viral pathogens are released in stool in high numbers, and may contaminate surface and coastal waters by several routes such as urban and agricultural land runoff or discharges of improperly treated wastewater (Jiang et al. 2001; Rodríguez-Lázaro et al. 2012).

The stability of viral particles is accepted by the scientific community as the capability of viruses to remain infectious along the time, in the environment or after disinfection treatments (Carter, 2005). A high stability of certain enteric viruses to environmental conditions and disinfections treatments has been described. However, it is known that viral contaminants may be naturally inactivated, both by abiotic and biotic factors (Bertrand et al., 2012; Gordon and Toze, 2003).

Sunlight is known as a challenge to the persistence of viruses (Viau et al. 2011; Boehm et al. 2009) and it has been exploited in the last 15 years as a low-cost alternative procedure to inactivate pathogens in drinking water (McGuigan et al. 2012). Temperature is an important factor for the stability of viruses in the environment and heat treatments are commonly applied in food industry. However, there are evidences that enteric viruses may even persist after water disinfection treatments that eliminate bacteria (Tree et al. 2003; Sirikanchana et al. 2008; Simmons and Xagorarakis, 2011; Rodriguez-Manzano et al. 2012) and concerns have been stated regarding the use of bacterial parameters as indicators of fecal contamination in the environment (Gerba et al., 1979; Lipp et al., 2001).

Due to their epidemiologic characteristics, human adenoviruses have been proposed as alternative indicators of human fecal contamination and applied to evaluate the efficiency of disinfection treatments (Pina et al., 1998; Formiga-Cruz et al. 2003; Albinana-Gimenez et al. 2009). HAdV are excreted by healthy and symptomatic humans at high concentrations and are widely prevalent in urban wastewater in all geographical areas, all over the year (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006; Fong et al., 2010; Kokkinos et al., 2011; Rigotto et al., 2010).

In order to achieve a better understanding of the global dissemination of waterborne viral diseases, characterizing the role of different environmental factors on the inactivation of viral contaminants is needed. In the present study, the main objective was to investigate the natural inactivation of HAdV in a diversity of water types relevant to the transmission of waterborne infectious diseases. The effect of temperature and sunlight on the stability of human adenovirus is analyzed in PBS, mineral water, wastewater, diluted wastewater and seawater reactors. Inactivation

parameters of human adenovirus in water matrices will be useful for the development of viral dissemination models in superficial waters.

Materials and methods

Viral suspensions

Human adenovirus type 2 stocks were produced infecting A549 cells cultured in Earl's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 1% glutamine, 50 µg of gentamycin per mL and 10% (growth medium) or 2% (maintenance medium) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Viruses were released from cells by freezing and thawing the cultures for 3 times. Then, a centrifugation step at 3000 x *g* for 20 minutes was applied to eliminate cell debris. Viruses were ultra-centrifuged and re-suspended in PBS without further purification. Finally, viral suspensions were quantified and stored in 10 mL aliquots at -20°C until used.

Sunlight simulation

Light conditions applied in the assays simulated solar radiation by the exposition to a 400-W Philips MSR400 HR hydrargyrum medium-arc iodide (HMI) lamp focus (Koninklijke Philips Electronics, Netherlands). The lamp was installed inside a thermo-static chamber. As previously described, this lamp has a spectral power distribution that approximates the UVA, UVB and PAR levels of natural sunlight; a continuous spectrum from 250 to 800 nm and a power plateau from 400 to 700 nm (Dick et al. 2010). It is known that irradiation produced by the lamp may differ at different temperatures and conditions. Thus, the total output radiation was controlled during our experiments using a pyranometer (LP Pyra03, Delta Ohm Srl, Italy) and UVA (320 to 400 nm) and UVB radiation (280 to 320 nm) by specific sensors for their wavelengths (LP UVA and UVB, Delta Ohm Srl, Italy). As a reference measure, intensities of total radiation, UVA and UVB were measured outdoors on a spring sunny day at 23 °C; the total radiation was 9.70 KW/m², the UVA radiation was 506 µW/cm² and the UVB was, 40 µW/cm². The mean total irradiation emitted by the lamp was 3,57 KW/m², the UVA was 33,37 µW/cm² and the UVB was 0,1 µW/cm² at 7°C. The mean values of total, UVA and UVB radiations applied to the samples at each sampling time are presented in Table 1.

Water matrices and experimental design

Different types of water were selected considering their potential role in the dissemination of viral contaminants in the environment. The water matrices studied in these experiments are phosphate buffered saline (PBS) as a control matrix, and mineral water, wastewater, wastewater 1000-fold diluted in mineral water and seawater as a representation of superficial waters showing different levels of fecal contamination.

Commercial mineral water was acquired in a local retailer. Raw wastewater was collected at the entry of a treatment plant located in Catalonia, that receives sewage from 2.275.000 inhabitants. Sewage may be diffused after heavy rain or floods episodes, so we included microcosms containing wastewater diluted 1000-fold in commercial mineral water.

Seawater samples were collected in a beach located in the South of Barcelona avoiding the potential recollection of sand and macroalgae. Turbidity, conductivity, PH and light absorbance were determined for each water type at the beginning of the assay.

Reactors were prepared by distributing 150 ml of water sample in transparent glass beakers, standing on magnetic stirrers in a thermostatic chamber where temperature was controlled during the experiments at 7, 20 and 37°C. Inside the thermostatic chamber both dark and light conditions were assayed in each temperature. Dark conditions were performed in parallel and achieved by covering the pyrex glass beakers with an opaque paper-box. In all experimental conditions, water microcosms were covered with 0.05 mm-thick FEP-teflon films, 96% transparent to UVA and UVB light (Dupont Corporation, Wilmington, DE) to protect the microcosms from external inputs (Dick et al. 2010).

Human adenoviruses suspensions were spiked in the microcosms at a concentration of 10^6 foci forming units/ml (FFU/ml). Each single experiment was developed in duplicate during 24 hours collecting samples at 5 times (0, 2, 4, 8 and 24 hours). Ten-ml samples were taken at each sampling time and filtrated through 0.22µm filters (Millex-GP, Millipore, Ireland) to avoid contamination interfering on the infectivity assays. Immunofluorescence assays (IFA) to evaluate HAdV infectivity after the inactivation experiments were performed within 24 hours keeping the samples at 4°C until then.

Infectivity assays

Immunofluorescence assays (IFA) for the quantification of infectious HAdV2 were performed as described in a previous work (Calgua et al., 2011). Briefly, A549 monolayers were incubated overnight in 8-well chamber slides (Lab-Tek II, Nalgel Nunc International, Naperville, IL) at 37 °C in 5% of CO₂ until a 90-100% of confluence. One hundred microliters of direct or diluted samples were inoculated in triplicate into each well and incubated for 90 minutes at 37 °C in 5% CO₂. After that, 2% FBS-supplemented EMEM was added and incubated for 3 days at 37 °C in 5% CO₂. After 3 days incubation, the monolayers were fixed with chilled absolute methanol for 10 minutes and rehydrated by soaking in PBS for 5 minutes. The monolayers were blocked for 1 hour in blocking solution containing PBS with 1% BSA (w/v) and 0.05% Tween (v/v). After removing the blocking solution, the monolayers were incubated for 1h with their first antibody solution. Cells were then stained for 15 minutes at RT with a 1:100 dilution of goat anti-mouse IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

in blocking solution. The IgG antibody was removed and cells were rinsed with PBS for 15 minutes. Finally, chambers were mounted by adding UltraCruz™ mounting medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and observed under UV light in an epifluorescence microscope.

Nucleic acid extraction

An enzymatic digestion treatment was applied in this study to reduce false positive results by detection of free DNA when using qPCR analysis. The samples obtained from the assays conducted at 37°C in mineral water and in wastewater, were digested using 100U of Deoxyribonuclease I (DNAse I, Molecular Grade, Invitrogen), according to manufactured instructions, before the nucleic acid extractions. Nucleic acids (NA) from viral concentrates were extracted with the QIAmp® Viral RNA kit (QIAGEN, Inc.) using the QIAcube automated platform. A negative control was included in all the nucleic acid extraction procedures. Finally, NA eluates were stored at -20 °C until used.

Quantitative real-time PCR

HAdV quantitation was based on the qPCR assays previously described by Hernroth et al., 2002 and modified in Bofill-Mas et al., 2006. Standards for the real-time PCR assays for HAdV2 were produced as described before (Albinana et al., 2009). For the amplification of HAdV genomes, reactions were performed in a 25µL volume with PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 10 µL of DNA sample or 10 µL of a quantified DNA plasmid, 1× Taq-Man master mix, and the corresponding primers and Taq-Man probes for HAdV. HAdV2 genomes were quantified following the activation of the uracil N-glycosylase contained in the core mix (2 min at 50 °C), the activation of AmpliTaq Gold for 10 min at 95 °C, and 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C).

Calculation of inactivation times T_{90} , T_{99} , $T_{99.9}$ and $T_{99.99}$

Viral inactivation has been shown to fit of a first-order kinetics and it is generally assumed that the number of viruses remaining in a certain environment after a certain time (t) fits an equation derived from Chick's Law (Chick, 1910). Viral inactivation can be defined by the following equation: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$ where t is the time of contact, N_t is the number of viruses that remain after the time of contact and N_0 is the number of viruses at time zero. The inactivation velocity constant (k, h⁻¹) of each viral group can be expressed as the slope of the line $\log(N_t/N_0)$ vs time t without intercept. From these expressions, T_{90} is defined as the time required for the inactivation of 90% of the initial microorganisms. To increase the confidence of the estimations, another model was computed using a quadratic regression curve. The equation of this second model is $y = y_0 + \alpha t + \beta t^2$ where y_0 is the predicted number of viruses at time 0, and α and β are the linear and quadratic terms of the

regression curve respectively. Therefore, the most suitable model for each experimental condition was evaluated. Generation of regression curves and prediction of the time required for 90, 99, 99.9, or 99.99% viral inactivation were accomplished by including data points from all experiments for each virus and food type at different temperature. The predicted (linear line) and observed (individual data points) values were plotted on charts (Microsoft Excel, 2010), representing log inactivation [$\log(N_t/N_0)$] versus time (Figure 1 and 2).

Results

Characterization of the water types

Each water type tested in the experiments was characterized by measuring turbidity, conductivity, pH and light absorbance. The obtained data is shown in Table 1. From our measurements, highest turbidity values were detected in wastewater (142 NTU) and seawater (3,69 NTU). Conductivity values measured in PBS and seawater samples were the highest above all, being 15.29 and 54.5 mS respectively. PH registered in the samples showed values ranging from 7.35 in PBS to 8.8 in seawater samples. As expected, reactors containing wastewater and diluted wastewater are those showing higher absorbance values in the range of UV wavelengths.

Effect of temperature on HAdV stability in water microcosms

The effect of temperature on the inactivation of HAdV was assayed performing the experiments at 7, 20 and 37°C in dark conditions. The obtained inactivation kinetics are presented in Figure 1. No inactivation was observed in 24 hours in PBS (data not shown) and mineral water, at the studied temperatures in the absence of light. In those reactors containing wastewater and seawater, minor or no differences were observed between the results obtained at 7 and 20°C. However, higher HAdV inactivation rates were identified both in wastewater and seawater reactors at 37°C. In wastewater reactors, 6-log of HAdV inactivation were achieved after 24h at 37°C. In consistence, in the same conditions, a 3-log decay was observed in seawater microcosms. No inactivation was detected by qPCR analysis in any case, even after performing enzymatic treatments to quantify structured viral particles.

Effect of sunlight on HAdV stability in water microcosms

To evaluate the effect of sunlight on HAdV inactivation, duplicate experiments were performed at the studied temperatures in the exposition to a lamp simulating natural sunlight radiation simultaneously to the reactors in the dark. The radiations emitted by the lamp were monitored during the experiments and are detailed in Table 2. At 7°C we registered an emission in the wavelength of UVB achieving a dose of 122,91 J/m² at the end of the assays. On the contrary, no

UVB emission was registered at 20 and 37°C. At these temperatures the lamp emitted exclusively in the wavelength of UVA achieving, after 24 hours, similar doses at both temperatures (24.875 and 26.957 J/m² respectively).

In accordance to the above-mentioned remarks, at 7°C, HAdV followed a rapid initial inactivation achieving a decay of 4-log after 5 hours of exposition in all microcosms. From this point, the inactivation was stabilized and a decay between 5 and 6-log was achieved at the end of the experiments in all reactors. These results are shown in Figure 2.

Reactors prepared with both PBS (data not shown) and mineral water, presented similar results at higher temperatures with about 1.5 logs at the end of the experiment. Interestingly, higher inactivation values were observed in wastewater, diluted wastewater and seawater reactors. In wastewater reactors the decays observed were of 2-log at 20°C, and 6-log when the experiments were performed at 37°C. In the reactors prepared diluting wastewater in mineral water, we identified an inactivation of 1-log at 20°C. At 37°C, the inactivation was more evident, achieving a decay of 4-log after 24 hours. A decay of 3-log was achieved in seawater microcosms both at 20 and 37°C.

Inactivation times: T_{90} , T_{99} , $T_{99.9}$ and $T_{99.99}$

Two different inactivation models were used in the statistic analysis of the obtained results to calculate the inactivation times. At 7°C and under light conditions, the inactivation of HAdV in all the microcosms followed a linear-quadratic model while at dark and in all the experiments at 20°C and 37°C, the results followed a log-linear model. All inactivation times showed strong correlation values (r^2) higher than 0,85. The times of inactivation (T_{90} , T_{99} , $T_{99.9}$ and $T_{99.99}$) of HAdV in mineral water and PBS experiments could be calculated exclusively under light conditions since no inactivation was shown at dark conditions.

The inactivation times calculated for the results obtained at 7°C are presented in Table 3. In all the experimental conditions, similar inactivation times were found between PBS and mineral water. Equivalent inactivation times were also calculated for our experiments with wastewater, diluted wastewater and seawater microcosms. However, the inactivation times are highly divergent between clear (PBS and mineral water) and complex water matrices (wastewater, diluted wastewater and seawater).

Briefly, at 7°C, with a total irradiation of 20.954 KJ/m², a UVA irradiation of 25.413 J/m² and a UVB irradiation of 122,91 J/m², the inactivation time to achieve the reduction of 99.99% of the initial viral titer ($T_{99.99}$) was 11.7 hours in PBS and 6.1 hours in mineral water. In wastewater, the $T_{99.99}$ was 5,9 hours whereas 6,5 and 6,9 hours were shown for diluted wastewater and seawater respectively. In the experiments developed at 20 and 37°C, no UVB radiation was registered. At 20°C, the $T_{99.99}$

value increased to 75.1 hours in PBS and 66 hours in mineral water while at 37°C, the $T_{99,99}$ value was 63.9 and 51.2 in PBS and mineral water, respectively. At the same temperature; 35,2 hours in wastewater, 49,5 hours in diluted wastewater and 32,8 hours in seawater. Under solar simulation at 37°C, the inactivation times to achieve of 4-log decay in viral titer were 63,9 and 52,2 hours in PBS and mineral water respectively. However, these times were found shorter in wastewater, diluted wastewater and seawater respectively. Particularly, in these water matrices, we observed an inactivation of HAdV in the dark. In this experimental conditions, the inactivation times $T_{99,99}$ were 15,6 in wastewater, 33,6 in diluted wastewater and 30,1 in seawater. The inactivation times calculated for the experiments performed at 20 and 37°C are presented in Tables 4 and 5, respectively.

Discussion

In the present work, our main objective was to define inactivation parameters that could be useful for implementing models on viral dissemination in water. While heat is known to inhibit host-cell recognition or binding (Wigginton et al. 2012), solar inactivation occurs by three distinct mechanisms: directly through by genome damage and indirectly by endogenous or exogenous photo-inactivation (Davies-Colley et al. 1999; Davies-Colley et al. 2000; Kohn and Nelson, 2007; Romero et al. 2011). Sunlight wavelengths in the range of UVC (100-280 nm) are extinct before reaching surface and coastal waters. Consequently, direct damages caused by sunlight are mainly due to the effect of UVB (wavelengths of 280-320 nm) and derived photoproducts that may block genome replication such as pyrimidine dimers (Schuch and Menck, 2010). Both UV and visible light of sunlight, may initiate indirect photo-inactivation mechanisms that are based on the excitation of sensitizer compounds in oxic conditions. This reaction represents a source of reactive oxygen species (ROS) that can inactivate viral particles by different mechanisms. Sensitizers may be located within the microorganisms and lead to endogenous inactivation, or outside the cell and contribute to exogenous inactivation (Kohn and Nelson, 2007).

In order to evaluate the contribution of temperature to the inactivation of HAdV in water, all experiments were performed at three distinct temperatures with or without light. From the obtained results, no inactivation was observed at dark after 24 hours at 7 and 20°C in any of the water types tested. However, at 37°C, a linear reduction between 4 and 6-log was identified in wastewater, diluted wastewater and seawater microcosms. This reduction is probably caused by the direct or indirect action of microorganisms present in the samples that may grow or become more active at higher temperatures. Similar results on the stability of enteric viruses in water at low temperatures has been widely described in several matrices (Enriquez et al. 1995; Raphael et al. 1985; reviewed by Rztzuka and Cook, 2004) and the effect of biotic agents in the inactivation of pathogens, both in

seawater and fresh water, has been also previously reported (Fujioka et al. 1980; Girones et al. 1989a; Gordon and Toze, 2003). Further studies have confirmed this hypothesis by repeating the assays autoclaving or filtrating the water samples, or adding antibacterial agents (Girones et al. 1989b; Raphael et al. 1985).

Here, the effect of sunlight on viral inactivation in water was studied by monitoring the persistence of infectious HAdV exposed to a lamp with a radiation spectrum similar to natural sunlight, at 7, 20 and 37°C. The experiments performed, in parallel, at dark were used as controls. At 7°C, the lamp used in the experiments emits UVB radiation, and after 24 hours of analysis, the radiation accumulated by the samples was 122,91 J/m². At higher temperatures, the radiation in this wavelength was not detected and UV radiation was restricted to UVA wavelength. To date, there are strong evidences indicating that UVB radiation is highly effective for the disinfection of enteric viruses and other fecal indicators (Sinton et al. 2002; Kohn and Nelson, 2007; Love et al. 2010). The results obtained in the experiments performed at 7°C are consistent with these observations. In these conditions, HAdV decayed similarly in all reactors following biphasic kinetics and showing a clear tailing effect. As mentioned above, no inactivation was observed at dark. We suggest that in these conditions the inactivation of HAdV is caused by the direct damage of UVB and that indirect photo-inactivation is negligible. Similarly, some other works have described UVB as the main responsible of the inactivation of MS2, rotavirus, adenovirus and poliovirus, in water exposed to full sunlight spectrum (Kohn and Nelson, 2007; Love et al. 2010; Romero et al. 2011).

The tailing effect of disinfection kinetics has been identified in many UVC (254 nm) studies, where the viral inactivation begins with a rapid initial decay followed by a subsequent stabilization (Chang et al. 1985; Hijnen et al. 2006; Nieuwstad and Havelaar, 1994). This effect has traditionally been explained by light shielding of viral particles or aggregates (Nieuwstad and Havelaar, 1994), the presence of resistant viruses (Cutler et al. 2011) and recombination of damaged viruses within the host cell (Luria and Dulbecco, 1949; Galasso et al. 1965; Sharp and Kim, 1966). More recently, Mattle and Kohn (2012) have shown that tailing effect in MS2 bacteriophages inactivation does not correlate neither with viral aggregation, nor light shielding or resistant virus subpopulations, but do correlate well with recombination. Some authors have described that pyrimidine dimers may enhance recombination processes (Lin and Howard-Flanders, 1976). Remarkably, viral aggregation has shown to be efficient at inducing recombination processes of damaged vaccinia virus and echovirus inside their host cells (Abel, 1962; Young and Sharp, 1979).

At 20 and 37°C in light conditions, HAdV inactivation followed a first-order kinetic in all microcosms. This finding might be mainly explained by two reasons. First, it is possible that since at 20 and 37°C, the lamp does not emit in the region of UVB, direct inactivation is probably minor or inexistent and viral inactivation is more discrete. Thus, the tailing effect is not identified in 24h, but

could be described if the experimental design was longer. Secondly, as it is mentioned above, it is also possible that UVB damages may enhance recombination processes and the tailing effect.

At 20 and 37°C in light conditions, in PBS and mineral water HAdV2 showed an inactivation of 2-log, while no reduction was observed in the dark. In wastewater, diluted wastewater and seawater reactors, at 20°C HAdV inactivation was similar to the reduction observed in PBS and in mineral water (around 2-log in all reactors). On the contrary, at 37°C HAdV inactivation was equivalent to the results observed in the same conditions in the dark. Thus, HAdV decay in these conditions is not due to sunlight and biotic factors may be more relevant than photo-inactivation mechanisms.

Wastewater and seawater have a higher microbial content than mineral water, and a significant presence of organic matter with substances that may act as sensitizers. Hence, it is expectable that in these microcosms photo-inactivation may be caused both by endogenous and exogenous mechanisms. However, at 20°C the inactivation of HAdV in wastewater, diluted wastewater and seawater microcosms, is similar to the inactivation observed in clear mineral water, achieving a decay of 2-log approximately in all cases. From these results, the relative contribution of each indirect photo-inactivation mechanism cannot be identified and further studies are needed to elucidate this question.

At 37°C, the inactivation of HAdV does not exceed the inactivation observed in dark conditions and cannot be due to the effect of sunlight. Thus, at 37°C in all microcosms with higher microbial content, the effect of biotic factors on the reduction of infectious HAdV is more relevant than the effect of photo-inactivation mechanisms.

Although qPCR is a sensitive and specific technique, it may underestimate viral inactivation by the action of different agents, since the nucleic acids may be still amplified (Girones et al. 2010). Enzymatic treatments have been used to differentiate intact from damaged virus on the basis of differences on the ability of the viral proteic capsids to protect genomes from proteases and nucleases (Nuanualsuwan and Cliver, 2002; Rodriguez et al. 2009; de Abreu Corrêa et al. 2012). Here, no inactivation was shown by qPCR analysis, even after performing enzymatic treatments based on DNase digestion, so the suitability of these procedures remains inconclusive. Further work should be carried out to develop a molecular method that provides data equivalent to those results obtained by infectivity assays and that allows developing inactivation studies with those viruses that cannot be cultured in the laboratory.

In conclusion, the natural inactivation of HAdV in water and in extent of other viral pathogens is a highly complex process that may be ruled by a wide range of interacting factors, with sunlight and temperature playing a major role. As expected UVB has been related to a major viral inactivation and wastewater produced a faster inactivation compared to the 1000-fold diluted matrix, and seawater that showed intermediate inactivation of HAdV. As previously described, the

results support the importance of biotic factors on viral inactivation. Viruses persist for longer periods in simple water matrices, such as those used as drinking sources or for irrigating, especially in the dark and at a temperature range of 7-20°C. Considering this observation, contamination events occurring in the distribution system or in pipes, should pose a particular concern.

Despite the relevance of waterborne viruses worldwide, few efforts have been addressed to identify the environmental agents threatening viral persistence. Overall, the characterization of the inactivation mechanisms driving viral inactivation is needed to sustainably improve water quality and may be used to develop alternative low-cost management measures. The inactivation parameters calculated here, could be used for the development or improving of models of viral dissemination in water.

Acknowledgments

This work was partially supported by the European Commission Framework Program 7 project “Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VITAL)” (Grant No. KBBE 213178) led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, UK), Martin D’Agostino (FERA, UK) and Franco M Ruggeri (ISS, Italy), and partially the European project, VIROCLIME (Grant No. 243923), coordinated by David Kay and Peter Wyn-Jones (University of Aberystwyth, UK). During the development Anna Carratalà was a fellowship of the Spanish Ministry of Science and Innovation and Marta Rusiñol was fellowship of the Catalan Government “AGAUR” (FI-DGR). We thank the Serveis Científico-Tècnics and the Camps Experimentals of the University of Barcelona for their kind services during these experiments. We are grateful to Tamar Kohn for interesting discussions during the development of this work.

References

1. Abel P. 1962. Multiplicity reactivation and marker rescue with vaccinia virus. *Virology*. 17:511-9.
2. Albinana-Gimenez N, Miagostovich M, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water-treatment plants. *Water Research*. 43:2011-2019.
3. Bertrand, I., Schijven, J., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A. M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N. Gantzer, C. 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 112 1059-1074.
4. Boehm AB, Yamahara KM, Love DC, Peterson BM, McNeill K, Nelson KL. 2009. Covariation and photoinactivation of traditional and novel indicator organisms and human viruses at a sewage-impacted marine beach. *Environ Sci Technol*. 1;43(21):8046-52.
5. Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *App Environ Micro*. 72(12):7894-7896.
6. Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. 2011. Detection and quantitation of infection human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol Methods*. 171(1):1-7.
7. Carter, MJ. 2005 Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1354-1380.
8. Chang JC, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD. 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 49(6): 1361-5.
9. Chick H. 1910. The Process of Disinfection by Chemical Agencies and Hot Water. *J Hyg (Lond)*. 10(2): 237-86.
10. Cutler T, Wang C, Qin Q, Zhou F, Warren K, Yoon KJ, Hoff SJ, Ridpath J, Zimmerman J. 2011. Kinetics of UV(254) inactivation of selected viral pathogens in a static system. *J Appl Microbiol*. 111(2): 389-95.
11. Davies-Colley R.J, Donnison A.M, Speed D.J, Ross C.M, Nagels J.W. 1999. Inactivation of faecal indicator microorganisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res*. 33, 1220-1230.
12. Davies-Colley R.J, Donnison A.M, Speed D.J. 2000. Towards a mechanistic understanding of pond disinfection. *Water Sci. Technol*. 42,149-158.

13. de Abreu Corrêa A, Carratala A, Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S. 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol.* 78(18):6450-7.
14. Dick LK, Stelzer EA, Bertke EE, Fong DL, Stoeckel DM. 2010. Relative decay of Bacteroidales microbial source tracking markers and cultivated *Escherichia coli* in freshwater microcosms. *Appl Environ Micro.* 76 (10): 3255-3262.
15. Enriquez CE, Hurst CJ, Gerba CP. 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Wat Res.* 29(11): 2548-2553.
16. Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB. 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol.* 76(3):715-23.
17. Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl Environ Microbiol*, 69(3):1556-63.
18. Fujioka RS, Loh PC, Lau LS. 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 39(6):1105-10
19. Galasso GJ, Sharp DG. 1965. Effect of particle aggregation on the survival of irradiated vaccinia virus. *J Bacteriol.* 90(4):1138-42.
20. Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am.J. Public Health.* 69:1116-1119.
21. Girones R, Jofre J, Bosch A. 1989a. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 35 (11), 1015-1021.
22. Girones R, Jofre J, Bosch, A. 1989b. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *Journal of Environmental Quality*, 18 (1), 34-39.
23. Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. 2010. Molecular detection of pathogens in water: the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44(15):4325-39.
24. Gordon C, Toze S. 2003. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *J Appl Microbiol.* 95: 536-544.
25. Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue

- mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68: 4523-33.
26. Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 40(1):3-22.
 27. Jiang S, Noble R, Chu W. 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol.* 67(1): 179-84.
 28. Kohn T, Nelson KL. 2007. Sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage via exogenous singlet oxygen produced by sensitizers in natural waters. *Environ Sci Technol.* 1;41(1):192-7.
 29. Kokkinos PA, Ziros PG, Mpalasopoulou A, Galanis A, Vantarakis A. 2011. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virol J.* 27;8:195.
 30. Lin PF, Howard-Flanders P. 1976. Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage λ DNA molecules: the role of DNA replication. *Molecular and General Genetics.* 146 (2): 107-15.
 31. Lipp EK, Farrah SA; Rose JB. 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar. Pollut. Bull.* 42:286-293.
 32. Love DC, Silverman A, Nelson KL. 2010. Human virus and bacteriophage inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage inactivation at a southern California beach. *Environ Sci Technol.* 15;44(18): 6965-70.
 33. Luria SE, Dulbecco R. 1949. Genetic Recombinations Leading to Production of Active Bacteriophage from Ultraviolet Inactivated Bacteriophage Particles. *Genetics.* 34(2):93-125.
 34. Mattle MJ, Kohn T. 2012. Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environ Sci Technol.* 46(18):10022-30.
 35. McGuigan KG, Conroy RM, Mosler HJ, du Preez M, Ubomba-Jaswa E, Fernandez-Ibañez P. 2012. Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. *J Hazard Mater.* 235-236:29-46.
 36. Nenonen NP, Hannoun C, Larsson CU, Bergström T. 2012. Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. *Appl Environ Microbiol.* 2012. 78(6): 1846-52.
 37. Nieuwstad TJ, Havelaar AH. 1994. The kinetics of batch ultraviolet inactivation of bacteriophage-MS2 and microbiological calibration of an ultraviolet pilot-plant. *J Environ Sci Health A.* 29(9), 1993-2007.
 38. Nuanalsuwan S, Cliver DO. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods.* 104(2):217-25.

39. Pecson BM, Valério-Martin L, Kohn, T. 2009. 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.* 68: 5544-54.
40. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3376-3382.
41. Raphael RA, Sattar SA, Springthorpe VS. 1985. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol.* 31(2): 124-8.
42. Riera-Montes M, Brus Sjölander K, Allestam G, Hallin E, Hedlund KO, Löfdahl M. 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol Infect.* 139(12): 1928-35.
43. Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DS, Miagostovich MP, Simões CM, Barardi CR. 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J Appl Microbiol.* 109(6): 1979-87.
44. Rodríguez RA, Pepper IL, Gerba CP. 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 75(2):297-307.
45. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzeżutka A, Bosch A, Gironés R, Carducci A, Muscillo M, Kovač K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff CH, de Roda Husman AM, Hernández M, van der Poel WH. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 36(4): 786-814.
46. Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R. 2012. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.* 66(12):2517-23.
47. Romero OC, Straub AP, Kohn T, Nguyen TH. 2011. Role of temperature and Suwannee River natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environ Sci Technol.* 15;45(24):10385-93.
48. Rzeżutka A, Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* 28(4):441-53.
49. Schuch AP, Menck CF. 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J Photochem Photobiol B.* 1;99(3):111-6.

50. Sharp DG, Kim KS. 1966. Multiplicity reactivation and radiation survival of aggregated vaccinia virus. Calculation of plaque titer based on MR and particle aggregation seen in the electron microscope. *Virology*. 29(3):359-66.
51. Simmons FJ, Xagorarakis I. 2011. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res*. 45(12):3590-8.
52. Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol*. 68(3):1122-31.
53. Sirikanchana K, Shisler JL, Mariñas BJ. 2008. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. *Water Res*. 42(6-7): 1467-74.
54. ter Waarbeek HL, Dukers-Muijers NH, Vennema H, Hoebe CJ. 2010. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J Clin Virol*. 47(3): 268-72.
55. Tree JA, Adams MR, Lees DN. 2003. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl Environ Microbiol*. 69(4): 2038-43.
56. Viau EJ, Goodwin KD, Yamahara KM, Layton BA, Sassoubre LM, Burns SL, Tong HI, Wong SH, Lu Y, Boehm AB. 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams--associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res*. 45(11): 3279-90.
57. Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol*. 6; 46(21): 12069-78.
58. Young DC, Sharp DG. 1979. Partial reactivation of chlorine-treated echovirus. *Appl Environ Microbiol*. 37(4):766-73.

Table 1. Characterization of the water types used in the experiments, measured at room temperature.

Water type	PH	Conductivity (mS)	Turbidity (NTU)	Light absorbance			
				UVB (290-315 nm)	UVA (315-400 nm)	Visible (400-700 nm)	Infrared (700 nm-1 mm)
PBS	7.35	15.29	0.25	-0,0006	-0,0010	0,0029	0,0027
Mineral water	7.57	0.28	0.15	0,0062	0,0044	0,0041	0,0056
Raw sewage	7.64	3.56	142	0,0156	0,0061	0,0031	0,0032
Raw sewage 1:000	7.77	0.28	0.72	0,0132	0,0083	0,0043	0,0041
Sea water	8.8	54.5	3.69	0,0036	0,0024	0,0028	0,0032

Table 2. Total radiation, UVA and UVB fluences received by the samples at each sampling time during the assays.

	Sampling times (hours)	Total radiation (KJ/m ²)	UVA (J/m ²)	UVB (J/m ²)	Mean measured temperature (°C)
7°C	0	0	0	0	7,48
	2	1803	2185	5,35	
	4	3567	4277	11,28	
	8	7059	8623	18,96	
	24	20954	25413	122,91	
20°C	0	0	0	0	20,53
	2	2081	2080	0	
	4	4162	4162	0	
	8	8258	8257	0	
	24	24875	24875	0	
37°C	0	0	0	0	35,61
	2	1686	2246	0	
	4	3246	4492	0	
	8	6742	8985	0	
	24	20377	26957	0	

Figure 1. Effect of temperature on the stability of HAdV in water microcosms, at 7, 20 or 37°C, placed at dark. Data points represent mean values obtained from duplicate experiments.

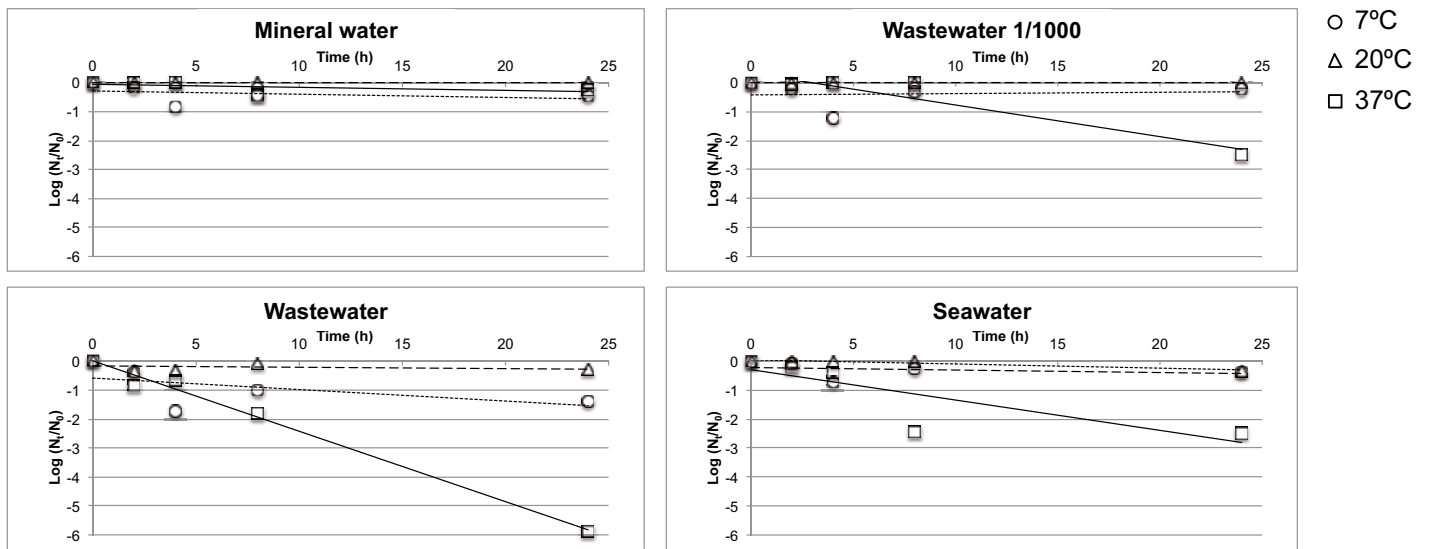


Figure 2. Effect of sunlight on the stability of HAdV on water microcosms exposed to artificial sunlight, at 7°C. Data points represent mean values obtained from duplicate experiments.

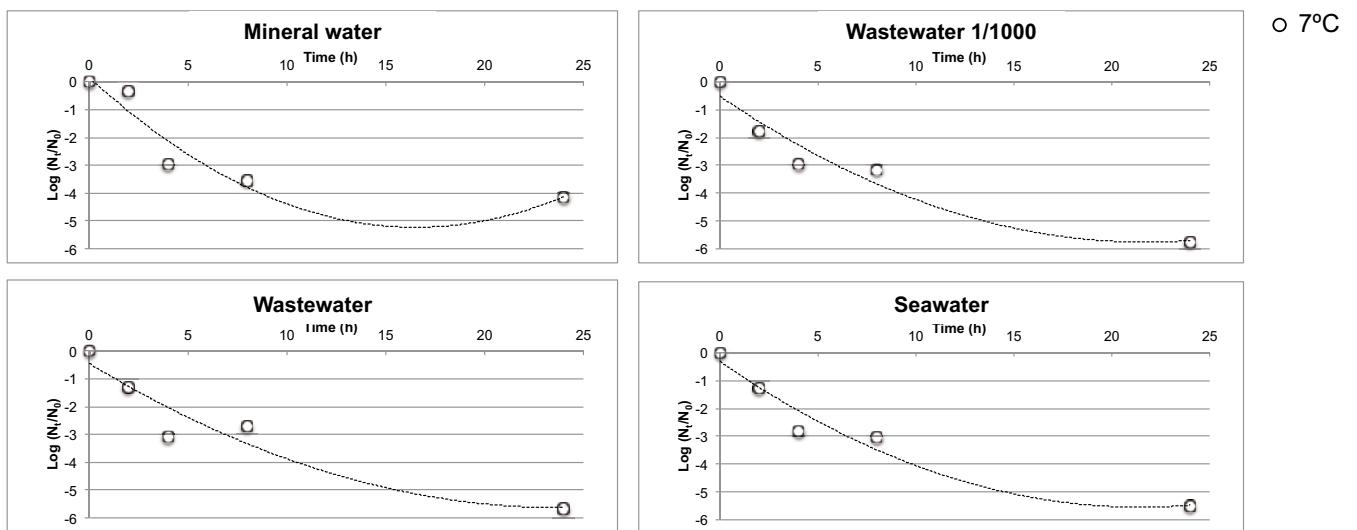


Figure 3. Effect of sunlight and temperature on the stability of HAdV on water microcosms exposed to artificial sunlight, at 20 or 37 °C. Data points represent mean values obtained from duplicate experiments.

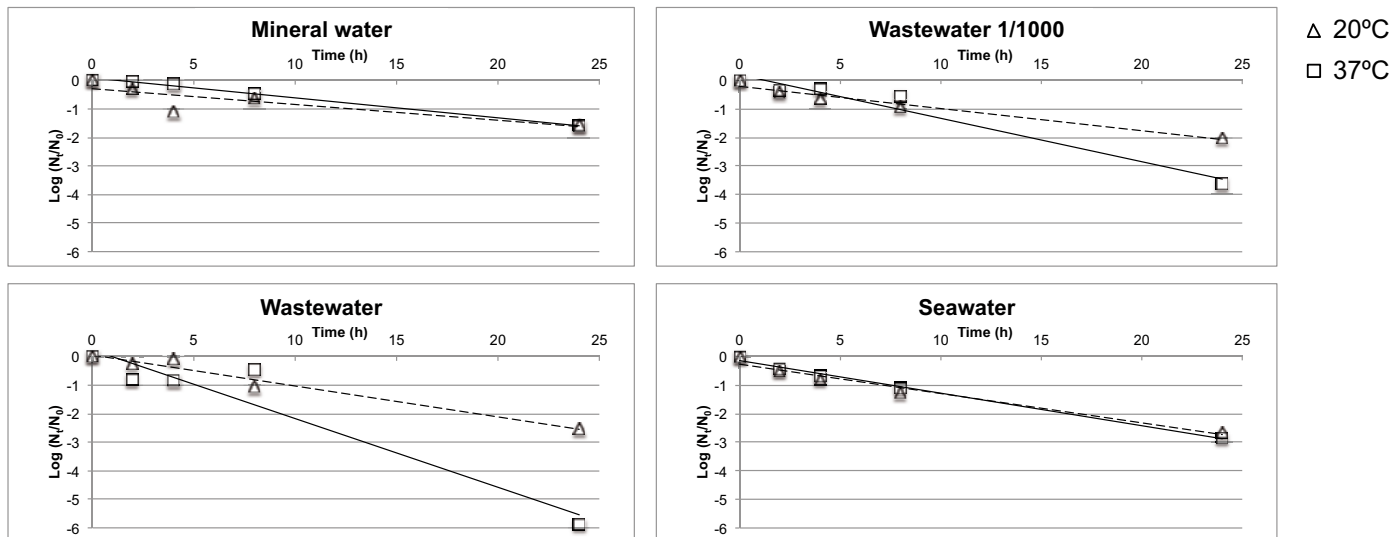


Table 3. Inactivation times (hours) of human adenoviruses at 7°C on water matrices

Experimental condition	Inactivation Times	Water type				
		PBS	Mineral water	Wastewater	Wastewater (1/1000)	Seawater
Light	T_{90}	2,1	1,5	1,0	1,1	1,3
	T_{99}	4,6	2,8	2,4	2,7	3,0
	$T_{99.9}$	7,6	4,4	4,1	4,5	4,8
	$T_{99.99}$	11,7	6,1	5,9	6,5	6,9

AD: absence of decay

Table 4. Inactivation times (hours) of human adenoviruses at 20°C on water matrices

Experimental condition	Inactivation Times	Water type				
		PBS	Mineral water	Wastewater	Wastewater (1/1000)	Seawater
Light	T_{90}	13,8	11,7	8,5	9,5	6,6
	T_{99}	34,2	29,8	17,5	22,8	15,3
	$T_{99.9}$	54,6	47,9	26,4	36,1	24,1
	$T_{99.99}$	75,1	66,0	35,4	49,5	32,8

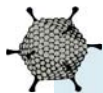
AD: absence of decay

Table 5. Inactivation times (hours) of human adenoviruses at 37°C on water matrices

Experimental condition	Inactivation Times	Water type				
		PBS	Mineral water	Wastewater	Wastewater (1/1000)	Seawater
Light	T_{90}	12,4	11,2	2,8	6,5	5,1
	T_{99}	29,6	24,8	7,2	13,3	13,2
	$T_{99,9}$	46,7	38,5	11,7	20,1	21,3
	$T_{99,99}$	63,9	52,2	16,2	26,9	29,4
Darkness	T_{90}	AD	AD	3,0	10,5	6,6
	T_{99}	AD	AD	7,2	18,2	14,4
	$T_{99,9}$	AD	AD	11,4	25,9	22,3
	$T_{99,99}$	AD	AD	15,6	33,6	30,1

AD: absence of decay

- RESUM ESTUDI 2



“Multicenter collaborative trial evaluation of a method for detection of human adenoviruses in berry fruit”.

D’Agostino M, Cook N, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Martelli F, Banks M, Vasickova P, Kralik P, Pavlik I, Kokkinos P, Vantarakis A, Söderberg K, Maunula L, Verhaelen K, Rutjes S, de Roda Husman AM, Hakze R, Van der Poel W, Kozyra I, Rzeżutka A, Prodanov J, Lazic S, Petrovic T, Carratalà A, Girones R, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D.

Food Analytical methods. 2012; 9: 1-7.

Els productes agrícoles com els fruits rojos i altres vegetals són aliments que recurrentment es troben involucrats en la transmissió de virus entèrics patògens humans i en la aparició de brots. Tanmateix, els criteris de qualitats establerts en seguretat alimentaria s’han basat tradicionalment en l’anàlisi de diversos paràmetres bacterians com *E. coli* i enterococs. Hi ha evidències que suggereixen que l’absència d’aquests indicadors no és representativa de la presència o absència d’altres patògens, com per exemple els virus entèrics o determinats protozoous. És essencial, doncs, desenvolupar i implementar mètodes adients per al control de virus potencialment patògens. En aquest context, durant el transcurs del projecte VITAL “Integrated Monitoring and Control of Foodborne Viruses in European Food Supply Chains”, finançat per la Unió Europea, es va avaluar la robustesa de nous mètodes per ser estandarditzats entre laboratoris, per a la detecció de partícules víriques a partir de diversos tipus d’aliments; fruits rojos, cebes tendres i productes derivats del porc.

En aquest estudi, la robustesa d’un assaig de qPCR per a detectar partícules de HAdV concentrades a partir de mostres de gerds es va avaluar en un assaig col·laboratiu on van participar 11 laboratoris de diferents països d’Europa. Per als assajos, es van contaminar 25 g de gerds artificialment amb suspensions víriques a dues concentracions de HAdV sensiblement diferents; 5×10^2 i 5×10^4 PFU. Addicionalment, els anàlisis també es van realitzar mostres no contaminades.

La repetibilitat de l’assaig va ser del 98,5% i la reproductibilitat del 97,0% amb un valor predictiu positiu del 94,2%, quan es van analitzar les mostres contaminades. Per a l’anàlisi de les mostres no contaminades, es va observar una especificitat del 69,7%, valors de repetibilitat al voltant del 80,0% i dades de reproductibilitat del 61,7%. En aquest cas, el valor predictiu negatiu va ser del 100%.

El mètode de qPCR per a la detecció dels HAdV avaluat en aquest estudi és adient per a quantificar els HAdV estimant el nombre de còpies genòmiques en base a estàndards externs. No obstant, quan els resultats dels laboratoris participants es van expressar en còpies genòmiques detectades per mostra, el nivell de variació interlaboratori era molt elevat.

Els resultats de l'assaig col·laboratiu mostren que el mètode de qPCR utilitzat per a la detecció d'adenovirus humans en fruites del bosc són acceptablement robusts. Les dades demostren també la necessitat de materials de referència per a poder obtenir quantificacions comparables entre laboratoris. El mètode avaluat ha estat posteriorment utilitzat durant el projecte europeu "VITAL" per a la recopilació de dades sobre la presència de la contaminació fecal d'origen humà en diversos punts de control de cadenes de subministrament d'aliments a nivell europeu.

Multicenter Collaborative Trial Evaluation of a Method for Detection of Human Adenoviruses in Berry Fruit

Martin D'Agostino · Nigel Cook · Ilaria Di Bartolo · Franco M. Ruggeri ·
Alessandra Berto · Francesca Martelli · Malcolm Banks · Petra Vasickova ·
Petr Kralik · Ivo Pavlik · Petros Kokkinos · Apostolos Vantarakis · Kirsi Söderberg
Leena Maunula · Katharina Verhaelen · Saskia Rutjes · Ana Maria de Roda Husman ·
Renate Hakze · Wim Van der Poel · Agnieszka Kaupke · Iwona Kozyra ·
Artur Rzeżutka · Jasna Prodanov · Sava Lazic · Tamas Petrovic · Anna Carratala ·
Rosina Gironés · Marta Diez-Valcarce · Marta Hernandez · David Rodriguez-Lazaro

Received: 24 June 2011 / Accepted: 9 August 2011 / Published online: 9 September 2011
© British Crown Copyright as represented by Fera 2011

Abstract The qualitative performance characteristics of a qPCR-based method to detect human adenoviruses in raspberries were determined through a collaborative trial involving 11 European laboratories. The method incorporated a sample process control (murine norovirus) and an internal amplification control. Trial sensitivity or correct identification of 25-g raspberry samples artificially contaminated with between 5×10^2 and 5×10^4 PFU was 98.5%; the accordance and concordance were 97.0%. The positive predictive value was 94.2%. The trial specificity or percentage correct identification of non-artificially contam-

inated samples was 69.7%; the accordance was 80.0% and the concordance was 61.7%. The negative predictive value was 100%. Application of a method for the detection of human adenoviruses in food samples could be useful for routine monitoring for food safety management. It would help to determine if a route of contamination exists from human source to food supply chain which pathogenic viruses such as norovirus and hepatitis A virus could follow.

Keywords Human adenovirus · Multicenter ring trial · Detection

M. D'Agostino (✉) · N. Cook
Food and Environment Research Agency (FERA),
Sand Hutton York, UK
e-mail: martin.dagostino@fera.gsi.gov.uk

I. Di Bartolo · F. M. Ruggeri
Istituto Superiore di Sanita,
Rome, Italy

A. Berto · F. Martelli · M. Banks
Animal Health Veterinary Laboratories Agency,
Weybridge, UK

P. Vasickova · P. Kralik · I. Pavlik
Veterinary Research Institute,
Brno, Czech Republic

P. Kokkinos · A. Vantarakis
University of Patras,
Patras, Greece

K. Söderberg · L. Maunula
University of Helsinki,
Helsinki, Finland

K. Verhaelen · S. Rutjes · A. M. de Roda Husman
National Institute for Public Health and the Environment (RIVM),
Bilthoven, the Netherlands

R. Hakze · W. Van der Poel
Wageningen University Research,
Lelystad, the Netherlands

A. Kaupke · I. Kozyra · A. Rzeżutka
National Veterinary Research Institute,
Pulawy, Poland

J. Prodanov · S. Lazic · T. Petrovic
Scientific Veterinary Institute Novi-Sad,
Novi Sad, Serbia

A. Carratala · R. Gironés
University of Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Diez-Valcarce · M. Hernandez · D. Rodriguez-Lazaro
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL),
Junta de Castilla y León,
Valladolid, Spain

Introduction

There have been numerous outbreaks of disease caused by the consumption of berry fruits contaminated with enteric viral pathogens. The World Health Organisation (FAO/WHO 2008) identified norovirus and hepatitis A virus in fresh produce including berry fruits as a priority virus/commodity combination for which control measures should be considered. In the food industry, the major concepts such as HACCP have been directed at bacterial and fungal pathogens only. Equally as importantly, microbiological monitoring methods are used mainly at the end of the production chain. Also, analysing the impact of virus contamination of food has hitherto been based on gathering epidemiological information, which occurs only in response or as a reaction to disease outbreaks, and a coordinated and validated system or network does not yet exist to routinely and proactively monitor actual food samples. It is essential for thorough food safety management that systems are developed whereby viruses can be monitored at critical points throughout food supply chains.

But performing routine monitoring specifically for norovirus and hepatitis A virus may not actually be worthwhile. These viruses may be present as contaminants only very sporadically, or during outbreaks, and might be seldom detected even when food supply chains are vulnerable to contamination. It would be more effective to monitor for agents that would indicate that a route exists from source to points within the food supply chain which norovirus and hepatitis A viruses could follow to cause contamination. Adenoviruses infect both humans and a wide variety of animal species; they are shed in large numbers in the faeces of infected individuals (Granoff and Webster 1999) and are capable of robust survival (Rzeżutka and Cook 2004). Adenoviruses have been shown to be excreted by the populations of all geographical areas and to be the most abundant viruses detected in urban sewage without significant seasonal variation, and for these reasons have been proposed as indicators of human faecal contamination in water and food (Pina et al. 1998; Formiga-Cruz et al. 2002). Specific detection of adenoviruses from human or animal origin should be a useful tool for tracing the source of faecal viral contamination (Maluquer de Motes et al. 2004). Recent studies on the detection of human adenovirus in wastewater (Bofill-Mas et al. 2006), drinking water treatment plants (Albinana-Gimenez et al. 2009) and in recreational waters in Europe (Wyn-Jones et al. 2011) have shown their wide dissemination and support their applicability as indicators of faecal contamination. The European Framework 7 project “Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VI-TAL)” adopted the use of human adenoviruses as “index viruses” whose presence in a food supply chain such as that

for berry fruits will indicate, not specifically the presence of pathogenic virus types, but that a route of contamination exists from source to monitoring point which pathogenic viruses could follow. The study described here was conducted to test the robustness of a polymerase chain reaction (PCR) (qPCR¹)-based method for detecting human adenoviruses in berry fruits, using raspberries as an example. The method incorporates a sample process control and an internal amplification control to verify its correct operation (D’Agostino et al. 2011).

Materials and Methods

Participating Institutes The Food and Environment Research Agency (FERA), UK led the trial. Eleven laboratories from nine EU member states participated in the trials. They comprised the Veterinary Laboratories Agency (UK), Veterinary Research Institute (Czech Republic), University of Patras (Greece), University of Helsinki (Finland), Istituto Superiore di Sanita (ISS) (Italy), National Institute for Public Health and the Environment (the Netherlands), Wageningen University Research (the Netherlands), National Veterinary Research Institute (Poland), Scientific Veterinary Institute Novi-Sad (Serbia), Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) (Spain) and University of Barcelona (Spain). Each participant was provided with a personalised standard operating procedure (SOP) for performance of this trial.

Viruses Human adenovirus (HAdV) serotype 2, used as the target virus in the trial, was kindly provided by Professor Rosina Girones of the University of Barcelona. It was propagated at ISS for six sequential passages in cultures of A549 cells (European Collection of Cell Culture, UK) and titrated by plaque assay, yielding stock titers of approximately 4×10^7 plaque-forming units (PFU) ml⁻¹. Murine norovirus (MNoV), used as the sample process control (SPCV) in the trial (Diez-Valcarce et al. 2011b), was obtained from Washington University Medical School of St. Louis. It was propagated for six sequential passages in cultures of RAW 267.4 cells (American Type Culture Collection). It was titrated by plaque assays, yielding stock titers of approximately 10^8 PFU ml⁻¹. All virus stock suspensions were prepared by ISS.

Trial Materials Trial materials were prepared at the ISS by FERA staff, who coded each vial and alone knew the identity of the contents. There were nine coded vials, three of which contained $100 \mu\text{l } 1 \times 10^6$ PFU ml⁻¹ HAdV (HIGH) suspension, three containing $100 \mu\text{l } 1 \times 10^4$ PFU ml⁻¹

¹ The term “qPCR” is used for qPCR throughout this article, in accordance with the recommendations of Bustin et al. (2009).

HAdV (LOW) suspension and three containing only cell culture medium (BLANK) were sent to each participant. Each participant was also sent one vial containing $100\ \mu\text{l}$ of 5×10^7 PFU ml^{-1} MNoV (SPCV) suspension.

Preparation of Trial Samples Fresh raspberries were purchased separately by each participant from local sources. Nine 25-g raspberries portions were placed into plastic disposable weighing boats or similar receptacles. Three portions were artificially contaminated with 5×10^4 PFU HAdV by pipetting $5 \times 10\ \mu\text{l}$ of the HIGH suspension onto the surface of the raspberries. Three portions were artificially contaminated with 5×10^2 PFU HAdV by pipetting $5 \times 10\ \mu\text{l}$ of the LOW suspension onto the surface of the raspberries. Three portions were spiked with cell culture medium by pipetting $5 \times 10\ \mu\text{l}$ of the BLANK suspension onto the surface of the raspberries. All samples were left at room temperature for approximately 2 h until the suspending fluid was almost dry, and then processed following the method of Dubois et al. (2002). Immediately prior to commencing the process, all samples were spiked with 1×10^5 PFU murine norovirus by pipetting $10\ \mu\text{l}$ of the SPCV suspension onto the surface of the raspberries.

Extraction of Virus Nucleic Acids from Raspberries The sample was processed using the method of Dubois et al. (2002). Approximately 25 g fruit was placed in a sterile beaker. Forty milliliters of Tris–glycine pH 9.5 buffer containing 1% beef extract and 6,500 U pectinase (e.g. Pectinex™ Ultra SPL solution, Sigma) was added to the sample, which was then agitated at room temperature for 20 min by rocking at 60 rpm. The pH was maintained at 9.0 throughout (if necessary adjusting using 4% w/v sodium hydroxide, extending the period of agitation by 10 min each time an adjustment was made. In strongly coloured berries, a change in colour of the eluate from blue/purple to red was considered indicative of acidification and was used to trigger pH adjustment). The liquid was decanted from the beaker through a strainer (e.g. a tea strainer) into one 50 ml or two smaller centrifuge tubes and centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was decanted into a single clean tube or bottle, and the pH was adjusted to 7.2. Volumes (0.25) of 50% (w/v) polyethylene glycol 8,000/1.5 M NaCl were then added and mixed by shaking for 1 min. The suspension was then incubated with gentle rocking at 4 °C for 60 min before centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet was compacted by centrifugation at $10,000 \times g$ for 5 min at 4 °C before resuspension in 500 μl PBS. The suspension was then transferred to a chloroform-resistant tube, and 500 μl 1:1 chloroform:butanol (v:v) was added and mixed by vortexing. The sample was allowed to stand for 5 min and then centrifuged at $10,000 \times g$ for

15 min at 4 °C. The aqueous phase was transferred to a clean tube and immediately used for nucleic acid extraction or stored at $-20\ ^\circ\text{C}$. Nucleic acids were extracted using a NucliSENS® miniMAG® kit (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions. The final elutions were performed with 100 μl elution buffer, resulting in a 200- μl nucleic acid extract. The nucleic acid extract was assayed immediately or stored at $-70\ ^\circ\text{C}$. The extract was diluted to 10^{-1} in nuclease-free water before assaying.

Adenovirus qPCR This assay was a duplex qPCR using the primers and conditions described by Hernroth et al. (2002), with the inclusion of an internal amplification control (IAC) (Diez-Valcarce et al. 2011a) and a carryover contamination prevention system utilising uracil N-glycosylase. The reaction contained 1 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.9 μM each primer, 0.225 μM adenovirus TaqMan probe (labelled with FAM), 50 nM IAC probe (labelled with VIC) and 100 copies of adenovirus IAC (Yorkshire Bioscience Ltd., UK). Ten microliters of the diluted nucleic acid extract was added to make a final reaction volume of 25 μl . The thermocycling conditions were 2 min at 50 °C then 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Two PCR replicates were performed for each sample. In each PCR run, positive and negative amplification controls were included.

Murine Norovirus Reverse Transcription qPCR (RTqPCR) This assay was a one-step duplex reverse transcription qPCR using the primers and conditions described by Baert et al. (2008), with the inclusion of an IAC (Diez-Valcarce et al. 2011a, b). The reaction contained 1 \times RNA Ultrasense reaction mix (Invitrogen), 0.2 μM each primer, 0.2 μM probe MGB-ORF1/ORF2 (labelled with FAM), 50 nM IAC probe (labelled with VIC), 1 \times ROX reference dye (Invitrogen), 1 μl RNA Ultrasense enzyme mix (Invitrogen) and 600 copies of murine norovirus IAC (Yorkshire Bioscience Ltd., UK). Ten-microliter sample of the diluted nucleic acid extract was added to make a final reaction volume of 20 μl . The thermocycling conditions were 15 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Two RTqPCR replicates were performed for each sample. In each run, positive and negative amplification controls were included.

Definition of Analytical Method In the frame of this collaborative trial, the analytical method is defined as the sample treatment (which includes virus extraction and concentration, and nucleic acid purification) coupled to the nucleic acid amplification assays for the target and the sample process control virus. Equally, a nucleic acid amplification assay is defined as a nucleic acid amplification reaction which contains an IAC.

Reporting and Interpretation of Data Raw data were reported by each participant to the trial leader, who translated the codes and analysed the data in collaboration with ITACyL. When an assay showed a quantification cycle (Cq, previously known as the threshold cycle) value ≤ 40 or 45 for murine norovirus or adenovirus respectively independently of the corresponding IAC Cq value, the result was interpreted as positive. When an assay showed a Cq value ≥ 40 or 45 for murine norovirus or adenovirus respectively with the corresponding IAC Cq value ≤ 40 or 45 for murine norovirus or adenovirus respectively, the result was interpreted as negative. When an assay showed both the target and its corresponding IAC Cq values ≥ 40 or 45, the reaction was considered to have failed. When a participant reported that at least one of the replicate HAdV assays was positive, they were considered to have identified the sample as being adenovirus contaminated. When a participant reported that both replicate HAdV assays were negative, but at least one replicate MNoV assay was positive, they were considered to have identified the sample as being adenovirus uncontaminated. When a participant reported that both replicate HAdV assays had failed, independently of the results of the MNoV assays, they were considered to have reported that the analysis of that sample had failed. When a participant reported that both replicate HAdV assays were negative and both replicate MNoV assays were negative, they were considered to have reported that the analysis of that sample had failed. Interpretation of the results followed the principles outlined by D'Agostino et al. (2011).

Criteria for Inclusion of Results in the Statistical Analysis The results from each participating laboratory were included unless they fell into one of the following two categories: (1) obvious performance deviation from the SOP and (2) presence of target amplicons in the negative amplification controls, indicating contamination of the reaction.

Qualitative Statistical Analysis The raw data sent by each laboratory were statistically analysed according to the recommendations of Scotter et al. (2001) and by the methods of Langton et al. (2002). The *diagnostic sensitivity* of the analytical method was defined as the percentage of positive samples giving a correct positive signal, i.e. using only the results of the analysis of the artificially contaminated samples. The *diagnostic specificity* of the analytical method was defined as the percentage of negative samples giving a correct negative signal, i.e. using only the results of the analysis of the non-artificially contaminated samples. *Accordance* (repeatability of qualitative data) was defined as the percentage chance of finding the same result, positive or negative, from two identical samples analysed in the

same laboratory under predefined repeatability conditions, and *concordance* (reproducibility of qualitative data) was defined as the percentage chance of finding the same result, positive or negative, from two identical samples analysed in different laboratories under predefined repeatability conditions. These calculations take into account different replication in different laboratories by weighting results appropriately. The *concordance odds ratio* (COR) was the degree of inter-laboratory variation in the results and expressed as the ratio between accordance and concordance percentages (Langton et al. 2002). The COR value may be interpreted as the likelihood of getting the same result from two identical samples, whether they are sent to the same laboratory or to two different laboratories. The closer the value is to 1.0, the higher the likelihood is of getting the same result. Confidence intervals for accordance, concordance and COR were calculated by the method of Davison and Hinckley (1997); each laboratory was considered representative of all laboratories in the "population" of laboratories, not just those participating in this analysis.

The positive predictive value of the analytical method is the proportion of the correctly identified contaminated samples. The negative predictive value of the analytical method is the proportion of the correctly identified uncontaminated samples, from all the samples reported as adenovirus uncontaminated. These values were calculated by the ISO 16140 method (Anonymous 2003).

Results

Participants' Results in the Collaborative Trial Table 1 shows the participants' results from the analysis of raspberry samples artificially contaminated with 5×10^4 PFU. All samples were correctly reported as contaminated, except in one case where the analysis of a sample had failed. Table 2 shows the participants' results from the analysis of raspberry samples artificially contaminated with 5×10^2 PFU human adenovirus. Laboratory "4" did not perform analysis of the LOW artificially contaminated test samples. All samples were correctly reported as contaminated. Table 3 shows the participants' results from the analysis of the non-artificially contaminated raspberry samples. Here, four samples were reported as contaminated. Six sample analyses had failed.

Qualitative Statistical Analysis Table 4 gives the diagnostic specificity, diagnostic sensitivity, positive and negative predictive values, accordance and concordance values and the concordance odds ratio for the collaborative trial of the analytical method for the detection of human adenovirus on raspberries. The results of the analysis of the uncontami-

Table 1 Participants' results from the analysis of raspberry samples artificially contaminated with 5×10^4 PFU human adenovirus (HIGH)

Laboratory	Sample A					Sample B					Sample C				
	HAdV		MNoV			HAdV		MNoV			HAdV		MNoV		
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.
1	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
2	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
3	+	+	+	+	C	F	+	–	+	C	F	F	–	–	AF
4	+	+	–	–	C	+	+	–	+	C	+	+	–	+	C
5	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
6	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
7	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
8	+	+	–	–	C	+	+	–	–	C	+	+	–	–	C
9	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
10	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
11	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C

HAdV human adenovirus, *MNoV* murine norovirus, *Rep.* replicate qPCR, *Int* interpretation, + target signal present, IAC signal present or absent, – target signal absent, IAC signal present, *F* target signal absent, IAC signal absent, *C* sample contaminated, *AF* analysis failed

nated samples by laboratory “8” were excluded because all their analyses failed.

Discussion

The method under trial proved capable of detecting adenoviruses in berry fruit at a level of at least 10^2 PFU per 25 g in artificially contaminated samples. Out of 66 samples analysed, only 1 had failed. This was due to the failure of the sample process as judged by the absence of a

signal from the SPCV in conjunction with the failure of the HAdV qPCR in both replicates. The statistical procedure used to analyse the trial results does not discriminate between negative results and failed analyses; it has been used several times to analyse the results of collaborative trials of PCR-based methods (Abdulmawjood et al. 2004; D'Agostino et al. 2004; Josefsen et al. 2004; Malorny et al. 2004; Wyn-Jones et al. 2011), but it would be advantageous to modify it for future similar studies. In some samples, other controls had failed, but overall, the samples could be legitimately reported as positive for HAdV. And the trial sensitivity was still very high, at 98.5%, which indicates

Table 2 Participants' results from the analysis of raspberry samples artificially contaminated with 5×10^2 PFU human adenovirus (LOW)

Laboratory	Sample A					Sample B					Sample C				
	HAdV		MNoV			HAdV		MNoV			HAdV		MNoV		
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.
1	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	–	C
2	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	–	+	+	C
3	+	+	–	–	C	+	+	–	–	C	+	+	F	–	C
5	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
6	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	F	+	C
7	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
8	+	+	–	–	C	+	+	–	–	C	+	+	–	–	C
9	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
10	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C
11	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C	+	+	+	+	C

HAdV human adenovirus, *MNoV* murine norovirus, *Rep.* replicate qPCR, *Int* interpretation, + target signal present, IAC signal present or absent, – target signal absent, IAC signal present, *F* target signal absent, IAC signal absent, *C* sample contaminated, *AF* analysis failed

Table 3 Participants' results of the analysis of the non-artificially contaminated raspberry samples

Laboratory	Sample A					Sample B					Sample C				
	HAdV		MNoV			HAdV		MNoV			HAdV		MNoV		
	Rep.1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Int.
1	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC
2	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC
3	+	+	+	+	C	–	–	+	+	UC	F	F	–	–	AF
4	+	–	F	–	C	–	–	–	–	AF	–	–	–	–	AF
5	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	+	+	+	C
6	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC
7	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC
8	F	F	–	–	AF	F	F	–	–	AF	F	F	–	–	AF
9	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	+	+	+	+	C
10	–	F	+	+	UC	–	F	+	+	UC	F	–	+	+	UC
11	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC	–	–	+	+	UC

HAdV human adenovirus, *MNoV* murine norovirus, *Rep.* replicate qPCR, *Int* interpretation, + target signal present, IAC signal present or absent, – target signal absent, IAC signal present, *F* target signal absent, IAC signal absent, *C* sample contaminated, *AF* analysis failed, *UC* uncontaminated

that the method can be used confidently to detect the presence of human adenovirus in berry fruits.

With the non-artificially contaminated samples, six analyses were reported to have failed. This highlights the value of an interlocking suite of controls when performing routine nucleic acid-based analysis for detection of viruses in foods, as they allow appropriate actions to be identified which should result in accurate reanalysis of failed tests (Bosch et al. 2011; D'Agostino et al. 2011; Rodríguez-Lázaro et al. 2007). It is unclear why the failed tests occurred in the trial, but they left 23 out of 33 samples being reported as uncontaminated, and this skewed the trial specificity to a lower value than that which has been observed in other trials (Abdulmawjood et al. 2004; D'Agostino et al. 2004; Josefsen et al. 2004; Malorny et al. 2004; Wyn-Jones et al. 2011). This proportion may not accurately reflect the actual number of false positives which might be expected in routine application of the current method, where analyses should not be expected to fail so often. The variability of results between laboratories here also affected the accordance and

concordance and the concordance odds ratios; however, the confidence intervals of each indicate that if the method was adopted by a wider selection of laboratories there would be a possibility of more uniform results. The negative predictive value of the method is excellent, as none of the artificially contaminated samples were reported as uncontaminated.

Four of the non-artificially contaminated samples were reported as contaminated with adenovirus. As a result, the trial specificity and the positive predictive value indicate that a proportion of false-positive results can be expected when using this method. However, a possible explanation is that the fruit used for these samples had in fact been contaminated with human adenovirus prior to purchase, and the positive results were not actually false. The method described in this study has been subsequently used to analyse berry fruit at point-of-sale in several European countries, and some of these samples have been positive for human adenovirus. It is recommended that any positive target amplicons are sequenced to confirm target identity when performing actual analysis of produce.

Table 4 Statistical evaluation of the data obtained from the collaborative trial

Contamination level	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value	Negative predictive value	Accordance (%)	Concordance (%)	Concordance odds ratio (COR)
LOW + HIGH	98.5 (91.9, 99.7)	–	94.2 (86.0, 97.7)	–	97.0 (90.9, 100)	97.0 (91.2, 100)	1.0 (0.96, 1.0)
None	–	69.7 (52.7, 82.6)	–	100 (100, 100)	80.0 (60, 100)	61.7 (46.9, 93.3)	2.48 (0.85, 16.48)

Values in parentheses are the lower and upper 95% confidence intervals

The qPCR HAdV assay used in this study could be applied for quantitation of the target virus by estimating the number of HAdV genome copies based on an external standard. However, when the partners' results were converted into genome copies detected per sample (not shown), the level of between-laboratory variation was too great to be able to describe the performance characteristics of the method in quantitative terms. This is despite the fact that nucleic acid standard solutions were supplied along with the trial materials. The high between-laboratory variation may be caused by several factors, such as the condition in which the standard solutions have reached the partner institutes or operational differences between thermocyclers used in the various laboratories. These possibilities highlight a requirement for reliable reference materials and external quality control systems to be available, if routine monitoring of food supply chains for viruses is to be adopted efficiently.

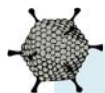
Notwithstanding the above issues, the overall results of the collaborative trial were considered to show that the qPCR-based method for the detection of human adenoviruses in soft fruits was acceptably robust. The method was then employed within the VITAL project on gathering data on virus presence in various food supply chains. Forthcoming results (manuscripts in preparation) of this data gathering will reveal the usefulness of the index virus approach, and the information gained should assist consideration of measures which can be applied to block routes of virus contamination. The method described and tested in this study is a building block in the foundation of future systems for integrated monitoring and control of viruses in food supply chains.

Acknowledgements This work was supported by the EU VITAL project Contract No. 213178. M.D.-V. received a Ph.D. studentship from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). M.D. and N.C. acknowledge the support of the United Kingdom Food Standards Agency.

References

- Abdulmajood A, Bülte M, Roth S, Schönenbrücher H, Cook N, D'Agostino M, Malorny B, Jordan K, Pelkonen S, Hoorfar J (2004) *J AOAC Int* 87:856
- Albiñana-Gimenez N, Miagostovich M, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R (2009) *Water Res* 43:2011–2019
- Anonymous (2003) ISO 16140:2003. International Standards Organisation, Geneva
- Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M (2008) *Appl Environ Microbiol* 74:543
- Bofill-Mas S, Albiñana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodríguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R (2006) *Appl Environ Microbiol* 72:7894–7896
- Bosch A, Sanchez G, Abbaszadegan M, Carducci A, Guix S, Le Guyader FS, Netshikweta R, Pintó RM, van der Poel W, Rutjes S, Sano D, Rodríguez-Lázaro D, Kovac K, Taylor MB, van Zyl W, Sellwood J (2011) *Food Anal Methods* 4:4
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) *Clin Chem* 55:611–622
- D'Agostino M, Cook N, Rodríguez-Lázaro D, Rutjes S (2011) *Food Environ Virol* 3:55
- D'Agostino M, Wagner M, Vazquez-Boland JA, Kuchta T, Karpiskova R, Hoorfar J, Novella S, Scotti M, Ellison J, Murray A, Heuvelink A, Kuhn M, Pazlarova J, Fernandez I, Cook N (2004) *J Food Protect* 67:1646
- Davison AC, Hinckley DV (1997) Bootstrap methods and their application. Cambridge University Press, Cambridge
- Diez-Valcarce M, Kovac K, Cook N, Rodríguez-Lázaro D, Hernández M (2011a) *Food Anal Methods* 4:437–445
- Diez-Valcarce M, Cook N, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D (2011b) *Food Anal Methods*. doi:10.1007/s12161-011-9262-9
- Dubois E, Agier C, Traore O, Hennechart C, Merle G, Cruciere C, Laveran H (2002) *J Food Protect* 65:1962
- FAO/WHO (2008) Viruses in food: scientific advice to support risk management activities. Microbiological risk assessment series. WHO, Geneva
- Formiga-Cruz M, Tofiño-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Condin-Hansson A-C, Hemroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones D, Girones R (2002) *Appl Environ Microbiol* 68:5990–5998
- Granoff A, Webster RG (1999) Encyclopedia of virology, vol. 1, 2nd edn. Academic, London
- Hemroth BE, Condin-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK (2002) *Appl Environ Microbiol* 68:4523
- Josefsen MH, Cook N, D'Agostino M, Hansen F, Wagner M, Demnerova K, Heuvelink AE, Tassios PT, Lindmark H, Kmet V, Barbanera M, Fach P, Loncarevic S, Hoorfar J (2004) *Appl Environ Microbiol* 70:4379
- Langton SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard B (2002) *Int J Food Microbiol* 79:175
- Malorny B, Cook N, D'Agostino M, De Medici D, Croci L, Abdulmajood A, Fach P, Karpiskova R, Aymerich T, Kwaitek K, Kuchta T, Hoorfar J (2004) *J AOAC Int* 87:86
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R (2004) *Appl Environ Microbiol* 70:1448–1454
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R (1998) *Appl Environ Microbiol* 64:3376–3382
- Rodríguez-Lázaro D, Lombard B, Smith H, Rzezutka A, D'Agostino M, Helmuth R, Schroeter A, Malorny B, Miko A, Guerra B, Davison J, Kobilinsky A, Hernández M, Bertheau Y, Cook N (2007) *Trends Food Sci Technol* 18:306
- Rzezutka A, Cook N (2004) *FEMS Microbiol Revs* 28:441
- Scotter SL, Langton S, Lombard B, Schulten N, Nagelkerke N, In't Veld PH, Rollier P, Lahellec C (2001) *Int J Food Microbiol* 64:295
- Wyn-Jones A, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Höller C, de Roda Husman AM, Kay D, Kozyra I, López-Pila J, Muscillo M, São José Nascimento M, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M (2011) *Water Res* 45:1025

- RESUM ESTUDI 3



“Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces”.

Carratalà A, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Rusiñol M, Fresno S, Cook N, Girones R.

Manuscrit acceptat a *International Journal of Food Microbiology*, Gener del 2013.

Durant el cultiu i la distribució de fruits i altres vegetals, els virus contaminants es troben exposats a condicions de temperatura, radiació solar, humitat i dessecació que poden afectar la seva estabilitat. Per tot això, caracteritzar el paper dels factors que influencien l'estabilitat d'aquests patògens als aliments vegetals té molta importància en l'avaluació dels riscos per a millorar la seguretat alimentària.

En aquest estudi, s'ha avaluat l'efecte de la temperatura i la radiació solar en la inactivació dels HAdV i dels bacteriòfags MS2 presents en la superfície de vegetals i fruits. Els experiments es van desenvolupar durant 24 hores en mostres d'enciam i maduixes contaminades artificialment, en condicions de foscor o bé sota la radiació d'un focus amb un espectre de radiació similar a la llum del sol natural. Totes les condicions experimentals es van realitzar per duplicat a dues temperatures diferents (4 i 30°C), rellevants en la cadena de producció de fruites i verdures. La inactivació dels HAdV i dels MS2 es va analitzar mitjançant tècniques d'infectivitat i tècniques moleculars (qPCR).

En les condicions analitzades, la temperatura és el factor principal que afecta l'estabilitat dels adenovirus humans contaminants en enciams i maduixes. A 30°C, es va observar una inactivació en la concentració dels HAdV infecciosos d'entre 3 i 4 logaritmes després de 24 hores d'assaig. Pel contrari, a 4°C no es va identificar una reducció significativa en la infectivitat d'aquests virus en cap de les matrius estudiades, tant a la foscor com sota la simulació de llum solar. Tampoc es va observar una disminució en els valors de còpies genòmiques detectades mitjançant tècniques moleculars. Pel que fa als MS2, es va observar una inactivació menor que l'observada en el cas dels HAdV. Concretament, només es va identificar una reducció de 2 logaritmes a 30°C en mostres d'enciam. Els temps necessaris per assolir una reducció del 99.99% de la càrrega viral es van calcular per a cada condició experimental.

Els resultats d'estudi representen informació útil per a identificar els escenaris crítics que ocorren en les cadenes de producció d'aliments en relació amb la transmissió de patògens vírics.

Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces

Anna Carratalà^a, Jesus Rodriguez-Manzano^a, Ayalkibet Hundesa^a, Marta Rusiñol^a, Sandra Fresno^a, Nigel Cook^b, Rosina Girones^{a*}.

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

^b The Food and Environmental Research Agency (FERA), York, United Kingdom.

Keywords: human adenoviruses, MS2, stability, temperature, sunlight, vegetables, fruits, surfaces, infectivity.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1483; fax: +34 93 403 9047.

E-mail address: rgirones@ub.edu

Abstract

Determining the stability or survival in an infectious state, of foodborne viral pathogens attached to soft fruits and salad vegetables surfaces is essential to underpin risk assessment studies in food safety. Here, we evaluate the effect of temperature and sunlight on the stability of infectious human adenoviruses type 2 and MS2 bacteriophages on lettuce and strawberry surfaces as representative fresh products. Human adenoviruses have been selected because of their double role as viral pathogens and viral indicators of human fecal contamination. Stability assays were performed with artificially contaminated fresh samples kept in the dark or under sunlight exposure at 4 and 30°C over 24 hours. The results indicate that temperature is the major factor affecting HAdV stability in fresh produce surfaces, effecting decay between 3-4 log after 24 hours at 30°C. The inactivation times to achieve a reduction of 90, 99, 99.9 and 99.99% are calculated for each experimental condition. This work provides useful information to be considered for identification of critical control points and for improving food safety regarding the transmission of foodborne viruses through supply chains.

1. Introduction

Symptomatic and asymptomatic individuals excrete a wide diversity of viruses in urine or feces that are collected in urban wastewater (Cantalupo et al., 2011). Even in areas with implemented sanitation programs, improperly treated wastewater is the main vehicle for the dissemination of viral pathogens through the environment. In particular, the presence of viral pathogenic viruses such as Norovirus (NoV), hepatitis A virus (HAV), hepatitis E virus (HEV) and adenoviruses, has been previously observed in urban sewage and in fecally contaminated water (Laverick et al., 2004, Rodriguez-Manzano et al., 2010, Albinana-Gimenez et al., 2009). The resulting viral contamination of rivers and other surface waters, groundwater and fresh produce is associated with the subsequent risk of reintroduction of the viral pathogens into human populations (Koopmans and Duizer, 2004). Despite regulations intended to assure food safety, many viral foodborne and waterborne outbreaks occur each year in developed countries. Recent foodborne outbreaks in Europe have been caused by noroviruses in lettuce (Ethelberg et al., 2010) or HAV in semidried tomatoes (Gallot et al., 2011).

Pre-harvest contamination of produce by foodborne viruses can occur through a variety of agents including irrigation water (Cheong et al., 2009) and natural fertilizers. In addition, a further route for viral transmission to food products occurs during harvest or processing by infected food handlers or by using polluted water and utensils at some point of the food production chain (Carter, 2005). The pathogens associated with environmental transmission routes, including water and food, encompass a wide diversity of bacteria, protozoa and viruses. Thus, the use of surrogates is essential for investigating water quality, food safety and industrial microbiology. Some concerns have been stated regarding current regulations, mainly based on bacteriologic parameters. Fecal-derived coliforms, thermo-tolerant coliforms, *E. coli* and enterococci, have several drawbacks and limitations in their role as indicators of fecal pollution. Various authors have concluded that these indicators could fail to predict the risk for water and food-borne pathogens including viruses (Gerba et al., 1979; Lipp et al., 2001). Moreover, the levels of bacterial indicators do not always correlate with the concentrations of viruses, especially when these indicators are present at low concentrations (Pina et al., 1998).

Several studies have focused on describing viruses that may be used as indicators of fecal contamination in the environment and food. Human adenoviruses have been proposed as an alternative indicator and as a viral index to improve the control of the microbiological quality of water and food and to reduce the microbiological risk associated with medium and low levels of fecal contamination in water (Puig et al., 1994; Pina et al., 1998, Formiga-Cruz et al., 2003; Rodriguez-Lázaro et al., 2012). Data showing high year-round prevalence in urban sewage and contaminated river water of diverse geographical areas has been accumulating (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al.,

2006; Fong et al., 2010; Kokkinos et al., 2011; Rigotto et al., 2010; Simmons et al., 2011). HAdV have also been detected as the most common viral pathogen in shellfish, which become contaminated by their filtration of fecally polluted seawater (Formiga-Cruz et al., 2002).

In the environment, the stability of foodborne viral pathogens attached to soft fruits and salad vegetable surfaces is an important factor for their potential transmission. Peeling the surfaces from fruits and vegetables can lead to a reduction of the fecal contamination, but very often they are eaten without peeling. During pre-harvest, viruses are exposed to diverse environmental abiotic conditions such as temperature, sunlight, humidity and desiccation. Some efforts have focused on evaluating the stability of different enteric viruses exposed to different temperatures (Kurdziel et al., 2001, Croci et al., 2002) but little work has been addressed to compare the relative contribution of temperature and solar irradiation when combined in experimental assays. In our opinion, this information is useful to improve food safety regarding the transmission of viral pathogens through the different stages in food production chains.

The main objective of this study was to evaluate the effect of temperature and sunlight as major threats to viral stability during pre-harvest and post-harvest stages. In our experiments, we studied HAdV for their double role as a pathogen/indicator DNA viruses (Pina et al., 1998; Formiga-Cruz et al., 2002; Rodriguez-Lazaro et al., 2012) and MS2 bacteriophage as an RNA virus, which has been previously used as a surrogate of Noroviruses in other inactivation studies (Dawson et al., 2005). The outcomes of these experiments may provide valuable information that might be considered to improve food safety regarding foodborne viral pathogens.

2. Materials and methods

2.1 Cell lines and viral stocks

Human adenovirus type 2 stocks were produced infecting A549 cells. A549 were cultured in Earl's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 1% glutamine, 50 µg of gentamycin per mL and 10% (growth medium) or 2% (maintenance medium) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Viruses were released from cells by freezing and thawing the culturing flasks for 3 times. A centrifugation step at 3000 x *g* for 20 minutes was applied to eliminate cell debris. The obtained supernatant was ultracentrifuged for 1h at 34500 x *g* and finally resuspended in PBS, quantified and stored in 10 mL aliquots at -20°C until used. MS2 phage stocks were produced and titered in *Salmonella* WG49 (both kindly donated by Maite Muniesa, University of Barcelona) following the ISO 10705-1.

2.2 Sunlight simulation

Light conditions applied in the assays simulated solar radiation through exposure to a 400-W Philips MSR400 HR hydrargyrum medium-arc iodide (HMI) lamp focus (Koninklijke Philips Electronics, Netherlands). As previously described, this lamp has a spectral power distribution that approximates the UVA, UVB and PAR levels of natural sunlight; a continuous spectrum from 250 to 800 nm and a power plateau from 400 to 700 nm (Dick et al., 2010). The total output radiation was controlled during our experiments using a pyranometer (LP Pyra03, Delta Ohm Srl, Italy) and UVA (320 to 400 nm) and UVB radiation (280 to 320 nm) by specific sensors for their wavelengths (LP UVA and UVB, Delta Ohm Srl, Italy). At 4 °C, the mean values of total, UVA and UVB radiations applied after 24 h in the experiments are 20.812 KJ/m², 18.557 J/m² and 51,67 J/m² respectively. At 30°C, the mean values were 20.377 KJ/m² of total radiation and 26.867 J/m² of UVA. No emission in the wavelength of UVB at this temperature was registered. As a reference measure, intensities of total radiation, UVA and UVB were measured outdoors on a spring sunny day at 23 °C: they were 9.70 KW/m² (total radiation), 506 µW/cm² (UVA) and 40 µW/cm² (UVB).

2.3 Recovery of viruses from fresh produce surfaces and experimental design

Stability assays were performed in iceberg lettuce and strawberry samples because they have been previously related to foodborne viral gastroenteritis outbreaks and their surfaces present different properties. Both iceberg lettuce and fresh strawberries were acquired in a local retailer and kept at 4°C until used.

The recovery of human adenoviruses and MS2 from lettuce and strawberry was evaluated in triplicate preliminary independent assays. Surface pieces weighing 0.5 g of lettuce and 1 g of strawberry for each experimental condition were cut and placed on Petri plates. HAdV was inoculated in ten spots on surface samples at a concentration of 3x10¹⁰ GC/ml, and the inocula were dried for one hour at ambient temperature in a biosecurity cabinet.

Food samples were washed with 7 ml of glycine buffer (0.25 N at pH 9.5). After washing, samples were briefly vortexed and stirred for 30 min at 4°C. Finally, samples were ultracentrifuged at 34500 x g for 1 h and pellets were suspended in 200 µl of PBS. After evaluating our recovery of HAdV, triplicate experiments were also performed to test MS2 recovery from strawberry surfaces, the food product with lower HAdV recoveries. The recovery values for HAdV and MS2 under each condition are presented in Table 1.

We observed that recovery efficiency increased by addition of a homogenization step with MP FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals LLC.) at 4 m/s for 20 s after washing the sample with 7 ml of glycine buffer (0.25 N at pH 9.5). However, for the quantification of viruses in the spiked samples used in this study, this step was not included in the protocol.

The stability experiments were performed also on surface pieces weighting 0.5g of lettuce and 1 g of strawberry. Samples were cut and placed on Petri plates and 20 µl of HAdV and MS2 were pipetted onto ten different spots on the selected samples surfaces at a concentration of 10^6 infectious units/ ml. After spiking, the inocula were dried for one hour at ambient temperature in a biosecurity cabinet.

The temperature of the experiments was kept stable by performing the assays in thermostatic chambers. The selected temperatures were 4 and 30 °C. Dark conditions were achieved by covering the Petri plates with an opaque box. All Petri plates were kept open during the assay to avoid any interference between the plastic cover and the applied radiation.

Each experiment was performed in duplicate over 24 hours with samples taken at 0, 2, 4, 8 and 24 hours. At every sampling time, a Petri plate containing a piece of lettuce and strawberry surface was collected from dark and light conditions. Viruses were eluted by the selected protocol and viral concentrates were kept at 4 °C until infectivity assays were performed (within 24 hours). Frozen viral concentrates were kept at -80 °C until qPCR analysis.

2.4 Evaluation of HAdV and MS2 infectivity

Immunofluorescence assays (IFA) for the quantification of infectious HAdV2 were performed as previously described (Calgua et al., 2011). Briefly, A549 monolayers were incubated overnight in 8-well Lab-Tek II chamber slides (Nagle Nunc International, Naperville, IL) at 37 °C in 5% of CO₂ until they reached 90-100% of confluence. One hundred microliters of direct or diluted sample were inoculated into each well and incubated for 90 minutes at 37 °C in 5% CO₂. After that, 2% FBS-supplemented EMEM was added and incubated for 3 days at 37 °C in 5% CO₂. After 3 days incubation, the monolayers were fixed with chilled absolute methanol for 10 minutes and rehydrated by soaking in PBS for 5 minutes. The monolayers were blocked for 1 hour in blocking solution containing PBS with 1% BSA (w/v) and 0.05% Tween (v/v). After removing the blocking solution, the monolayers were incubated for 1h with their first antibody solution. After incubation, the cells were stained for 15 minutes at RT with a 1:100 dilution of goat anti-mouse IgG-FITC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in blocking solution. The IgG antibody was removed and cells were rinsed with PBS for 15 minutes. Finally, chambers were mounted by adding UltraCruz™ mounting medium (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and cells were observed under UV light in an epifluorescence microscope.

In order to quantify infectious MS2, Salmonella WG49 working cultures were inoculated in TYGB and incubated at 36 ± 2 °C while shaking as specified in the ISO 10705-1. The culture absorbance was measured every 30 minutes. When an absorbance corresponding to a cell-density of approximate 10^3 cfp/ml (based on data obtained by calibration of absorbance measurements) was reached, the culture was taken from the incubator and immediately placed in melting ice to avoid

the loss of F-pili by the cells. Semisolid Tryptone-yeast extract-glucose agar (ssTYGA) bottles were prepared in advance and the agar melted before the infectivity evaluation, keeping them in a water bath at 45 ± 1 °C. A solution of calcium-glucose (0.5ml/50ml) was aseptically added. Supplemented ssTYGA 2.5 ml aliquots were dispensed in capped culture tubes placed in a water bath until used. To each tube, 1 ml of the sample and 1 ml of the inoculum culture were added. Finally, tubes were carefully mixed and poured over the surface of TYGA plates, distributed and allowed to solidify. Plates were incubated upside-down at 36 ± 2 °C for 18 ± 2 hours.

2.5 Nucleic acid extraction

An enzymatic digestion treatment was applied in this study to reduce false positive results by detection of free DNA when using qPCR analysis. Each analyzed sample was digested using 100U of Deoxyribonuclease I (DNase I, Molecular Grade, Invitrogen), according to manufactured instructions before the nucleic acid extraction. The use of a Stop Buffer (provided with DNase I) prevented excessive digestion (data not shown). Nucleic acids (NA) from viral concentrates from fresh produce samples were extracted with the QIAmp[®] Viral RNA kit (QIAGEN, Inc.) using the QIAcube automated platform. A negative control was included in all the nucleic acid extraction procedures. Finally, NA eluates were stored at -20 °C until used.

2.6 Quantitative real-time PCR (qPCR and RT-qPCR)

HAdV quantitation was based on the qPCR assays previously described by Hernroth et al., 2002 and modified in Bofill-Mas et al., 2006. Standards for the real-time PCR assays for HAdV2 were produced as described before (Albinana et al., 2009). For the amplification of HAdV genomes, reactions were performed in a 25 µL volume with PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 10 µL of DNA sample or 10 µL of a quantified DNA plasmid, 1× Taq-Man master mix, and the corresponding primers and Taq-Man probes for HAdV. HAdV2 genomes were quantified following the activation of the uracil N-glycosylase contained in the core mix (2 min at 50 °C), the activation of AmpliTaq Gold for 10 min at 95 °C, and 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C).

For the quantification of MS2, qPCR standards were produced by cloning a PCR product targeting the region coding for the maturation protein (accession number NC_001417.2) into pGEM[®]-T Easy (Promega, cat. No. A1360). In order to minimize contamination, NcoI enzyme was used to linearize 10 µg of DNA following supplier instructions. All standard dilutions were then distributed into tubes and stored at -80 °C until use. We targeted a region previously described to achieve higher losses in qPCR signal after UV treatment (Pecson et al., 2009). In the qPCR reactions, we tested 5 µL of the NA extraction and of the 10-fold dilution. Amplifications were performed in 20 µL reaction

mixtures with RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction contained 5 µL of sample or 5 µL of DNA standard, 1× Ultrasense Mix, 1× Ultrasense Enzyme Mix, 1× ROX, plus the corresponding primer set for MS2; pecson-2F (5'-AAGGTGCCTACAAGCGAAGT-3') and pecson-2R (5'-TTCGTTTAGGGCAAGGTAGC-3') at a final concentration of 1 µM each. For this work, a TaqMan probe was designed in our laboratory; PecP-2 (5'-FAM(D-L-Probe)-ATCGTGGGGTCGCCGTACG-BHQ1-3') and used at a final concentration of 0.25 µM. The amplification was performed following retrotranscription (60 min at 50 °C) and activation of the HotStarTaq (5 min at 95 °C), and 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1min at 65 °C). Quantitations were performed with an MX3000P sequence detector system (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

2.7 Calculation of inactivation times T_{90} , T_{99} , $T_{99.9}$ and $T_{99.99}$

Since the inactivation of viruses has been shown to fit of a first-order kinetic, it is generally assumed that the number of viruses remaining in a certain environment after a certain time (t) fits an equation derived from Chick's Law (Chick, 1910). Viral inactivation can be defined by the following equation: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$ where t is the time of contact, N_t is the number of viruses that remain after the time of contact and N_0 is the number of viruses at time zero. The inactivation velocity constant (k, h⁻¹) of each viral group can be expressed as the slope of the line $\log(N_t/N_0)$ vs time t without intercept. From these expressions, T_{90} is defined as the time required for the inactivation of 90% of the initial microorganisms. To increase the confidence of the estimations, another model was computed using a quadratic regression curve. The equation of this second model is $y = y_0 + \alpha t + \beta t^2$ where y_0 is the predicted number of viruses at time 0, and α and β are the linear and quadratic terms of the regression curve respectively. Therefore, the most suitable model for each experimental condition was evaluated. Generation of regression curves and prediction of the time required for 90, 99, 99.9, or 99.99% viral inactivation were accomplished by including data points from all experiments for each virus and food type at different temperature. The predicted (linear line) and observed (individual data points) values were plotted on charts (Microsoft Excel, 2010), representing log inactivation [$\log(N_t/N_0)$] versus time (Figure 1 and 2).

3. Results

3.1 Virus recovery from lettuce and strawberries

Viral recoveries obtained in our tests with lettuce and strawberries are described in Table 1; the mean recovery values for HAdV were 38.8 % and 2.5 % in lettuce and strawberry respectively. The addition of a homogenization step with Fast-prep increased recoveries to 66.44 % for HAdV in lettuce. In strawberry samples, 8.88% recovery of HAdV and 40.67% recovery of MS2 could be

obtained. However, as previously indicated, this step was considered not necessary for the spiked samples used in this work.

3.2 Viral inactivation

The viral inactivation of HAdV and MS2 at different tested conditions exhibited typical first-order inactivation kinetics with a good fit, excepting HAdV in strawberry at 30°C which deviated from first order kinetics with initially fast reduction followed by breakpoint, after which a slower reduction took place. In this case, in order to adjust the estimated inactivation for fast and slow kinetics, a linear-quadratic model was used. All inactivation times showed strong correlation values (R^2) higher than 0.75.

The times requested to achieve a reduction of 90, 99, 99.9 and 99.99% in infectious HAdV2 and MS2 could be calculated in those experiments conducted at 30°C, both at dark and under sunlight simulation. However, in those experiments performed at 4°C, no inactivation of HAdV was observed after 24h. Therefore, the inactivation times could only be calculated for MS2 in the experiments performed under sunlight simulation. The time to inactivate 1-log of MS2 in these conditions was 17.2 hours, to inactivate 2-log 38.6 hours, to inactivate 3-log 59.9 hours, and to achieve an inactivation of 4-log 81.1 hours. The calculated inactivation times for both HAdV and MS2 at 30°C are presented in Table 2.

At 30°C, under sunlight simulation the time of inactivation to achieve a decay of 4-log of infectious HAdV was 24.4 hours in lettuce samples and 4.8 hours in strawberry samples. At dark, the $T_{99.99}$ value increased to 31.7 hours in lettuce samples and 6.3 hours in strawberry samples. Longer inactivation times were calculated for MS2. At 30°C under sunlight simulation 99.99% of infectious MS2 in lettuce are expected to be inactivated after 43.6 hours in lettuce and 220.9 hours in strawberry. At dark, the inactivation times to achieve a decay of 99.99% of the initial load were 266.1 hours in lettuce and 255.7 hours in strawberry samples.

3.3 Effect of temperature and sunlight on viral inactivation in fresh produce

The results obtained in the experiments in fresh produce indicate that temperature plays an important role in the stability of HAdV whereas no effect due to sunlight simulation was shown. In the experimental conditions evaluated, HAdV were particularly stable at 4°C after 24 hours both in lettuce and strawberry pieces placed at dark and under sunlight simulation. On the other hand, at 30°C, infectious HAdV were inactivated both in the dark and under sunlight simulation. The results are presented in Figure 2.

MS2 shows longer persistence compared to HAdV. The results are shown in Figure 3. At 4°C, no MS2 inactivation was observed in lettuce and strawberry samples after 24 h placed at dark.

Exposure to artificial sunlight appears to produce a discrete effect on viral stability: only a decay of less than 2-log of MS2 plaque forming units was detected on irradiated lettuce samples at 30 °C. However, this decay was not observed in strawberry samples suggesting differences in MS2 stability depending on fresh produce surface properties.

No inactivation was detected in the experiments by analyzing HAdV2 and MS2 by qPCR even with addition of the enzymatic pretreatments applied to the samples in order to remove free DNA.

4. Discussion

Foodborne viruses are not considered in current regulations, however contamination by viral pathogens through the production chains has been identified and viruses must be considered when defining critical control points in food safety plans. The scope of this work was to evaluate the effect of temperature and sunlight on HAdV and MS2 inactivation times in order to identify critical scenarios for the potential foodborne transmission of viral pathogens. In this study, changes in HAdV and MS2 numbers were determined by infectivity assays and qPCR.

The results on viral stability at 4 and 30 °C at dark or under sunlight simulation show temperature as the major factor directly affecting human adenovirus stability on lettuce and strawberry surfaces, even when exposed to sunlight simulation. In particular, no HAdV inactivation was observed at 4 °C, at dark or under sunlight, in the tested food matrices. However, at 30 °C our results show significant reductions of HAdV on strawberry and lettuce samples in 24 hours, either at dark or under sunlight radiation. Temperature has been previously described as one of the most significant factors affecting pathogen inactivation (Melnick and Gerba, 1980; Yates et al., 1990; Bertrand et al., 2012). While the exact mechanism behind this inactivation is uncertain, higher temperatures may cause thermal degradation of the viral capsid (Yates et al., 1985). Other studies have also provided evidences that viral infectivity is stable at common low temperatures of storage conditions in food. A minor decay of 1-log in poliovirus infectivity was previously described on lettuce and strawberry samples after 15 days at 7 °C (Kurdziel et al., 2001). Similar results were also shown for HAV on lettuce (Crocì et al., 2002). All these results emphasize the idea that the infectivity of enteric viral pathogens is not challenged by those low temperatures usually maintained in households to avoid bacterial growth.

Little information is available regarding viral stability in fresh produce exposed to sunlight at different temperatures found in crops during the year. From our results, we have not observed a relevant effect of sunlight on the infectivity of HAdV on fresh produce surfaces. Thus, fresh produce with rough surface topographies may play a role protecting viruses from sunlight inactivation.

In another work (Badawy et al., 1990), a comparison between the survival rates of MS2, poliovirus and rotavirus was performed outdoors in winter (4-10°C) and in summer (36-41°C). The

results obtained indicated that 8 to 10 hours would be needed to achieve a 99% reduction ($2 \log_{10}$) during the summer and 16 to 24 hours during the winter. The relative contribution of temperature and sunlight to the viral inactivation was not further analyzed in the study of Badawy et al.,1990.

In the current study, we identified a different UV emission by the lamp depending on the temperature set in the assay. No UV-B emission was registered in the experiments performed at 30 °C while after 24 h at 4 °C, the samples received a mean UV-B irradiation values of 51.67 J/m². Some studies have been performed to characterize the role of UV radiation on the inactivation of viruses on food. After exposure to several doses of UV-C radiation (254 nm), high decay values of hepatitis A virus, Aichi virus and feline calicivirus were described on strawberries and lettuce (Fino and Kniel, 2008). In the same study, inactivation was found to be greatest in lettuce and least on strawberry samples. The authors considered this finding to be likely due to differences in produce surface topography since lettuce has a smoother surface than strawberry. The results with MS2 in the current study would agree with the data presented by Fino and Kniel (2008) and in contrast, longer inactivation times for HAdV were calculated from the experiments conducted on lettuce compared to those calculated for strawberry surfaces at 30 °C under dark and solar simulation irradiation.

From our results, 1-log of MS2 inactivation was observed on lettuce samples at 4 °C after light exposure and more than 2-log when temperature was set to 30°C. Inactivation by high temperatures appears to be more effective for HAdV than for MS2.

Overall, the results obtained in this work emphasize a matter of concern regarding food safety. In the northern hemisphere, crops grown during winter encounter lower temperatures and less sunlight hours. The results described are consistent with other studies indicating that viruses are highly resistant to low temperatures. This suggests that the periods with lower temperatures and less sunlight hours are likely to keep viral contamination of produce infectious. When collected, fresh produce is kept cold in order to avoid bacterial growth. Once again, these are the best conditions to keep viral pathogens infectious through the food supply chain.

In crops grown at higher temperatures, it is likely that the infectivity of contaminating enteric viruses will reduce over time. Particularly, a reduction of 99.9% of HAdV is expected after 18 hours on lettuce under solar radiation and 23.5 hours in the dark. On strawberry surfaces, a reduction of 99.9% of HAdV is expected after 3.3 hours under solar radiation and 4.4 hours in the dark. These data indicate that the hours prior to the harvesting of fresh produce are highly important with regard to contaminating infectious enteric viral load on produce surfaces. Nevertheless, diverse susceptibility to inactivation between different viruses has to be considered. The results provided in the present work provide useful information to assist the identification of some critical scenarios occurring in food production chains in relation to the transmission of viral pathogens.

5. Acknowledgments

This work was supported in part by the European Commission Framework Program 7 project “Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VITAL)” (Grant No. KBBE 213178) led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, UK), Martin D’Agostino (FERA, UK) and Franco M Ruggeri (ISS, Italy), and in part by project AGL2008-05275-C03- 01/ALI “Integrated risk analysis related to the consumption of pathogenic viruses present in water and food” funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation. During the development Anna Carratalà was a fellowship of the Spanish Ministry of Science and Innovation. We thank the Serveis Científico-Tècnics and the Camps Experimentals of the University of Barcelona for their kind services during these experiments.

6. References

1. Albinana-Gimenez N, Miagostovich M, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water-treatment plants. *Water Research*. 43:2011-2019.
2. Badawy AS, Rose JB, Gerba CP. 1990. Comparative survival of enteric viruses and coliphage on sewage irrigated grass. *J Environ Sci Health*. 8, 932-952.
3. Barrabeig I, Rovira A, Buesa J, Bartolomé R, Pintó R, Prellezo H, Domínguez A. 2010. Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infect Dis*. 15; 10:269.
4. Bertrand, I., Schijven, J., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A. M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N. and Gantzer, C. 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 112 1059-1074.
5. Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *App Environ Microbiol*, 72(12): 7894-7896.
6. Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM. 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio*. 4;2(5).
7. Carter, MJ. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiology* 98, 1354-1380.
8. Cheong S, Lee C, Song SW, Choi WC, Lee CH, Kim SJ. 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol*, 75(24): 7745-51.

9. Chick H. The Process of Disinfection by Chemical Agencies and Hot Water. *J Hyg (Lond)*. 1910. 10(2):237-86.
10. Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol*,73(1):29-34.
11. Dawson DJ, Paish A, Staffell LM, Seymour IJ, Appleton H. 2005. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J Appl Microbiol*, 98(1):203-9.
12. Dick LK, Stelzer EA, Bertke EE, Fong DL, Stoeckel DM. 2010. Relative decay of Bacteroidales microbial source tracking markers and cultivated *Escherichia coli* in freshwater microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3255-3262.
13. Ethelberg S, Lisby M, Bottiger B, Schultz AC, Villif A, Jensen T, Olsen KE, Scheutz F, Kjelso C, Muller L. 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark. *Euro Surveill.* 11; 15(6).
14. Fino VR, Kniel KE. 2008. UV light inactivation of hepatitis A virus, Aichi virus and feline calicivirus on strawberry, green onions and lettuce. *J Food Prot*, 71(5):908-913.
15. Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB. 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol.* 76(3):715-23.
16. Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl Environ Microbiol*, 69(3):1556-63.
17. Formiga-Cruz M, Tofiño-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Conden-Hansson AC, Hernroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones MD, Girones R. 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 68(12):5990-8.
18. Gallot C, Grout L, Roque-Afonso AM, Couturier E, Carrillo-Santistevé P, Pouey J, Letort MJ, Hoppe S, Capdepon P, Saint-Martin S, De Valk H, Vaillant V. 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerg Infect Dis*, 17(3):566-7.
19. Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am.J. Public Health.* 69:1116-1119.
20. Kokkinos PA, Ziros PG, Mpalasopoulou A, Galanis A, Vantarakis A. 2011. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virology*. 27;8:195.
21. Hernroth, BE, Conden-Hansson A-C, Rehnstam-Holm A-S, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator

- Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4523-4533.
22. Koopmans M & Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 90: 23–41.
 23. Kurdziel AS, Wilkinson N, Langton S, Cook N. 2001. Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *J Food Prot*, 64(5):706-9.
 24. Laverick, M.A. Wyn-Jones A.P, Carter M.J. 2004. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett. Appl. Microbiol*, 39(2):127–136.
 25. Lipp EK, Farrah SA; Rose JB. 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar. Pollut. Bull.* 42:286-293.
 26. Melnick JL, Gerba CP. 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*. 10, 65.
 27. Muniain-Mujika I, Girones R, Lucena F. 2000. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *J Virol Methods*. 89(1-2):109-18.
 28. Nuanualsuwan S, Cliver DO. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods*. 104(2):217-25.
 29. Pecson BM, Martin LV, Kohn T. 2009. 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*. 75(17):5544-54.
 30. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol*. 64:3376-3382.
 31. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:2963-2970.
 32. Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DS, Miagostovich MP, Simões CM, Barardi CR. 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J Appl Microbiol*. 109(6):1979-87.
 33. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Sao Jose Nascimento M, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzeżutka A, Bosch A, Girones R, Carducci A, Muscillo M, Kovač K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff CH, de Roda Husman A, Hernández M,

- van der Poel W. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated Environments. *FEMS Microbiol Rev* 36:786–814.
34. Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R. 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health*. Jun;8(2):346-54.
35. Simmons FJ, Xagorarakis I. 2011. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res*. 45(12):3590-8.
36. Skrabber, S., L. Ogorzaly, K. Helmi, A. Maul, L. Hoffmann, H. M. Cauchie, and C. Gantzer. 2009. Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Res*, 43:4780–4789.
37. Yates MV, Gerba CP, Kelley LM. 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl Environ Microbiol*. 49:778-81.
38. Yates MV, Stetzenbach LD, Gerba CP, Sinclair NA. 1990. The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water. *J Environ Scientific Health*, 25:81-100.

Table 1. Recovery values for HAdV and MS2 on lettuce and on strawberry samples.

	Experiment replicate	HAdV			MS2		
		Recovery values (%)	Recovery mean (%)	SD	Recovery values (%)	Recovery mean (%)	SD
Lettuce	1	56.59	38.79	18.54	NT	NT	NT
	2	19.59			NT		
	3	40.2			NT		
Strawberry	1	0.89	2.46	1.38	22.6	25.73	2.73
	2	3.04			27.6		
	3	3.46			27.0		

SD: Standard deviation

Figure 1. Comparative inactivation of HAdV on lettuce (Δ) and strawberry (\square) surfaces at 4 or 30°C at dark (A and C) or exposed to artificial sunlight (B and D). Data points represent the mean values obtained from duplicate experiments.

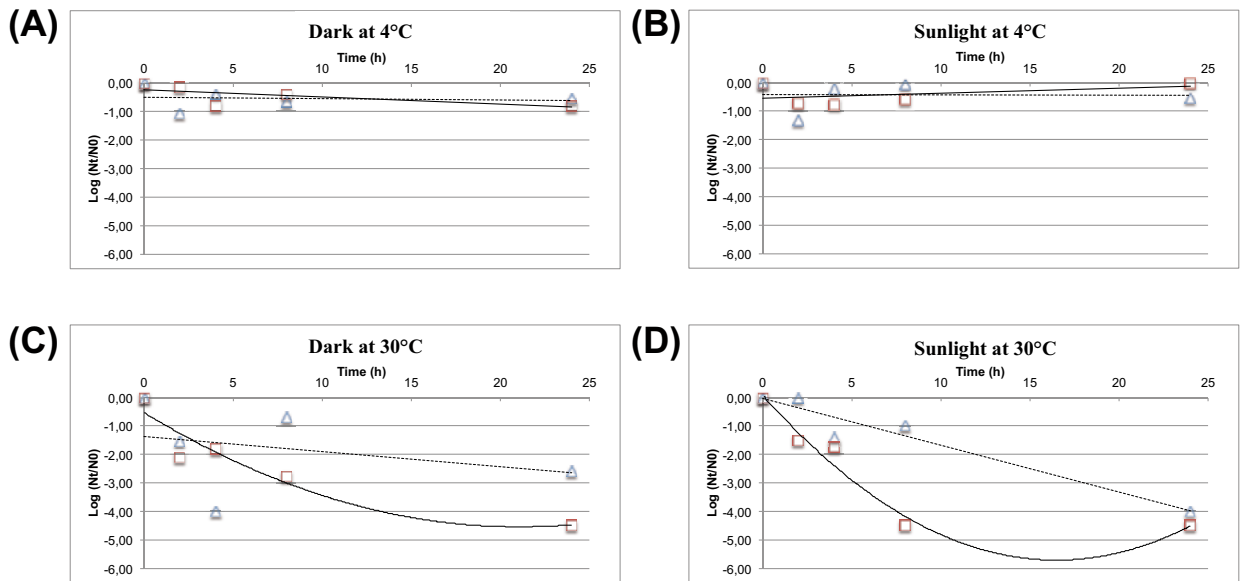


Figure 2. Comparative inactivation of MS2 on lettuce (Δ) and strawberry (\square) surfaces at 7 or 30°C at dark (A and C) or exposed to artificial sunlight (B and D). Data points represent the mean values obtained from duplicate experiments.

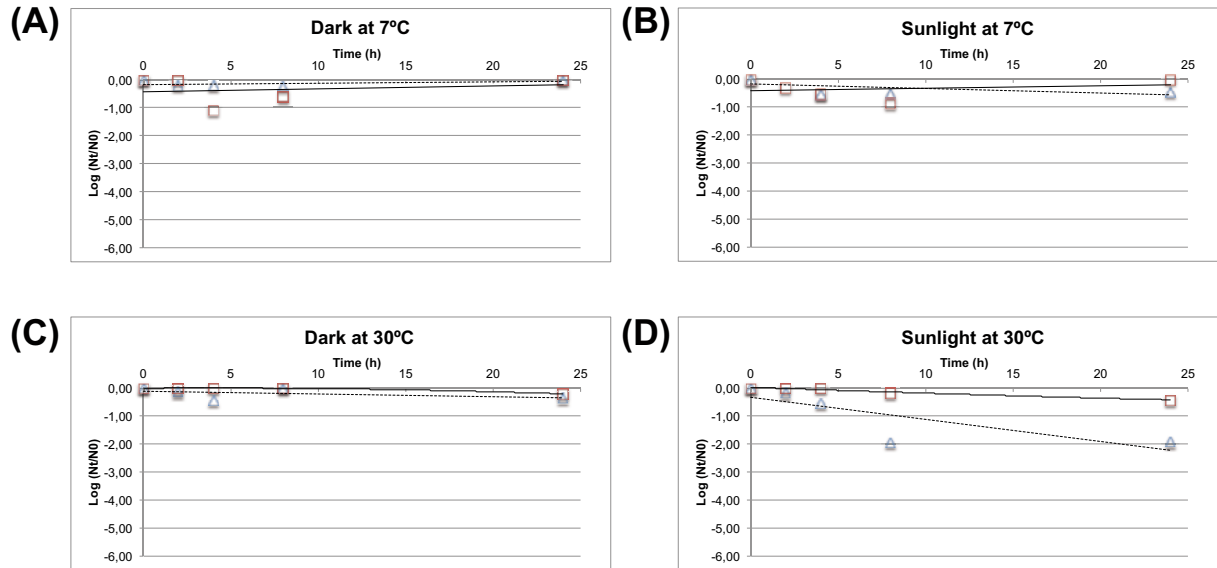


Table 2. Inactivation times (hours) of HAdV and MS2 calculated from experiments developed on fresh produce surfaces at 30°C.

Experimental conditions	Inactivation Times	Lettuce		Strawberry	
		HAdV	MS2	HAdV	MS2
Light	T_{90}	5,8	7,7	0,7	56,9
	T_{99}	12,0	19,6	2,0	111,6
	$T_{99,9}$	18,2	31,6	3,3	166,3
	$T_{99,99}$	24,4	43,6	4,8	220,9
Darkness	T_{90}	7,0	62,3	1,2	68,1
	T_{99}	15,2	130,2	2,7	130,6
	$T_{99,9}$	23,5	198,2	4,4	193,1
	$T_{99,99}$	31,7	266,1	6,3	255,7

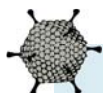
AD: Absence of decay



CAPÍTOL 2

Tractaments de desinfecció de virus a l'aigua

- RESUM ESTUDI 4



“Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus and human JC polyomavirus by chlorine in seawater”.

de Abreu-Corrêa A, Carratalà A, Monte-Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S.

Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78(18): 6450.

Els mol·luscs bivalves són un producte alimentari d'alt risc per a la salut ja que poden originar-se i consumir-se entre països amb estàndards microbiològics molt diferents i sovint es consumeixen crus o poc cuinats. El risc es pot reduir si el marisc segueix processos de depuració adients després de la seva recol·lecció. En aquest estudi, s'ha caracteritzat l'efectivitat del clor en la desinfecció dels HAdV, JCPyV i MNV presents a l'aigua de mar per al seu ús en la depuració de marisc.

La inactivació dels norovirus murins i dels adenovirus humans per l'acció del clor es va analitzar mitjançant tècniques de PCR quantitativa i d'infectivitat, mentre que en el cas dels JCPyV, mitjançant qPCR. Addicionalment, amb l'objectiu d'eliminar falsos positius als resultats de qPCR en comparació als resultats obtinguts als assajos d'infectivitat, es va realitzar tractaments enzimàtics (DNases i RNases) abans de l'extracció d'àcids nucleics (ET-qPCR).

Després de 30 minuts de contacte dels virus amb concentracions inicials de clor d'aproximadament 2 mg/l, es va observar una reducció de 2,3 i 2,4 logaritmes en el nombre de HAdV mitjançant infectivitat en aigua de mar natural i artificial respectivament. La cinètica d'inactivació observada mitjançant la ET-qPCR és estadísticament equivalent a la cinètica observada pels assajos d'infectivitat. Pel que fa als norovirus murí, es va identificar reduccions en el seu nombre de GC d'entre 2,5 i 3,5 logaritmes en aigua de mar natural i artificial respectivament, mentre que als assajos d'infectivitat no es va detectar MNV després de 30 min de contacte amb el clor, tant en aigua de mar natural com en aigua de mar artificial. Pel cas dels JCPyV, es va assolir, mitjançant qPCR, reduccions d'entre 1,1 i 1,5 logaritmes després de 30 min de contacte amb el clor. Els resultats obtinguts pel que fa a la inactivació dels virus estudiats en aigua de mar artificial van ser equivalents als obtinguts amb aigua de mar natural en tots els casos. Es van definir els valors de C(t) corresponents als virus estudiats en cada experiment.

En resum, en aquest estudi s'ha demostrat que l'ús d'una concentració de 2,5 mg de clor lliure/litre d'aigua de mar requereix un temps de contacte llarg per a assolir una disminució significativa de la càrrega viral i que s'ha observat partícules infeccioses de HAdV al final de l'experiment després de 60 minuts de contacte amb el clor.

Comparative Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus, and Human JC Polyomavirus by Chlorine in Seawater

Adriana de Abreu Corrêa,^{a,b} Anna Carratala,^b Celia Regina Monte Barardi,^a Miquel Calvo,^c Rosina Girones,^b and Sílvia Bofill-Mas^b

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^a; Laboratory of Water and Food Viral Pollution, University of Barcelona, Faculty of Biology, Department of Microbiology, Barcelona, Spain^b; and Statistics Department, University of Barcelona, Faculty of Biology, Department of Microbiology, Barcelona, Spain^c

Viruses excreted by humans affect the commercial and recreational use of coastal water. Shellfish produced in contaminated waters have been linked to many episodes and outbreaks of viral gastroenteritis, as well as other food-borne diseases worldwide. The risk can be reduced by appropriate treatment following harvesting and by depuration. The kinetics of inactivation of murine norovirus 1 and human adenovirus 2 in natural and artificial seawater by free available chlorine was studied by quantifying genomic copies (GC) using quantitative PCR and infectious viral particles (PFU). Human JC polyomavirus Mad4 kinetics were evaluated by quantitative PCR. DNase or RNase were used to eliminate free genomes and assess potential viral infectivity when molecular detection was performed. At 30 min of assay, human adenovirus 2 showed 2.6- and 2.7- \log_{10} GC reductions and a 2.3- and 2.4- \log_{10} PFU reductions in natural and artificial seawater, respectively, and infectious viral particles were still observed at the end of the assay. When DNase was used prior to the nucleic acid extraction the kinetic of inactivation obtained by quantitative PCR was statistically equivalent to the one observed by infectivity assays. For murine norovirus 1, 2.5, and 3.5- \log_{10} GC reductions were observed in natural and artificial seawater, respectively, while no viruses remained infectious after 30 min of contact with chlorine. Regarding JC polyomavirus Mad4, 1.5- and 1.1- \log_{10} GC reductions were observed after 30 min of contact time. No infectivity assays were conducted for this virus. The results obtained provide data that might be applicable to seawater used in shellfish depuration.

The interaction between oceans and human health is increasing partly due to the high numbers of humans living within close proximity to the oceans (15). Microbial contamination by bacteria, viruses, and protozoa is related directly and indirectly to human and animal activity and affects the safety of the seafood supply, as well as the commercial and recreational use of coastal areas (25). Human health problems associated with shellfish consumption are well described, and contaminating viruses have been linked to many episodes of gastroenteritis, as well as outbreaks of other diseases (24).

The most common viral pathogens associated with shellfish consumption are human noroviruses (NoVs), which have been implicated in numerous food-borne outbreaks (22). NoVs are responsible for up to 1 million hospitalizations and 218,000 deaths each year in children living in developing countries (34). The infectivity of NoVs detected from environmental samples cannot be assessed yet due to the absence of an *in vitro* cell culture system (2). This has prompted the use of viral surrogates to model the infectious nature of NoVs in environmental samples. Murine norovirus 1 (MNV-1) is considered the best surrogate for NoVs (44). Recently, MNV-1 has also been used as a surrogate for NoV in studies of heat inactivation (20), as well as chlorine and ultraviolet (UV) disinfection (9).

Human adenoviruses (HAdV) are one of the most prevalent human pathogens identified in environmental water samples, including drinking and recreational waters (29). HAdV have greater thermal stability than enteroviruses (38). They are capable of surviving for months in water, especially at low temperatures, and they show resistance to inactivation by UV light (41). JC polyomavirus (JCPyV) is a human virus that produces latent and chronic infections that persist indefinitely in individuals. Viral particles are excreted regularly in urine by healthy individuals

(39). In previous studies, JCPyV was found in 98% of the 52 sewage samples collected from different geographical areas around the world (6). JCPyV has also been found in river water feeding a drinking water treatment plant (1). HAdV and JCPyV are frequently detected in the environment and have been proposed as an index of viral contamination of human origin (6).

Controlled self-purification (“depuration”) of shellfish is a method that reduces the levels of microorganisms present in mollusk meat, thus decreasing the potential for infections associated with shellfish consumption. In this process, shellfish are placed for several hours in tanks filled with clean seawater to purge contaminants from tissues by filtering (24, 27). There are two main types of shellfish depuration plants: flowthrough or recirculating (closed) systems. Depuration is effective in removing many fecal bacterial contaminants from shellfish (11, 37). However, studies focused on enteric viruses, such as HAV, NoVs, and HAdV have shown that it is difficult to remove viruses from contaminated shellfish (16, 18, 42). The flowthrough system requires a nearby, reliable, consistently clean source of seawater. In the closed depuration system, seawater is recirculated for at least 24 h. During this cycle, the water must be chemically (using chlorine and/or ozone) or physically (UV irradiation) treated to eliminate microbial contamination. For the purpose of shellfish depuration, 2 to 3 mg of free chlorine/liter is normally used for up to 1 h before the seawater

Received 31 March 2012 Accepted 25 June 2012

Published ahead of print 6 July 2012

Address correspondence to Rosina Girones, rgirones@ub.edu.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01059-12

ter is returned to the shellfish tank. Before this, the levels of free chlorine in the water need to be reduced to <0.1 mg/liter so that the shellfish and their depuration activity are not affected. This reduction is achieved by the addition of sodium thiosulfate (23).

Chlorination is one of the main disinfection methods used for water and wastewater treatment, due to its low cost, ease of application, and ability to inactivate a wide variety of pathogenic microorganisms (13). Chlorine's ability to destroy microorganisms is due to the chemical interference of HOCl. It is attributed to the ease with which HOCl can penetrate cell membranes, react with enzyme systems of bacteria, and interact with either the capsid proteins or the nucleic acids of viral pathogens (10).

In this context, the goal of the present study was to evaluate the applicability of free chlorine to inactivate selected viruses in natural and artificial seawater, using molecular and cell culture methods, to obtain information that could be useful in the disinfection of water for shellfish depuration tanks or other purposes.

MATERIALS AND METHODS

Viruses and cell lines. The HAdV2 strain (NCPV 00213) and JCPyV strain Mad4 (kindly provided by E. O. Major, Laboratory of Molecular Medicine and Virology, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD) were grown, respectively, on A549 cells, derived from human lung adenocarcinoma (European Collection of Cell Cultures), and the human glial cell line SVGA (a gift from W. Atwood, Brown University, Providence, Rhode Island, RI). The cells were propagated in Eagle minimum essential medium (MEM; Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, and 1% L-glutamine. The titer of the viral working solution was determined by an immunofluorescence assay (8) to be $\sim 10^9$ focus-forming units (FFU)/ml for HAdV2 and 10^6 FFU/ml for JCPyV Mad4.

MNV-1 was propagated in RAW 264.7 cells (a macrophage-like Abelson leukemia virus-transformed cell line, derived from BALB/c mice). This cell line and MNV-1 were kindly donated by Herbert W. Virgin, Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine (St. Louis, MO). RAW 264.7 cells were cultured in $1 \times$ Dulbecco MEM (DMEM; Gibco) supplemented with 10% FBS (low endotoxin serum), 1.5% HEPES, 1% penicillin-streptomycin, 1% nonessential amino acids, and 1% L-glutamine. The MNV-1 working solution titer was determined by a plaque assay (as described below) and was estimated to be approximately 4×10^8 PFU/ml.

Disinfection assays. (i) **Tested waters.** All disinfection experiments were conducted in either artificial or natural seawater. Artificial seawater was prepared using commercial salts (sea salts; Sigma, St. Louis, MO) by dissolving 33.33 g of sea salts per liter of deionized chlorine demand-free water and was stored in bottles at 4°C until used. Natural seawater was collected from a coastal area south of Barcelona. The pH and conductivity were measured for both types of water tested.

(ii) **Glassware treatments.** The reagents and glassware used here were prepared as described previously (41). Briefly, glassware was made chlorine demand-free by overnight soaking in a solution of at least 100 mg of free chlorine/liter. The beakers were then rinsed with chlorine demand-free water and baked for at least 2 h at 200°C. After this initial treatment, soaking in free chlorine solution and rinsing in demand-free water was the only treatment performed for all glassware.

A chlorine stock solution of approximately 150 mg/liter was prepared using bleach (commercial sodium hypochlorite solution, 42 g of free chlorine/liter) that was suitable for tap water disinfection. Dilution of this stock solution in chlorine demand-free water was carried out to achieve the free chlorine concentrations used in the disinfection experiments.

(iii) **Experimental design for seawater disinfection.** Chlorine demand-free glass beakers containing 65 ml of natural or artificial seawater were placed inside a biological safety cabinet (at 23 to 25°C) and were

magnetically stirred prior to each experiment. The free chlorine concentration of the stock solution was measured by the DPD (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine) method, and the volume necessary to achieve the initial free-chlorine dose in each experimental beaker was calculated. The assays were performed in duplicate for each tested water sample.

Two beakers were analyzed in every assay, and both were inoculated simultaneously with the three viruses selected (viral suspensions diluted in phosphate-buffered saline [PBS]) at a concentration that would allow detection of 4-log inactivation in either natural or artificial seawater (2×10^7 GC of HAdV2/ml; 5×10^8 of MNV-1 and 1.5×10^5 of JCPyV Mad4). One of these beakers (beaker 1) was used as a negative control of disinfection, with no chlorine added, for each of the experiments performed. This control was needed to determine the initial virus concentration and to evaluate whether virus inactivation occurred under the test conditions. Another beaker (beaker 2), containing chlorine at an initial concentration of 2.5 mg/liter, was used to evaluate the kinetics of viral disinfection. For 60 min, 5-ml seawater samples were collected at 30 s, 10, 20, 30, 45, and 60 min for viral analysis. Residual free chlorine was immediately quenched by placing the 5-ml samples into collection tubes containing 50 μ l of sterile 10% sodium thiosulfate solution. These tubes were kept on ice until used for viral detection.

An additional 5 ml of seawater were collected before viral spiking (identified as 0 s) and at the same sampling times as those cited above. These samples were analyzed to determine the residual free chlorine concentration by the DPD method for each disinfection assay performed.

After chlorine disinfection, samples were ultracentrifuged at $60,000 \times g$ for 60 min at 4°C. The resultant pellets were resuspended in sterile PBS. The nucleic acid isolation and infectivity assays were performed on the same day as the chlorine disinfection to avoid sample freezing.

Evaluation of viral inactivation by cell culture methods. (i) **Cytotoxicity tests.** Cytotoxicity tests were performed to evaluate the potential toxicity caused by seawater in cell lines to be used during disinfection studies. The tests were carried out as previously described (36), with minor modifications. RAW 264.7 and A549 cell monolayers (2×10^5 cells/ml) were propagated in 24-well microplates (Nunc, Rochester, NY) for 24 h before the cytotoxicity assays were performed. Inoculation was carried out as follows: 2-fold serial dilutions of unseeded seawater ranging from 1:2 to 1:32 were prepared in serum-free culture medium ($1 \times$ DMEM for RAW 264.7, and $1 \times$ MEM for A549 cells). Inoculates of 250 μ l of each tested water were then adsorbed to cells that had been washed with PBS previously. All assays were carried out in duplicate. After incubation, the inoculum was removed, and the cells were supplied with 1 ml of culture medium supplemented with 2% FBS (for A549) and 10% FBS (for RAW 264.7 cells). Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ and observed for cytopathic effect after 2 (RAW 264.7) and 4 (A549 cells) days of incubation. Each observation was compared to negative controls containing only cell monolayers and the medium but no seawater. Cell monolayers were observed under an inverted light microscope. They were fixed with 1% formalin and stained with 0.1% crystal violet to establish a first noncytotoxic dilution of seawater to be used in further viral infectivity assays. Seawater diluted 1:2 and 1:4 in serum-free culture medium were selected to be used on A549 and RAW 264.7, respectively.

(ii) **Plaque assays.** In the present study, the plaque assay applied to the titration, and evaluation of MNV-1 infectivity was performed as described previously (2), with some modifications. Briefly, RAW 264.7 cells were seeded into 60-mm plates at a density of 2×10^6 cells per well. Cells were then allowed to adhere for 48 h at 37°C in the presence of 5% CO₂. After chlorine disinfection, the samples were diluted in PBS at noncytotoxic dilutions to quantify infectious MNV-1. The cell culture medium was decanted, and cells were infected with 0.5 ml of each dilution. After incubation for 1 h at 37°C in the presence of 5% CO₂, the inocula were aspirated and replaced with 2 ml of a solution containing 1.5% SeaPlaque Agarose (Lonza, Basel, Switzerland) and supplemented with DMEM (as described above for viruses and cell lines). The samples were allowed to solidify, and incubated at 37°C for up to 48 h until plaques were visible. To

TABLE 1 Primer and probe sets used to detect MNV-1, JCPyV Mad4, and HAdV2 by q(RT)-PCR

Virus (reference)	Primer or probe	Sequence (5'–3')
JCPyV (33)	JE3F	ATGTTTGCCAGTGATGATTGAAAA
	JE3R	GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT
	JE3P	6-FAM-AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA-TAMRA
HAdV2 (19)	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG
	AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG
	AdP1	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA
MNV-1 (3)	Fw-ORF1/ORF2	CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG
	Rv-ORF1/ORF2	GCG CTG CGC CAT CAC TC
	MGB-ORF1/ORF2	6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ

better visualize the plaques, a neutral red solution (final concentration, 0.1%) was added to 2 ml of the mixture containing 1.5% agarose and supplemented with DMEM after solidification and incubation at 37°C for 6 to 8 h. The plaques were counted, and the virus titer was expressed as PFU/ml.

The assay to evaluate infectious HAdV2 followed the same principle as that described for MNV-1, with some modifications. Briefly, A549 cells in suspension (6×10^5 /ml) were mixed with a seawater sample volume. This suspension was added to a 25-cm² sterile flask and placed at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ for between 4 to 6 h. A volume of overlay medium containing 3% carboxymethyl cellulose was added, and the flask was incubated at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ for up to 7 days. After 7 days, the medium was removed. The cells were then fixed and stained with crystal violet. The plaques were counted, and the virus titer was expressed as PFU/ml.

Evaluation of viral inactivation by molecular methods. (i) **Nucleic acid isolation.** Viral genomes from samples treated with free chlorine were isolated using the QIAmp viral RNA minikit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The nucleic acids were eluted in the elution buffer provided and stored at -80°C until they were used in real-time PCR and real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR).

(ii) **Enzymatic treatment before the application of molecular assays.** In the present study, two enzymatic treatments to assess the capsid integrity of the viruses detected using real-time PCR after the disinfection of seawater with free chlorine were performed. For each sample, the enzymatic treatments were based on the use of 100 U of DNase I (molecular grade; Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions, and RNase A (from bovine pancreas [Invitrogen]), as previously reported (30). These treatments were performed before the nucleic acid extraction of the samples to be tested by real-time PCR, in order to quantify HAdV2, JCPyV Mad4, and MNV-1. Control assays were performed to confirm the total inactivation of DNase and RNase in the samples by using stop buffer (provided with DNase I) and 40 U of RNase inhibitor (data not shown).

Real-time PCR. (i) **Preparation of DNA standard suspensions.** HAdV and JCPyV quantitation was based on the assays described previously by Hernroth et al. (19) and Pal et al. (33), respectively.

Standards for the real-time PCR assays for HAdV2 and JCPyV Mad4 were produced as described before (1). An RNA standard was used to quantify MNV-1. This standard was created using an RNA transcript from an amplicon of 1,663 bp, corresponding to the junction region of ORF1/ORF2 of the MNV-1 genome (positions 3999 to 5662) generated by conventional RT-PCR using the forward primer 5'-GAGATGGGTAAATCC ATGCG-3' and the reverse primer 5'-CAGAGACCACAAAAGACTCAT C-3' (21). This RNA was transcribed by Yorkshire Bioscience (York, United Kingdom) using a T7 RNA polymerase transcription system. Plasmid DNA was removed completely with RNase-free DNase according to the product description. RNA was purified by LiCl precipitation, followed by multiple phenol-chloroform extractions and precipitation with etha-

nol and dilution in Milli-Q water. The RNA concentration was determined by spectrophotometry, and the copy number of standard RNA molecules was calculated as described above. Serial 10-fold dilutions were prepared in RNA storage buffer (Ambion, Austin, TX), aliquoted, and stored at -80°C .

(ii) **Quantitative PCR and quantitative reverse transcription-PCR (qPCR and RT-qPCR).** For the specific detection and quantitation of JCPyV and HAdV2 genomes, 10 μl of undiluted samples and 1:10 dilutions of every DNA extraction were tested. These dilutions were made to detect and reduce amplification inhibition due to the potential presence of inhibitory substances that may interfere with the quantitative PCR (qPCR). Amplification was performed in a 25- μl reaction mixture with TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reaction contained 10 μl of a DNA sample, 10 μl of DNA sample diluted 1:10, or 10 μl of a quantified DNA plasmid- $1 \times$ TaqMan master mix, along with the corresponding primers and TaqMan probes for HAdV and JCPyV.

For the detection and quantitation of MNV-1 genomes, we assayed 5 μl of the RNA extraction and of the 10-fold dilution. Amplification was performed in a 20- μl reaction mixture with the RNA UltraSense one-step quantitative RT-PCR system (Invitrogen). The reaction contained 5 μl of an RNA sample or 5 μl of an RNA standard, $1 \times$ UltraSense mix, $1 \times$ UltraSense enzyme mix, and $1 \times$ ROX, in addition to the primers and probe.

For MNV-1, the amplification were performed after retrotranscription for 30 min at 50°C and activation of the HotStarTaq (Qiagen) for 15 min at 95°C , followed by 45 cycles of amplification (10 s at 95°C , 20 s at 55°C , and 15 s at 72°C). For HAdV2 and JCPyV, the genomes were quantified after the activation of the uracil *N*-glycosylase contained in the core mix (2 min at 50°C), the activation of AmpliTaq Gold for 10 min at 95°C , and 40 cycles of amplification (15 s at 95°C and 1 min at 60°C). The sets of primers and probes for each virus are described in Table 1. Quantitations were performed with an MX3000P sequence detector system (Stratagene, La Jolla, CA).

Kinetic modeling and statistical analysis. The chlorine disinfection was characterized by the efficiency factor Hom (EFH) model (5, 17, 41), a widely used model that takes into account the decreasing chlorine concentrations caused by the virus itself and the organics present in the solution. The chlorine concentration in each experiment is therefore modeled as a first-order kinetic equation:

$$C(t) = C_0 e^{-k't} \quad (1)$$

where $C(t)$ is the residual chlorine concentration in mg/liter at time t (in minutes), C_0 is the initial chlorine concentration, and k' is the first-order decay rate constant. C_0 and k' from equation 1 were used in the following equation to model the disinfection kinetics:

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -kC_0^m \left(\frac{1 - e^{-nk't/m}}{nk't/m}\right)^m \quad (2)$$

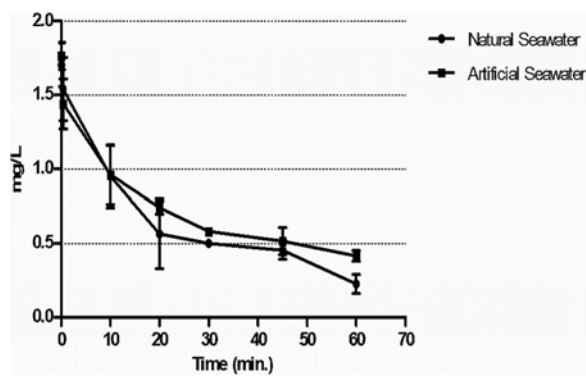


FIG 1 Free chlorine decay curve in disinfection assays using natural and artificial seawater. The dots represent an average of two replicates for each type of water tested.

where k is the inactivation rate constant, n is the coefficient of dilution, m is the Hom's exponent, $\ln(N(t)/N_0)$ is the natural log of the survival ratio, and $N(t)$ is the number of organisms remaining at time t divided by N_0 (the number at time zero). To determine the parameter values for both equations, Microsoft Excel Solver (Microsoft Excel 2010; Microsoft Corp.) was used to minimize the error sum of squares between the observed and predicted $C(t)$ and $\ln(N(t)/N_0)$ for each viral disinfection replicate of each experiment.

For every experiment, an F-approximate test was conducted to assess the homogeneity of the disinfection kinetic on the two replicates. If homogeneous replicates were found, 12 pairs of previously selected experiments were also compared to an F-test to assess the homogeneity of the overall pair. The P values of these multiple comparison tests were adjusted with the Benjamini and Hochberg correction (4).

Once the parameters of the EFH model equation had been estimated for all of the experiments, they could be used to predict the time values for 2- and 3-log inactivation of the viruses. These times, expressed in minutes, are noted, respectively, as t_{99} and $t_{99.9}$.

RESULTS

Free chlorine decay in seawater. The rate and extent of free chlorine demand in tested waters before and after spiking with viral stocks was determined. As shown in Fig. 1, both types of seawater exhibited a demand for free chlorine. The residual concentration of the disinfectant decreased over time. At an initial dosage of ~ 2.5 mg/liter, free chlorine was consumed rapidly by both test waters within 30 s. After 60 min, at the end of the assay, an 80% reduction in the initial dose of chlorine was observed.

Viral inactivation by chlorination of seawater. The inactivation kinetics of the three viruses by 2.5 mg of free chlorine (initial dose)/liter in natural and artificial seawater was based on the results obtained in two independent experiments for each type of water. Virus disinfection data, in PFU/ml and GC/ml for HAdV2 and MNV-1 and in GC/ml for JCPyV Mad4, are presented in the figure as the log reduction values obtained in each of the assays performed (Fig. 2).

The initial concentration of HAdV2 in the tested waters was of the order of 10^7 GC/ml being free DNA present since after DNase I treatment applied before nucleic acid extraction a reduction of nearly 2 logs was observed by qPCR (enzymatic treatment [ET]-qPCR) being the concentration of the order of 10^5 GC/ml. Infectious HAdV2 at the beginning of the experiment were of the order of 10^4 PFU/ml and thus 1 log less than when quantifying by ET-qPCR. Based on ET-qPCR results, HAdV2 showed an ~ 2.5 -log₁₀

reduction for both natural and artificial seawater after 30 min of contact with chlorine. At the end of the assay, the reduction reached 2.7- and 3.3-log₁₀ reductions for natural and artificial seawater, respectively, which indicates a reduction of 99.9% of the initial viral load. Regarding plaque assay, HAdV2 remained infectious throughout the assay and 1.7×10^2 PFU/ml in natural seawater and 4.5×10^1 PFU/ml in artificial seawater were observed (reductions of 2.3 log₁₀ and 3.30 log₁₀, respectively) after 60 min of contact with chlorine. The results obtained for MNV-1 disinfection (Fig. 2) indicate that this virus was more sensitive to chlorine than HAdV2 in both types of seawater tested. The initial 10^8 and 10^7 GC/ml observed by ET-qPCR for natural and artificial seawater, respectively, decrease to 10^4 and 10^2 after 60 min of contact with chlorine (4-log₁₀ and 5-log₁₀ reductions, respectively). However, when a plaque assay was performed, infectious MNV-1 was only observed after 20 min of contact (1.25×10^1 PFU/ml, in natural seawater, 4.2-log₁₀ reduction; 1.65×10^1 PFU/ml, in artificial seawater, 4.4-log₁₀ reduction). Treatment with RNase before nucleic acid extraction allowed us to eliminate at least 0.5 to 1 log₁₀ of RNA accessible for RNases present in the samples.

JCPyV showed higher genome stability than the other two viruses analyzed (Fig. 2). Initial concentrations quantified by ET-qPCR showed 2.1×10^4 and 5.2×10^3 GC/ml for natural and artificial seawater, respectively (1 log less than when no DNase treatment was applied). At the end of the assay (60 min), 6×10^2 and 9.5×10^2 GC/ml were observed for natural and artificial seawater, respectively (1.45- and 1.33-log₁₀ reductions). The infectivity of JCPyV was not evaluated, due to the technical limitations of JCPyV immunofluorescence assay (8) when applied to seawater samples.

F-approximated tests conducted to assess the homogeneity of the disinfection kinetic on the two replicates of every experiment provided the series of P values represented in Table 2. According to these P values, only assays in which the decay of JCPyV and HAdV2 was quantified by qPCR in natural seawater showed no homogeneity between replicates.

We conducted a statistical comparison of 12 selected pairs of homogeneous replicates with an F-test ($P = 0.05$) to assess the homogeneity of the overall pair and thus to know whether the two inactivation kinetics were equivalent or not. From these comparisons we may draw several conclusions. (i) The decay in the infectivity of HAdV2 follows kinetics similar to the decay of the HAdV2 genome copies (GC), as measured by ET-qPCR titers (Fig. 3) for both types of waters tested ($P = 0.67152$ and 0.1334 , respectively). (ii) For MNV-1, the kinetics observed when disinfection was measured by qPCR were different when enzymatic treatment was or was not applied to both types of water ($P = 0.00030$ and 0.00861 , respectively). However, the kinetics observed by ET-qPCR do not correlate to those observed by infectivity assays ($P < 0.00001$ and 0.00034 , respectively) (Fig. 3). (iii) The disinfection kinetics of HAdV2 and JCPyV measured by ET-qPCR in natural seawater follow equivalent kinetics ($P = 0.1842$), whereas different kinetics were observed between these two viruses when artificial seawater was studied by qPCR, with or without enzymatic treatment ($P = 0.00004$ and 0.00951 , respectively).

The $C(t)$, the product of the disinfectant concentration (C ; in mg/liter) \times the contact time (t ; in min), and the $t_{99.9}$ and $t_{99.99}$ values were calculated to evaluate the disinfection effectiveness for all viruses (Table 3). The $C(t)$ values of chlorine disinfection for a 3-log reduction $C(t)[t_{99.99\%}]$ of HAdV2 by plaque assay in natural

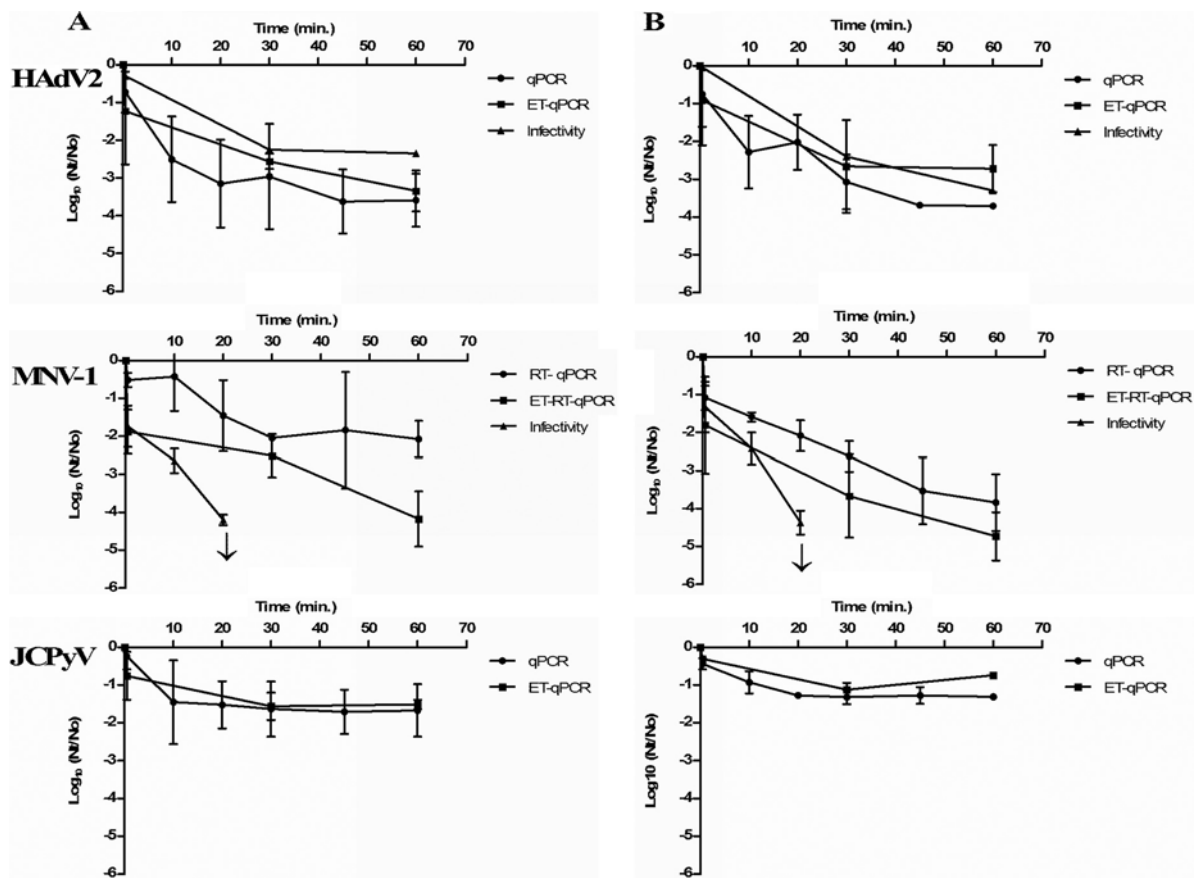


FIG 2 Log reduction curves for seeded HAdV2, MNV-1, and JCPyV in natural (A) and artificial (B) seawater treated with free chlorine at 2.5 mg/liter (initial concentration). Each data point is an average of two independent experiments, except in the case of HAdV2 infectivity, where the values correspond to one experiment. ↓, Detection limit.

seawater were not reached. For artificial seawater, the value was 42.24 mg/liter \times min. The $C(t) t_{99.9\%}$ of JCPyV Mad4 could not be calculated in any replicate assayed, since the reduction rate did not reach 3 logs. The $C(t) t_{99.9\%}$ values for MNV-1, as determined by plaque assay in natural and artificial seawater, were 11.49 and 20.82 mg/liter \times min, respectively. This indicates that MNV-1 is more susceptible than HAdV2 and JCPyV Mad4 to chlorine treatment.

DISCUSSION

Chlorine was one of the earliest means used to disinfect seawater for depuration. Addition of chlorine is usually undertaken by the

use of sodium hypochlorite solution at 2 to 3 mg of free chlorine/liter for a contact time of up to an hour (23).

The aim of the present study was to investigate the ability of chlorine in natural and artificial seawater to inactivate RNA and DNA viruses. MNV-1 was evaluated since it has been used as surrogate of human NoV, an RNA pathogen commonly involved in shellfish originated outbreaks, and HAdV and JCPyV were evaluated since they have been proposed as human fecal viral indicators (6). Differences were observed in the disinfection kinetics between the viruses used for genome persistence and for viral infectivity.

When chlorine is added to seawater, the concentration of residual chlorine decreases over time in two phases (14). In the first phase, the concentration decrease rapidly. This is followed by a much slower but steady decrease in concentration over time. A significant fraction of the chlorine demand observed in our study was caused by the reaction between the added chlorine and naturally occurring organic compounds in seawater, which reduced the availability of free chlorine for disinfection. Inorganic substances, such as ammonia (NH_3) and iron (Fe^{2+}), react rapidly with chlorine and create an instant chlorine demand (43). If seawater is considered to be at around pH 8, the addition of chlorine will result in the presence of HOCl^- , OCl^- , HOBr , and OBr^- , which will create a hostile environment for living organisms (14). This may explain why chlorine inactivated the selected viruses assayed, even at low concentrations. It is widely accepted that free

TABLE 2 *P* values calculated by F-approximate tests to assess the homogeneity of the disinfection kinetics on the replicates of every experiment for each virus

Expt ^a	<i>P</i> ^b		
	MNV-1	HAdV2	JCPyV
NS infectivity	0.55	1R	NT
AS infectivity	0.09	1R	NT
NS qPCR	0.13	0.001	<0.001
AS qPCR	0.16	0.05	0.69
NS ET-qPCR	0.92	0.44	0.15
AS ET-qPCR	0.35	0.09	0.84

^a NS, natural seawater; AS, artificial seawater.

^b NT, not tested; 1R, one replicate.

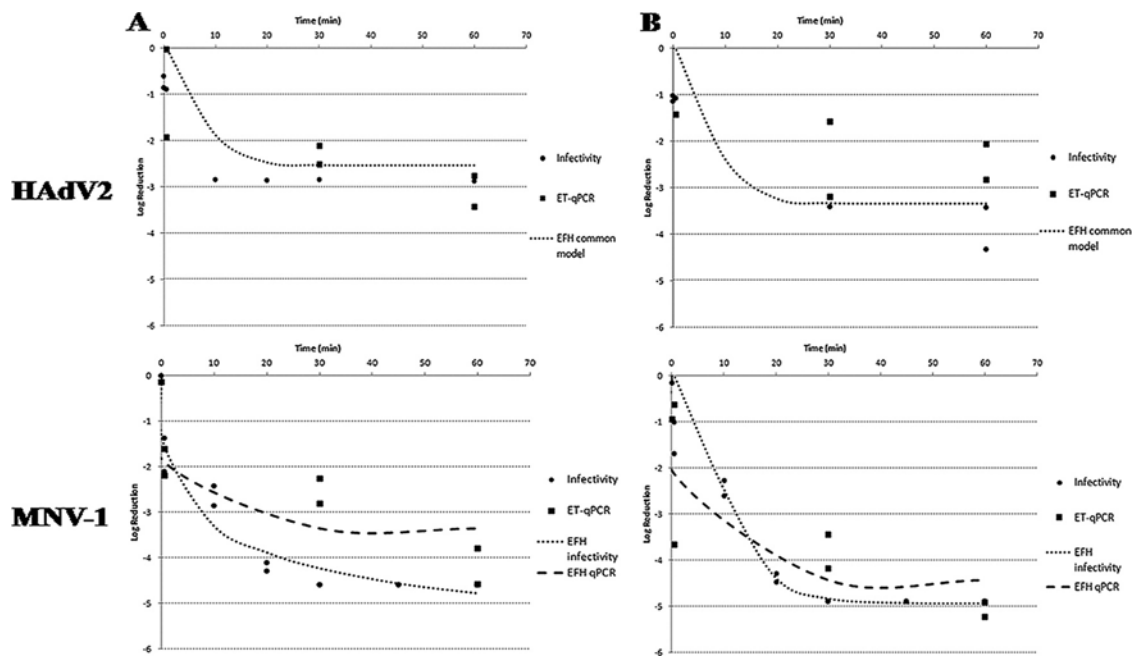


FIG 3 Log reduction of HAdV2 and MNV-1 infectivity and ET-qPCR in natural (A) and artificial (B) seawater treated with free chlorine at 2.5 mg/liter (initial concentration). For HAdV2, the common EFH model is plotted as a dotted line; for MNV-1, the EFH model of infectivity is plotted as a dotted line, and the EFH model of ET-qPCR is plotted as a dashed line. The observed replicates of each series, of both viruses, are plotted as squares (ET-qPCR) or circles (infectivity).

chlorine loses its virucidal and bactericidal activity in the presence of organic substances (40), such as host cell components and proteins in the suspension media (for instance, MEM contains reducing reagents, such as cysteine, which interfere with the action of sodium hypochlorite). Therefore, the use of a viral suspension in PBS prevented higher chlorine consumption in all of the experiments. Although a higher amount of naturally organic compounds in natural seawater might cause differences in inactivation between viruses in natural or artificial seawater in our experiments, the behaviors of viruses in both water types show no statistically significant differences.

Our findings suggest that MNV-1 is more sensitive to chlorine disinfection than is HAdV2 and is initially inactivated rapidly, as measured by a plaque assay in both types of tested waters. These results are in agreement with previous published studies (9, 12, 40). The reduction probably reflects the greater sensitivity of MNV-1 to free chlorine than to combined chlorine residuals. Although MNV-1 is inactivated rapidly, the time required for 2-log

reduction was greater than in the studies cited above. This suggests that environmental factors, such as ionic strength and compounds naturally found in seawater, may slow the disinfection process but not affect its efficiency. More experimental data should be accumulated to define suitable disinfection treatments for NoVs.

HAdV2 was inactivated by free chlorine within the first min of contact time and might have been inactivated by combined chlorine, although not completely, up to 60 min ($t_{99,9}$ not reached and of 24.69 min for natural and artificial seawater, respectively, as measured by plaque assays and not reached $t_{99,99}$ for both types of water). HAdV2 behavior may follow bi- and/or triphasic inactivation curves during chlorine disinfection experiments, with an initial rapid inactivation phase, followed by more gradual inactivation, depending on water quality (32). This type of inactivation curve may occur if microorganisms are more resistant to disinfection or if the presence of aggregated individuals provides higher resistance to inactivation than dispersed organisms. Another possibility is that more than one mechanism of inactivation may af-

TABLE 3 $t_{99,9}$ and $t_{99,99}$ values predicted to inactivate 3 and 4 logs, respectively, of each virus tested, along with the calculated $C(t)^a$

Expt	MNV-1				HAdV2				JCPyV Mad4			
	3-Log inactivation		4-Log inactivation		3-Log inactivation		4-Log inactivation		3-Log inactivation		4-Log inactivation	
	$t_{99,9}$	$C(t)$	$t_{99,99}$	$C(t)$	$t_{99,9}$	$C(t)$	$t_{99,99}$	$C(t)$	$t_{99,9}$	$C(t)$	$t_{99,99}$	$C(t)$
NS infectivity	6.72	11.49	22.77	59.90	NR		NR		NT			
AS infectivity	11.83	20.82	16.70	41.70	24.69	42.24	NR		NT			
NS qPCR	NR		NR		NR		NR		NR		NR	
AS qPCR	28.63	50.38	45.17	113	21.64	37.00	70.23	175	NR		NR	
NS ET-qPCR	1.58	2.70	NR		NR		NR		NR		NR	
AS ET-qPCR	0.94	3.20	2.13	5.30	NR		NR		NR		NR	

^a NS, natural seawater; AS, artificial seawater; $C(t)$, disinfectant concentration (in mg/liter) \times the contact time (in minutes); NR, not reached; NT, not tested.

fect HAdV2, which presents a more complex capsid than MNV-1 (12). A more recent study (31) suggests that free chlorine-treated HAdV2 retained their ability to bind to A549 cell receptors, despite being unable to form plaques. This indicates that the free chlorine inactivation mechanism involves the inhibition of post-binding events in the HAdV2 life cycle, such as early viral protein expression. In that same study, DNA isolated from HAdV2 that had been inactivated by free chlorine was amplified by PCR, which indicates that genome damage was not the only cause of inactivation.

The $C(t)$ values observed here in analyzing seawater were higher than other published results using different water matrices (12, 26). The homogeneous composition and high salt concentration in this matrix may affect viral dispersion, aggregation, and stability.

Although JCPyV has been described as a potential human fecal indicator (6), data on its inactivation by chlorine have not been reported. The presence of human polyomaviruses has been reported (28) in 2/9 tertiary chlorine wastewater samples. Previous studies showed great prevalence of this virus in the environment (7, 28) and in source water (1). We present here the first data on the stability and chemical disinfection of JCPyV in seawater. According to our results, JCPyV genomes might be highly resistant to chlorine disinfection when measured by qPCR. We could only calculate the t_{99} on the basis of qPCR data in one of the eight qPCR replicates assayed (qPCR and ET-qPCR in both artificial and natural seawater), since no t_{99} values were reached in the other replicates in the evaluated period of time. Further studies on survival of JCPyV after disinfection should be conducted in the future.

Although qPCR and RT-qPCR are sensitive and specific assay systems, they appear to underestimate virus inactivation by free chlorine, since the nucleic acids of inactivated viruses may be amplified (35). Enzymatic treatments may differentiate intact from damaged viruses on the basis of differences in the ability of the viral proteic capsids to protect the genomes from proteases and nucleases. When the capsid is degraded, the naked DNA/RNA is more susceptible to nuclease degradation than capsid-enclosed DNA/RNA (35). This would allow disinfection studies of viruses that do not grow in cell culture, such as human NoVs. In the present study, enzymatic treatment solved part of this problem and generated results that were more similar to those obtained in infectivity assays (30). Our data, taking into account the limited number of replicates assayed, indicate that the kinetics of disinfection of HAdV2, as measured by infectivity assays or by ET-qPCR, are similar. Hence, ET-qPCR could be used to infer the infectiousness of HAdVs in the conditions assayed. However, this correlation was not observed for MNV-1, although ET-qPCR yielded results more similar to the data on infectivity than to the qPCR data. Further work on these treatments should be carried out in the future to develop a molecular method that can provide results that are as similar as possible to those obtained from infectivity assays, which are usually time-consuming and expensive. The data obtained here suggest that the times applied to the disinfection of water to be used in shellfish depuration should be revised since, after 60 min of contact with chlorine, infectious adenovirus was still detected. Further studies should focus on evaluating the time needed for the efficient removal of all viruses present in water used for depuration. Since different viruses present different inactivation kinetics, those more stable to chlorine action should be used in these studies. Alternative disinfectants such as UV irradiation or ozone may also be compared to chlorine treatment, although

infectious HAdV has also been detected in shellfish samples depurated with waters treated with these agents (J. Rodriguez-Manzano, unpublished data).

In summary, our study has shown that the use of 2.5 mg of free chlorine/liter in seawater requires a long contact time in order to significantly decrease the viral load. We found that the genome of JCPyV Mad4 is more resistant to chlorine disinfection than those of HAdV2 and MNV-1, when molecular methods were applied, providing new information about JCPyV stability in seawater. This could be because JCPyV presents a complex genomic structure.

HAdV2 show high resistance to chlorine treatment, and infectious viral particles were still observed at the end of the experiment. MNV-1 capsid integrity is more affected by chlorine treatment than its genome compared to the other viruses tested. According to the statistical analysis, the enzymatic treatment by DNase applied before qPCR was useful to infer the HAdV2 infectivity decay caused by chlorine. In contrast, further studies are needed to improve the use of RNase treatment.

Chlorine application to the disinfection of water for shellfish depuration purposes should be further evaluated in order to increase the contact times currently applied. All of the results obtained were statistically equivalent when artificial and natural seawater were studied, suggesting that artificial seawater could also be used in shellfish depuration tanks.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a European Commission Framework Program 7 project, Integrated Monitoring and Control of Food-Borne Viruses in European Food Supply Chains (VITAL; grant KBBE 213178), led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, United Kingdom), Martin D'Agostino (FERA, United Kingdom), and Franco M. Ruggeri (ISS, Italy); by project AGL2008-05275-C03-01/ALI, Integrated Risk Analysis Related to the Consumption of Pathogenic Viruses Present in Water and Food, which was funded by the Spanish Ministry of Science; and by project A/017172/08, Development of Methods to Evaluate the Risk Associated with Shellfish Polluted with Human Viruses, funded by the Spanish Ministry of Cooperation. During this study, A.D.A.C. was a fellow of the Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, CAPES-PDEE, Brazil (with a 1-year period of collaboration in the University of Barcelona, project number 4038-08-8). A.C. was a fellow of the Spanish Ministry of Science.

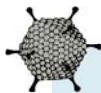
We are grateful to Carlos Maluquer de Motes for critically reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Albinana-Gimenez N, et al. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water-treatment plants. *Water Res.* 43:2011–2019.
- Bae J, Schwab KJ. 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:477–484.
- Baert L, et al. 2008. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:543–546.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 57:289–300.
- Black S, Thurston-Enriquez JA, Gerba CP. 2009. Determination of CT values for chlorine of resistant enteroviruses. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 44:336–339.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:238–245.

7. Bofill-Mas S, et al. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7894–7896.
8. Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol. Methods* 171:1–7.
9. Cannon JLE, et al. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 69:2761–2765.
10. Cheremisinoff NP. 2002. Handbook of water and wastewater treatment technologies. Butterworth Heinemann, Woburn, MA.
11. Correa AA, et al. 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mar. Environ. Res.* 63:479–489.
12. Cromeans TL, Kahler AM, Hill VR. 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1028–1033.
13. Deborde M, Von Gunten U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res.* 42:13–51.
14. Din AMS, Rasheed AA, Hammoud AA. 2000. On the chlorination of seawater. *Desalination* 129:53–62.
15. Fleming LE, et al. 2006. Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 53:45–560.
16. Fitzgerald A, Syvret M, Hamilton A, Pyke M. 2011. Review for industry of reduced depuration times for the mussel *Mytilus edulis*, p. 97. Scottish Aquaculture Research Forum, Pitlochry, Scotland. <http://www.sarf.org.uk/cms-assets/documents/29383-342050.sarf066.pdf>.
17. Haas CN, Joffe J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay. *Environ. Sci. Technol.* 28:1367–1369.
18. Hernroth BE, Allard A. 2007. The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). *Int. J. Food Microbiol.* 13:296–302.
19. Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4523–4533.
20. Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE. 2009. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J. Appl. Microbiol.* 107:65–71.
21. Hsu CC, Riley LK, Livingston RS. 2007. Molecular characterization of three novel murine norovirus. *Virus Genes* 34:47–155.
22. Koopmans M, Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90:23–41.
23. Lee R, Lovatelli A, Ababouch L. 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Fisheries technical paper 511. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
24. Lee CY, Panicker G, Bej AK. 2003. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by Covalink™ NH microwell plate sandwich hybridization. *J. Microbiol. Methods* 53:199–209.
25. Letson D. 2008. Oceans and human health: human dimensions, p 91–98. *In* Walsh PJ, et al. (ed), Oceans and human health: risks and remedies from the sea. Elsevier, Burlington, MA.
26. Lim MY, Kim JM, Ko G. 2010. Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Res.* 44:3243–3251.
27. Marino A, Lombardo L, Fiorentino C. 2005. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-01, and *Enterococcus durans* by and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *J. Food Microbiol.* 99:281–286.
28. McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. 2009. Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by Taq-Man quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3379–3388.
29. Mena KD, Gerba CP. 2009. Waterborne adenovirus. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 198:133–167.
30. Nuanualsuwan S, Cliver DO. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods* 104:217–225.
31. Page MA, Shisler JL, Mariñas BJ. 2010. Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2946–2954.
32. Page MA, Shisler JL, Mariñas BJ. 2009. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Res.* 43:2916–2926.
33. Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM. 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods* 135:32–42.
34. Patel MM, et al. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1224–1231.
35. Pecson BM, Martin LV, Kohn T. 2009. 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.* 75:5544–5554.
36. Rigotto C, Sincero TC, Simões CMO, Barardi CRM. 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional PCR, nested-PCR and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res.* 39:297–304.
37. Roderick GE, Schneider KR. 1994. Depuration and relaying of molluscan shellfish, p 331–363. *In* Hackney CK, Pierson MD (ed), Environmental indicators and shellfish safety. Chapman & Hall, New York, NY.
38. Sauerbrei A, Wutzler P. 2009. Testing thermal resistance of viruses. *Arch. Virol.* 154:115–119.
39. Shah KV. 1995. Polyomaviruses, p 2027–2043. *In* Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed), Fields virology, 3rd ed. Raven Publishers, Philadelphia, PA.
40. Shin GA, Sobsey MD. 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42:4562–4568.
41. Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3979–3985.
42. Ueki Y, et al. 2007. Persistence of calicivirus in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5698–5701.
43. Warton B, Heitz A, Joll C, Kagi R. 2006. A new method for calculation of the chlorine demand of natural and treated waters. *Water Res.* 40:2877–2884.
44. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80:5104–5112.

- RESUM ESTUDI 5

**“Chlorine disinfection of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water”.**

Girones R, Carratalà A, Calgua B, Calvo M, Rodriguez-Manzano J, Emerson S.

Sotmès, Gener del 2013.

El HEV es transmet per la via fecal-oral i ocasiona casos epidèmics i esporàdics d'hepatitis aguda sovint deguts al consum d'aigua contaminada. Actualment, no hi ha dades sobre la desinfecció de HEV pel tractaments de desinfecció habituals, tot i que certs estudis han suggerit que la cloració de l'aigua de beguda podria no ser completament efectiva per a eliminar aquests virus. Per aquest motiu, cal generar informació experimental sobre les cinètiques de desinfecció del HEV davant dels processos que apliquem en el tractament de l'aigua.

En aquest estudi, s'ha avaluat la cinètica d'inactivació del HEV i dels HAdV a l'aigua per l'acció del clor. Les suspensions de HEV es van obtenir a partir de cultiu cel·lular i de mostres fecals de pacients amb hepatitis E. Les cinètiques d'inactivació del HEV i dels HAdV a l'aigua es van comparar tant en presència com en absència d'aigua residual. Els virus s'han quantificat mitjançant assajos d'immunofluorescència en cultiu cel·lular i per qPCR.

Pel que fa al HEV, les cinètiques d'inactivació obtingudes mitjançant els assajos d'infectivitat van demostrar una inactivació ràpida inicial de 2 logaritmes (el temps d'inactivació va ser d'aproximadament 1 minut) però es van detectar virus infecciosos després de 30 minuts de contacte. Mitjançant els assajos de qPCR no es va identificar una inactivació rellevant del genoma del HEV. En presència d'un 1% d'aigua residual el temps necessari per assolir una inactivació de 2 logaritmes es va incrementar fins a 10 minuts. Les cinètiques d'inactivació dels HAdV observades durant l'estudi van ser analitzats mitjançant un anàlisi F-test i van demostrar ésser equivalents a les obtingudes per al HEV.

Els resultats generats en aquest estudi són les primeres dades experimentals sobre la cinètica d'inactivació dels HEV infecciosos. S'ha demostrat que el HEV és sensible a les concentracions analitzades de clor lliure en les condicions investigades i l'efecte dràstic de la presència de baixes concentracions d'aigua residual en els processos de desinfecció.

Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water

Rosina Girones^{1,3*}, Anna Carratalà¹, Byron Calgua¹, Miquel Calvo², Jesús Rodríguez-Manzano¹, Suzanne Emerson³

¹ Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, 08028, Spain

² Department of Biostatistics, University of Barcelona, Barcelona, 08028, Spain

³ Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-8009, USA.

Corresponding author contact information: Rosina Girones, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avd. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia. Telephone number: 34-93-4021483. Fax number: 34-93-4039047. E-mail: rgirones@ub.edu

Keywords: disinfection, HEV, HAdV 2, chlorine, water, sewage.

Abstract

Experimental data on HEV chlorine disinfection in BDF water using immunofluorescence and qRT-PCR assays. HEV is inactivated by chlorine (Ct values for a 2-log reduction of 0.41, or 11.21 mg x min/l in the presence of 1% sewage) and presents equivalent kinetics to those of HAdV2.

Text

Every year there are 20 million hepatitis E infections, over three million acute cases of hepatitis E, and 70 000 hepatitis E-related deaths. The hepatitis E virus is transmitted via the faecal-oral route, principally via contaminated water (15). Chlorination is commonly applied to eliminate pathogens from water (13). Unfortunately, HEV is very inefficiently cultured and no experimental data is yet available on its susceptibility to chlorine inactivation.

Here, experiments were performed in buffered demand free (BDF) water at pH 8, treated with free chlorine residual concentrations ranging from 1-2 mg/l in order to evaluate; (a) the inactivation of HEV (from both cell culture and pooled faeces) and HAdV2 suspensions (as a comparative reference), (b) the effect of sewage (1%) on the inactivation of HEV and (c) the inactivation of HAdV2 suspensions at a higher concentrations. Both viral infectivity and genomic decay was measured in the experiments.

HEV concentrates were obtained from infected cell cultures and fecal suspensions; it is known that viral aggregation or association with organic matter may interfere with disinfection treatments (12, 13). HEV strain Sar55 suspensions were obtained in C25 cells as previously detailed (7) and HAdV2 strain (NCPV#00213) was propagated on A549 cells. Viral concentrates were prepared filtering 1-ml aliquots of cell culture medium diluted with PBS (5 ml) and ultracentrifugation during 2 hours at 237.020 xg. Finally, pellets were resuspended in 100 µl of PBS. A 10% fecal suspension of Sar55 HEV virus was prepared in PBS from feces collected from an experimentally infected rhesus macaque at Bioqual, Rockville, MD in compliance with the guidelines of both Bioqual's and NIAID'S Institutional Animal Care and Use Committee.

Infectious HEV and HAdV were quantified in triplicate during the experiments by immunofluorescence assays (IFA) as previously described (2, 6), and genomic decay was monitored using qPCR assays developed in earlier studies (5, 9).

Disinfection experiments were conducted as detailed in previous works (3, 13) with minor modifications. Experiments were conservatively designed and BDF water at a pH of 8 was used as a worst-case scenario since it is known that chlorine species present at higher pH show a lower disinfection efficacy (4, 10). A chlorine stock solution of sodium hypochlorite (Sigma-Aldrich 425044) was prepared at approximately 1000 mg/l. The experiments were performed in 4 ml and 10 ml glass reactors for HEV and HAdV respectively, at room temperature (25-26°C). Glassware used in the experiments was made chlorine demand free as previously described (13). Preliminary assays (data not shown) were used to estimate the initial chlorine concentration required to achieve residual concentrations between 1-2 mg/l after adding viral concentrates in the reactors (Table 1). Reactors without chlorine were included as controls. HEV and HAdV2 numbers in these reactors were stable in all the experiments (Figures 1, 2 and 3).

Viral suspensions were seeded to reactors containing BDF water (3,5 ml for HEV and 5,5 ml for HAdV2) and their initial concentrations (Table 1) were measured in the beginning of the experiments (time 0). Thereafter, 400- μ l samples were periodically collected (at 0,5 minutes, 10, 20, and 30 minutes) and quenched with sodium thiosulfate (0.1%). Free chlorine residual concentration in the BDF water was quantified before their addition to batch reactors and after 0,5 and 20 minutes of contact time. In order to determine C(t) values, the efficiency factor Hom (EFH) model was applied to the bench-scale results and the times needed to inactivate from 1 to 4-log of the viruses, (t_{90} , t_{99} , $t_{99,9}$ and $t_{99,99}$), were calculated (1, 8, 13). HEV and HAdV2 disinfection kinetics were compared using an F-approximate test.

HEV and HAdV2 inactivation curves followed biphasic decays (Figures 1, 2 and 3). Biphasic kinetics in chlorine treatments may be explained by the action of different chlorine species (13). It is known that viral inactivation due to chlorine might be initially associated to reactions of capsid proteins with free chlorine forms such as HOCl⁻ and in a second phase, to reactions involving secondary chlorine species as organic chloramines (4, 11).

HEV inactivation curves compared to those observed for HAdV2 are presented in Figure 1. Both viruses presented equivalent inactivation kinetics ($pval \approx 1$). Infectious HEV and HAdV2 were still detected after 30 minutes of contact time, and no significant inactivation was observed in the qPCR assays. In terms of inactivation parameters (Table 1), C(t) values to achieve 1-log viral reduction were between 0.15-0.12 mgxmin/l for HEV from both cell culture and fecal suspensions. Higher values were observed for HAdV2; 1.15 mgxmin/l for 1-log reduction and 3.90 mgxmin/l for 2-log.

The inactivation curves obtained for HEV in the presence of urban sewage (1%) from two different locations are presented in Figure 2. C(t) values increased from 0.41 to 11.12 mg x min/ l for an inactivation of 2-log. A similar reduction was observed by qPCR, showing that free chlorine at high initial concentrations (such as 23 mg /l) acts on both viral genome and proteins.

The analysis of HAdV2 allowed the use of viral suspensions at higher concentrations (7.2×10^5 FFU/ml). The obtained results (Figure 3), showed quantifiable values of HAdV2 after 60 minutes of contact time and a C(t) value of 1.65 mgxmin/l to achieve a decay of 4-log (Table 1).

It has been shown that C(t) values may increase with water pH and are variable depending on the experimental design. However, the C(t) values obtained for HAdV2 are consistent with those described in a previous work studying HAdV40 disinfection in groundwater (pH 8 to 8.2) at 15°C, ranging from 0.72 to 2.4 mgxmin/l for a 2-log reduction (13).

This work represents from the best of our knowledge the first experimental data probing the susceptibility of HEV to chlorine. This susceptibility has been previously questioned (2) and experimental data has been urgently needed to support evidence-based policy and data for action to protect water

safety and vulnerable population. The results indicate that HEV and HAdV2 present statistically equivalent inactivation kinetics.

Acknowledgments

The research described in the manuscript was partially supported by the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA and partially, by grants from the “Ministerio de Educación y Ciencia” of the Spanish Government [grant numbers AGL2008-05275-C03-01, AGL2011-30461-C02-01] and the European Commission Framework Program 7 project “Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VITAL)” [grant number KBBE 213178] led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, UK), Martin D’Agostino (FERA, UK) and Franco M. Ruggeri (ISS, Italy). Anna Carratalà and Jesús Rodríguez-Manzano were fellows of the Spanish Ministry of Science.

References

1. **Black, S., Thurston, J.A., Gerba, C.P.** 2009. Determination of Ct values for chlorine of resistant enteroviruses. *J. Environ. Sci. Health.* **44**: 336-339.
2. **Boccia D, Guthmann JP, Klovstad H, Hamid N, Tatay M, Ciglenecki I, Nizou JY, Nicand E, Guerin PJ.** High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis.* 2006 ;42(12):1679-84.
3. **Calgua, B., Monte Barardi, C.R., Bofill-Mas, S., Rodríguez-Manzano, J., Girones, R.** 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol. Methods.* **171**: 1-7.
4. **de Abreu Corrêa A, Carratalà A, Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S.** 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol.* **78**: 6450-7.
5. **Deborde M, von Gunten U.** 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res.* **42**: 13-51.
6. **Emerson, S.U., Zhang, M., Meng, X.J., Nguyen, H., St Claire, M., Govindarajan, S., Huang, Y.K., Purcell, R.H., 2001.** Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: Importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 15270–15275.
7. **Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005.** Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* **192**: 930-933.

8. **Emerson, S.U., Nguyen, H.T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., Purcell, R.H.,** 2010. Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J. Virol.* **84**: 9059-9069.
9. **Haas, C.N., Joffe, J.,** 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 1367-1369.
10. **Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K.,** 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4523-4533.
11. **Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Hill, V.R.,** 2010. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 5159-5164.
12. **Page, M.A., Shisler, J.L., Mariñas, B.J.,** 2009. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Res.* **43**: 2916-2926.
13. **Sobsey, M.D., T. Fuji, D. Battigelli, and R.M. Hall.** 1991. Inactivation of Cell Associated and Dispersed Hepatitis A Virus in water. *J. Am. Water Assoc.* **83**: 64-67.
14. **Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P.** 2003. Chlorine Inactivation of adenovirus Type 40 and feline Calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3979-3985.
15. **World Health Organisation,** 2012, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en.

FIGURE 1. Inactivation kinetics of HEV suspensions obtained from pooled feces in BDF water treated with free chlorine at 5 mg/l (initial concentration). **A.** Free chlorine decay curve in the disinfection assays using BDF water. Dots represent an average of two replicates. **B.** Log reduction curves for seeded HEV and HAdV2, as a comparative reference. Data points correspond to one experiment. **C.** Log reduction of HEV and HAdV2 infectivity. EFH model is plotted as a dotted line. The observed data are plotted as rhombuses.

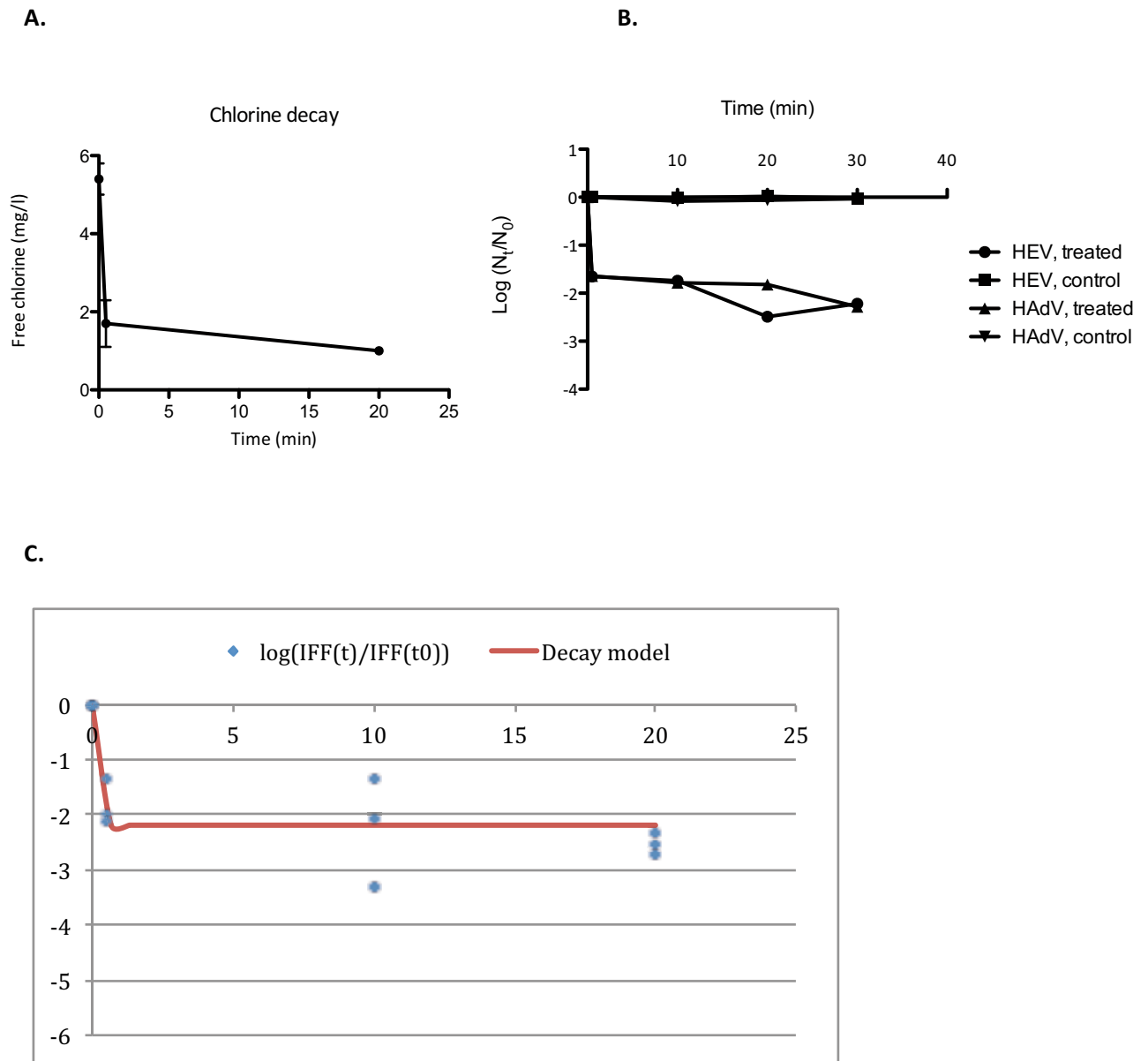


FIGURE 2. Inactivation kinetics of HEV suspensions in BDF water (with 1% of urban sewage) treated with free chlorine at 23 mg/l (initial concentration). **A.** Free chlorine decay curve in the disinfection assays using BDF water (with 1% of urban sewage). Dots represent an average of two replicates. **B.** Log reduction curves for seeded HEV. Each data point corresponds to an average of two independent experiments.

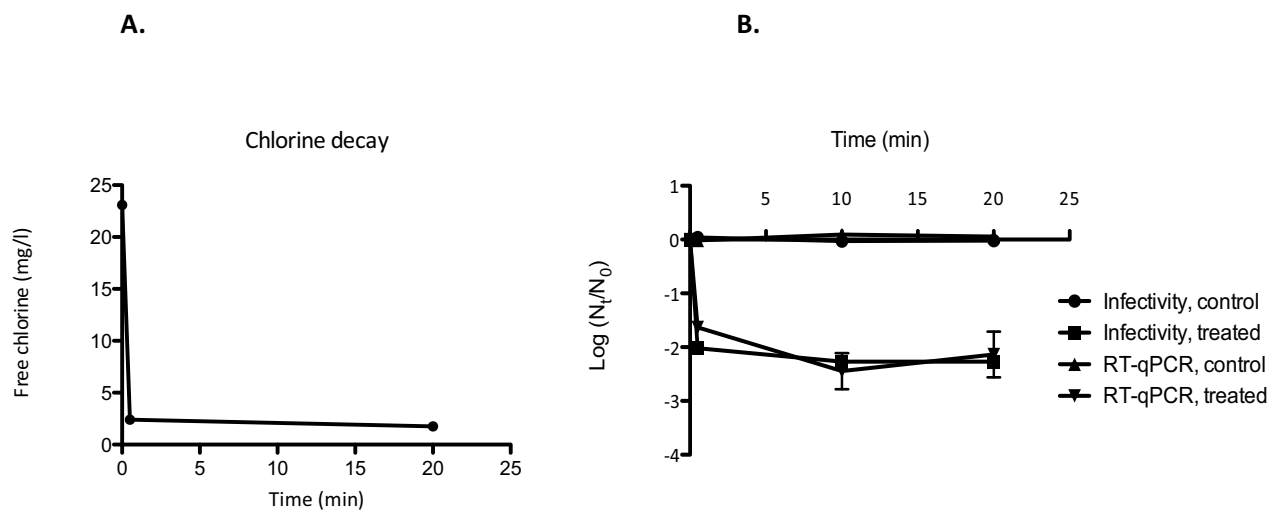
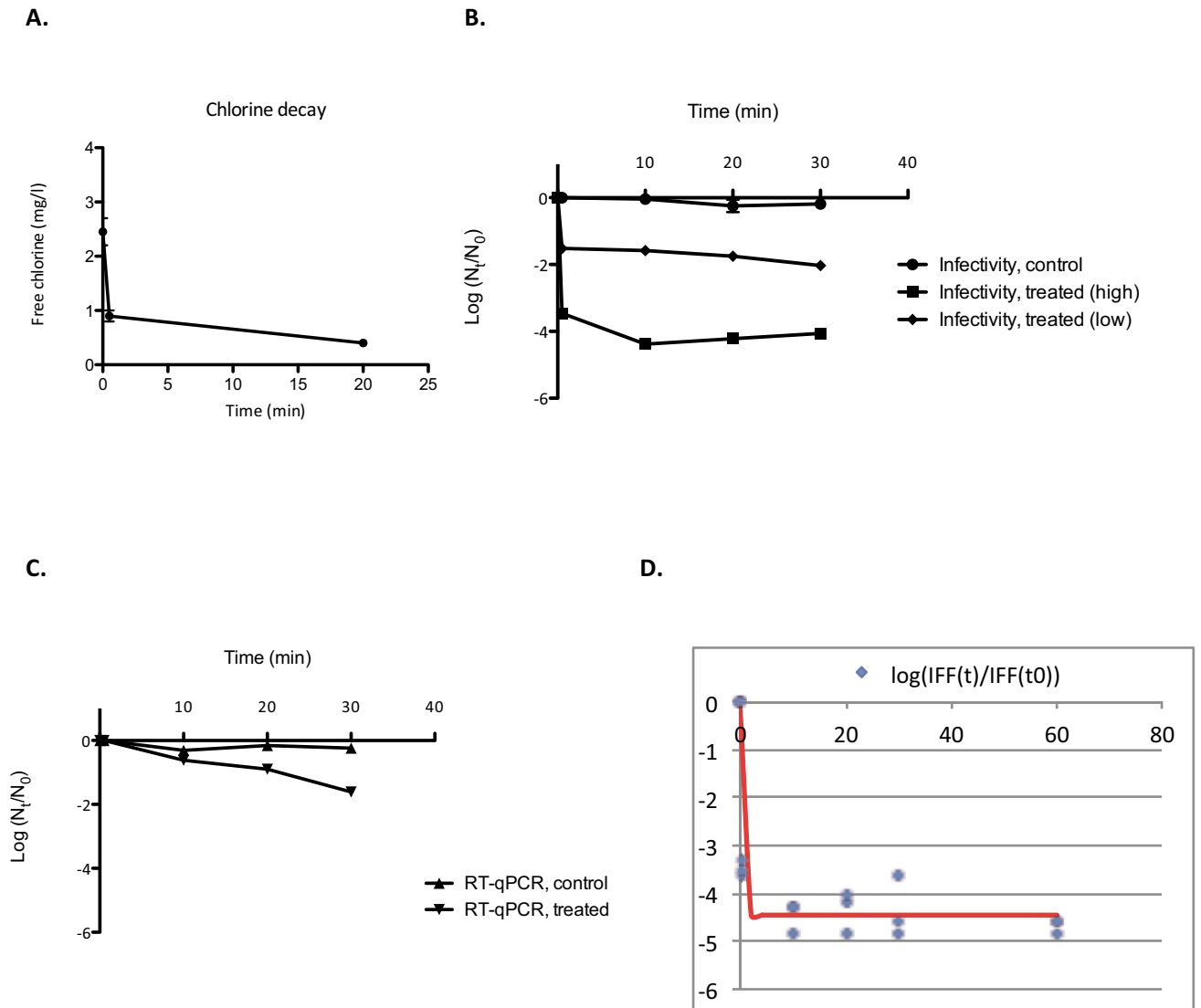
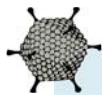


FIGURE 3. Inactivation kinetics of HAdV2 suspensions at different initial concentrations in BDF water treated with free chlorine at 2.5 mg/l (initial concentration). **A.** Free chlorine decay curve in the disinfection assays. Dots represent an average of two replicates. **B.** Log reduction curves for HAdV2 infectivity seeded at different initial concentrations of X (high) and Y (low). Data points correspond to one experiment. **C.** Log reduction curves for HAdV2 as measured by qPCR. Data points correspond to one experiment. **D.** Log reduction of HAdV2 infectivity. EFH model is plotted as a dotted line. The observed data are plotted as rhombuses.



- RESUM ESTUDI 6



“Inactivation of JC polyomavirus and human adenoviruses exposed to ultraviolet radiation as measured by infectivity and qPCR assays”.

Byron Calgua, Anna Carratalà, Laura Guerrero, Adriana de Abreu Corrêa, Tamar Kohn, Regina Summer, Rosina Girones.

Manuscrit en preparació.

L'ús de la radiació UVC de baixa pressió és un sistema molt utilitzat en la desinfecció d'aigua residual o d'aigua de beguda. No obstant, hi ha evidències que indiquen que certs virus amb genoma d'ADN poden ser molt resistents a aquests tractaments. Fins avui, no es disposa d'informació sobre la eficàcia dels tractaments de desinfecció amb llum UVC sobre els JCPyV. En aquest estudi, s'avalua les cinètiques d'inactivació dels JCPyV i dels HAdV, com a indicadors de contaminació fecal, dels bacteriòfags MS2 com a referència, i dels norovirus humans com un dels principals patògens transmesos pel consum d'aigua. Les dosis de llum UVC utilitzades van ser: 0, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 i 1400 J/m². La quantificació dels virus es va dur a terme mitjançant assajos d'immunofluorescència i de qPCR, amb o sense un pretractament enzimàtic per a aproximar els resultats de QPCR als observats als assajos d'infectivitat.

A partir dels resultats obtinguts, es va identificar una reducció dels HAdV2 de 2,14 logaritmes després de ser exposats a una dosi de UVC de 1400 J/cm². Pel que fa als JCPyV, la reducció observada va ser lleugerament inferior, 1,71 logaritmes, mentre que la inactivació observada per als bacteriòfags MS2 va assolir els 4 logaritmes al final de l'experiment. Als assajos de qPCR, les suspensions virals tractades o no tractades amb una digestió enzimàtica van presentar cinètiques semblants, i en els dos casos es va assolir una reducció inferior a un logaritme. Una reducció semblant es va identificar per a una soca de NoV GII mitjançant assajos de qPCR. Es va avaluar l'aplicació de models matemàtics per a aproximar la quantificació mitjançant tècniques moleculars de qPCR a la quantificació de partícules víriques infeccioses.

En conclusió, aquest estudi representa els primers resultats experimentals de la inactivació dels JCPyV tractats amb radiació UVC i, s'ha demostrat que la dosi de UVC habitualment utilitzada (1400 J/m²) no és suficient per assolir la inactivació recomanada de 4-log de certs virus patògens amb genoma ADN, com és el cas dels HAdV i JCPyV.

Inactivation of JC polyomavirus, human adenoviruses and noroviruses exposed to ultraviolet radiation as measured by infectivity and qPCR assays.

Byron Calgua^a, Anna Carratalà^a, Laura Guerrero^a, Adriana de Abreu Corrêa, Regina Summer^b and Rosina Girones^{a*}.

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

*Author for correspondence: Prof. Rosina Girones, Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Telephone number: (+34) 93 402 1483. Fax number: (+34) 93 403 9047. E-mail: rgirones@ub.edu

Running Title: UVC inactivation of JC polyomaviruses, human adenoviruses and noroviruses.

Abstract

A minor decay of two logs was achieved for both JCPyV and HAdV exposed to a UVC dose of 1400 J/cm², while a decay of 4-log was observed for MS2 bacteriophages. QPCR assays were further performed to identify damages in HAdV, JCPyV and also NoV genomes. Overall, these results show the high doses inefficacy of UVC requested for the inactivation of the DNA viruses analyzed.

Keywords: JC polyomavirus, adenovirus, UV inactivation.

Text

Water has been widely related to the transmission of viral infectious diseases (ter Waarbeek et al. 2010; Riera-Montes et al. 2011; Nenonen et al. 2012). Severe outbreaks have been caused even by water accomplishing current legislations, mainly based on bacteriological parameters (Gerba et al. 1979; Lipp et al. 2001). Thus, the use of alternative indicators has been suggested. Human adenovirus (HAdV) and JC Polyomaviruses (JCPyV) are of particular interest because of their high prevalence in the environment and their stability to disinfection treatments (Tree et al. 2003; Sirikanchana et al. 2008; Rodriguez-Manzano et al. 2012). They are non-enveloped DNA viruses with icosahedral symmetry, excreted specifically by human populations and detected in almost 100% of sewage samples (Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2006; Rodriguez-Manzano et al. 2012).

Disinfection by low-pressure monochromatic ultraviolet (UV) radiation (253.7 nm) is a common procedure applied to sanitize wastewater and drinking water, and is efficient against microorganisms resistant to chlorine treatments, such as *Cryptosporidium* and *Giardia* oocysts (Hijnen et al. 2006). However, it has been previously shown that certain DNA-viruses may be highly resistant to UVC radiation (Thompson et al. 2003; Mena and Gerba, 2009). To date, there is no information available regarding the efficacy of UVC against JCPyV, and the resistance of HAdV2 is not well characterized. Here, we evaluate the inactivation kinetics of infectious JCPyV and HAdV, as viral indicators of human fecal contamination, MS2 as a comparative reference, and noroviruses as a major waterborne pathogen by qPCR analysis, after the exposition of increasing doses of UVC (253.7 nm).

The studied viruses were produced infecting cell lines A549, and SVG-A with suspensions of HAdV-2, and JCPyV (Mad-4) respectively. NoV GGII were purified from stool samples. All viral suspensions were treated to avoid the formation of viral aggregates that may interfere on disinfection treatments. The disaggregation was achieved by diluting the suspensions with glycine buffer 0,25 N, pH 9,5 (1:2 v/v), and mixing 30 min at 4° C. Finally, the viruses were concentrated by ultracentrifugation at 100.000 x g for 1 h and the pellet dissolved in phosphate buffer pH 7,5 (1:2, v/v of Na₂HPO₄ 0.2 M and NaH₂PO₄ 0.2 M). Dispersion of viral particles was confirmed by electronic microscopy observation.

Viral suspensions were irradiated with different low-pressure UVC (253.7 nm) fluences (0, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 and 1400 J/m²). For each UV dose, three 25 mL-aliquots with initial viral concentrations of 10⁶ focus forming units (FFU)/mL were used. As a control of UV process, a solution with MS2 was also irradiated with the same conditions, and infectious viral particles were quantified as detailed in a previous study (Mamane-Gravetz et al. 2005). Quantitation of infectious

HAdV2 and JCPyV was performed in triplicate by an immunofluorescence assay (IFA) as described in previous studies (Calgua et al. 2011) and FFU were quantified in blinded lectures. In addition, viral suspensions were quantified in duplicate with and without a pretreatment based on a DNase digestion (Sigma-Aldrich) performed prior to nucleic acid extraction to remove any free DNA. Viral nucleic acids were extracted (QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen, Valencia, CA) and quantified by qPCR assays as described in previous studies (Hernroth et al. 2002).

As it is shown in the electronic micrograph of Figure 1, the dispersion of viruses as compared to those undispersed was confirmed. It has been suggested that viral aggregates may produce a decrease on the viral disinfection and also an underestimation when viruses are quantified by IFA or other infectivity assays (Niewstad and Havelaar, 1994).

The obtained inactivation kinetics of HAdV, JCPyV and MS2, measured by infectivity assays, are presented in Figure 2. HAdV2 showed decay values of 2,14 logs after exposition to a UVC dose of 1400 J/cm². These results suggest that HAdV2 may be more stable during UVC treatments than previously reported (Ballester and Malley, 2004; Gerba et al. 2002, Shin et al. 2009). The higher stability described here may be due to the infectivity assay used. Immunofluorescence assays represent a very specific and sensitive infectivity method, and even viruses that have lost the capability to produce cytopathic effect or plaques can be detected. The inactivation kinetics of JCPyV, indicate a minor decay of 1,71 logs after the exposition to a UVC dose of 1400 J/cm². These results represent the first description of JCPyV (Mad-4) stability in a low-pressure UVC disinfection process. Surprisingly, the stability of JCPyV is even slightly higher than observed in the case of HAdV2. Both viruses have a double stranded DNA genome that may be repaired by host cell machinery during the viral replication cycle. In addition, JCPyV show a circular doubled-stranded super-coiled and covalently closed DNA genome associated to cellular histones. These particular characteristics of JCPyV genome may offer them further protection from UVC radiation in addition to host repairing. The MS2 bacteriophage inactivation observed in this study is equivalent to the inactivation observed in other previous studies (Pecson et al. 2009), and a decay of 4 logs was achieved at the end of the experiment.

In the last years, some approaches have been developed to quantify viable viral particles using qPCR (reviewed in Rodriguez et al. 2009) but any of these has risen yet as a suitable alternative. However, enzymatic pretreatments performed before qPCR analysis (ET-qPCR) may be the most promising. Here, the obtained results show that viral suspensions treated with or without DNase presented equivalent inactivation kinetics, with less than one log of inactivation, after the exposition to a UVC fluence of 1400 J/m² (Figure 3). In order to approximate viral quantifications measured with

qPCR analysis to those obtained by infectivity assays, mathematical models have been applied by determining the proportionality between the qPCR and infectivity results. For JCPyV, the equation obtained is $C/C_0 = (PCR/PCR_0)^{4.8 \pm 0.9}$.

A slight decay of human noroviruses of 0.5 logs was identified as measured by qPCR. Other authors have previously characterized the particular UVC inactivation mechanisms. In this study both capsid damages and the inhibition of genome injection and replication were shown (Wigginton et al. 2012).

In conclusion, this work provides the first experimental data on JCPyV stability during UVC treatments. It has been shown UVC doses of 1400 J/m^2 are not able to achieve a 4-log inactivation of DNA viruses, such as HAdV and JCPyV. In order to improve UV disinfection processes against contaminant viruses in water, further studies need to be developed to characterize the inactivation kinetics of these viruses exposed to higher doses of UVC.

Acknowledgements

This work was supported in part by the European Commission Framework Program 7 project “Integrated monitoring and control of foodborne viruses in European food supply chains (VITAL)” (Grant No. KBBE 213178) led by the coordination team of Nigel Cook (FERA, UK), Martin D’Agostino (FERA, UK) and Franco M Ruggeri (ISS, Italy), and in part by project AGL2008-05275-C03- 01/ALI “Integrated risk analysis related to the consumption of pathogenic viruses present in water and food” funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation. During the development Anna Carratalà was a fellowship of the Spanish Ministry of Science and Innovation. We thank the Serveis Científico-Tècnics and the Camps Experimentals of the University of Barcelona for their help during the microscopy-based quantitations.

References

1. Ballester NA, Malley JP. 2004. Sequential Disinfection of adenovirus type 2 with UV-Chlorine-Chloramine. *Journal American Water Works Association*. 96(10): 97-103.
2. Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *App Environ Micro*. 72(12):7894-7896.
3. Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. 2011. Detection and quantitation of infection human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J. Virol Methods*. 171(1):1-7.
4. Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am.J. Public Health*. 69:1116-1119.
5. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol*. 68(10):5167-9.
6. Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002. 68: 4523-33.
7. Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res*. 40(1):3-22.
8. Lipp EK, Farrah SA; Rose JB. 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar. Pollut. Bull*. 42:286-293.
9. Mamane-Gravetz H, Linden KG, Cabaj A, Sommer R. 2005. Spectral sensitivity of *Bacillus subtilis* spores and MS2 coliphage for validation testing of ultraviolet reactors for water disinfection. *Environ Sci Technol*. 15;39(20):7845-52.
10. K.D. Mena and C.P. Gerba, *Ver. Environ. Contam. Toxicol*, 2009, **198**, 133.
11. Nenonen NP, Hannoun C, Larsson CU, Bergström T. 2012. Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78(6): 1846-52.

12. Nieuwstad TJ, Havelaar AH. 1994. The kinetics of batch ultraviolet inactivation of bacteriophage-MS2 and microbiological calibration of an ultraviolet pilot-plant. *J Environ Sci Health A*. 29(9), 1993-2007.
13. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3376-3382.
14. Pecson BM, Valério-Martin L, Kohn, T. 2009. 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.* 68: 5544-54.
15. Riera-Montes M, Brus Sjölander K, Allestam G, Hallin E, Hedlund KO, Löfdahl M. 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol Infect.* 139(12): 1928-35.
16. Rodríguez RA, Pepper IL, Gerba CP. 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 75(2):297-307.
17. Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R. 2012. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.* 66(12):2517-23.
18. Shin GA, Lee JK, Linden KG. 2009. Enhanced effectiveness of medium-pressure ultraviolet lamps on human adenovirus 2 and its possible mechanism. *Water Sci Technol.* 60(4):851-7.
19. Sirikanchana K, Shisler JL, Mariñas BJ. 2008. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. *Water Res.* 42(6-7): 1467-74.
20. ter Waarbeek HL, Dukers-Muijrs NH, Vennema H, Hoebe CJ. 2010. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J Clin Virol.* 47(3): 268-72.
21. Thompson, S. S., J. L. Jackson, M. Suva-Castillo, W. A. Yanko, Z. El Jack, J. Kuo, C. L. Chen, F. P. Williams, and D. P. Schnurr. 2003. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ. Res.* 75:163–170.

22. Tree JA, Adams MR, Lees DN. 2003. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl Environ Microbiol.* 69(4): 2038-43.
23. Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol.* 6; 46(21): 12069-78.

Figure 2. Inactivation kinetics of HAdV2, JCPyV and MS2 analyzed using infectivity assays.

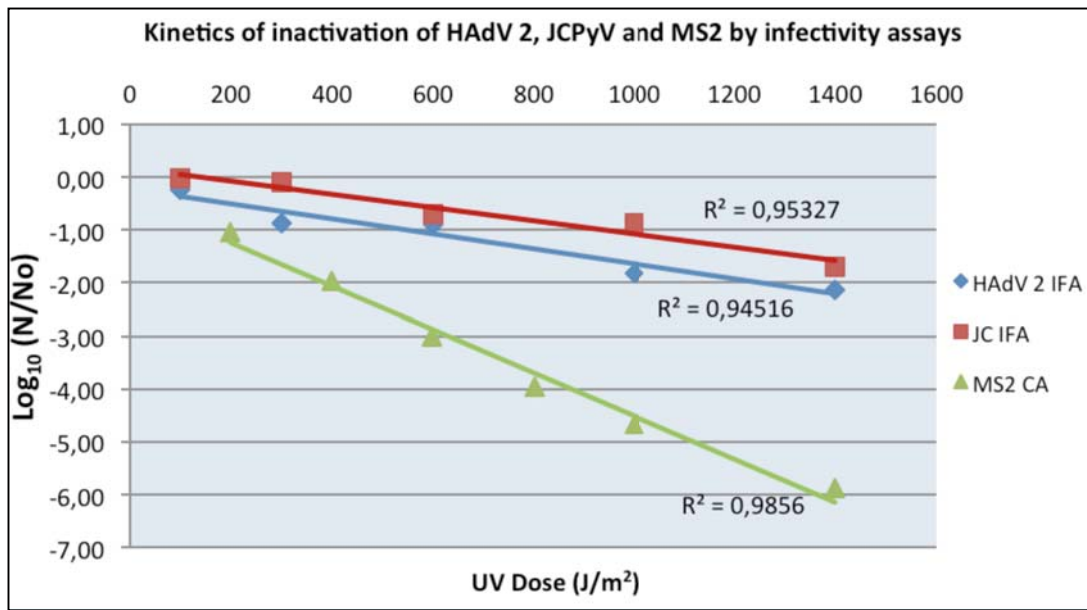
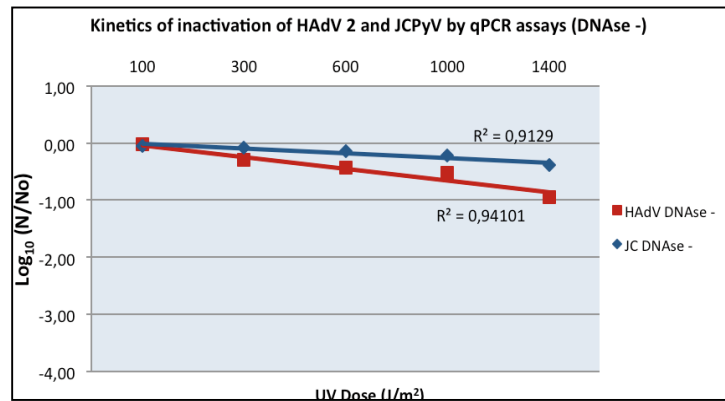


Figure 3. Inactivation kinetics of HAdV2 and JCPyV analyzed using qPCR assays. A) With no enzymatic pre-treatment. B) Pre-treated with DNase.

A)



B)

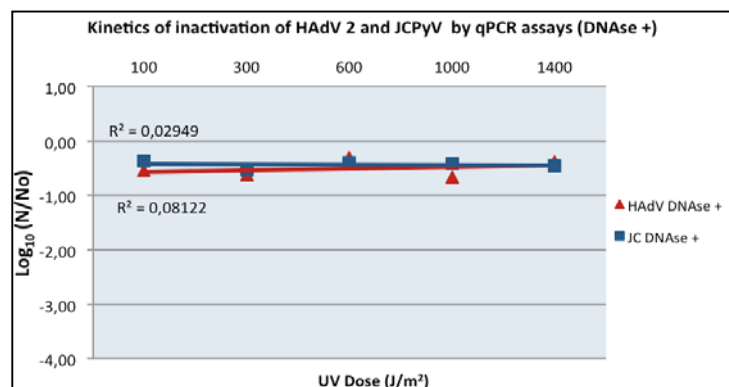
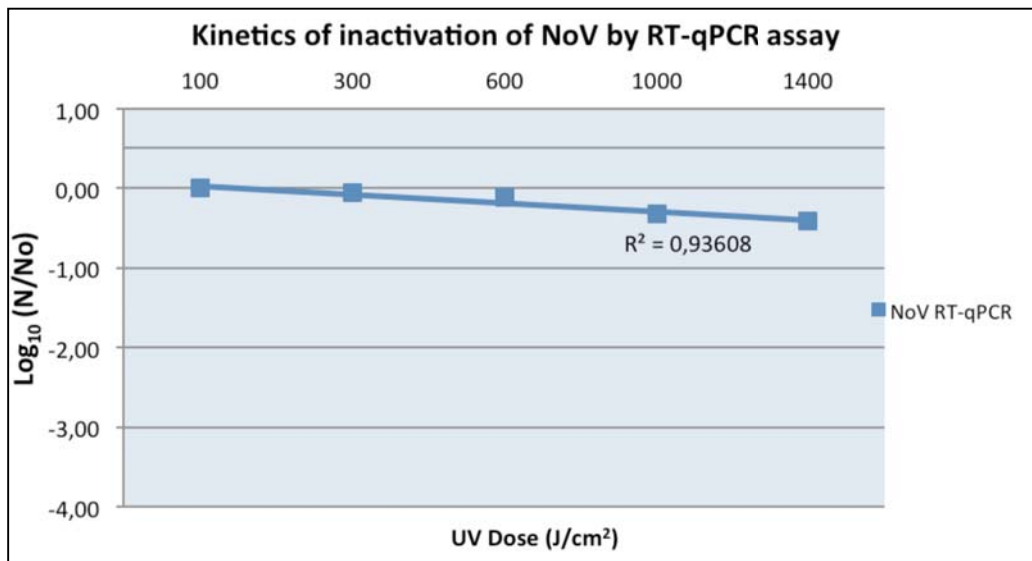


Figure 4. Inactivation kinetics of NoV measured using RT-qPCR assays.

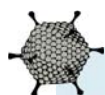




CAPÍTOL 3

**Desenvolupament d'un nou indicador
víric de contaminació fecal d'aviram**

- RESUM ESTUDI 7



“A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment”.

Carratalà A, Rusiñol M, Hundesa A, Biarnes M, Vantarakis A, Kern A, Suñen E, Girones R, Bofill-Mas S.

Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78(20): 7496-9.

Les poblacions animals poden actuar com a reservoris de patògens humans facilitant la seva transmissió. Per tant, és molt important disposar d'eines que ens permetin identificar les fonts de la contaminació fecal d'origen animal potencialment presents al medi, amb l'objectiu d'assegurar la qualitat de l'aigua, avaluar-ne els riscos per a la salut pública i implementar estratègies de remediació efectives. Tot i la importància de l'aviram a moltes àrees geogràfiques, els indicadors de contaminació fecal d'aus disponibles són limitats i la seva especificitat és, en alguns casos, dubtosa.

En aquest estudi, s'ha desenvolupat tècniques moleculars per a la detecció i quantificació dels parvovirus de pollastre/gall d'indi en mostres ambientals i s'ha avaluat l'ús d'aquests virus per a traçar la contaminació fecal originada per aviram al medi. Amb aquest objectiu, es va dissenyar dos assajos de nPCR, amplificant les regions no estructural i VP1/VP2, i un assaig de qPCR, amplificant la regió VP1/VP2. L'especificitat dels mètodes dissenyats es va estudiar analitzant un ampli ventall de mostres diferents; femtes d'ànecs, gavines i porcs, aigua residual d'escorxadors de porc i aigües residuals exclusivament humanes, entre altres. En tots els casos es van obtenir resultats negatius.

Aplicant els mètodes desenvolupats, els parvovirus de pollastre/gall d'indi es van detectar en el 73% de mostres de femtes de pollastre de diferents àrees geogràfiques amb una concentració mitjana de 9.07×10^8 cg/g. Concentracions elevades de Ch/Tu PaV també es van detectar en mostres d'aigua residual d'escorxadors de pollastre i en mostres d'aigua residual urbana recollida a la mateixa localitat. Pel contrari, les mostres d'aigua residual urbana recollides en àrees on no es va poder identificar granges o escorxadors d'aviram properes, van ser negatives.

Els assajos desenvolupats han demostrat ser útils per a una detecció i quantificació sensible i específica de la contaminació fecal originada per aviram, així com per avaluar la seva disseminació a partir de les principals fonts de contaminació (granges i escorxadors) fins a altres compartiments del seu entorn.

A Novel Tool for Specific Detection and Quantification of Chicken/Turkey Parvoviruses To Trace Poultry Fecal Contamination in the Environment

Anna Carratalà,^a Marta Rusinol,^a Ayalkibet Hundesa,^a Mar Biarnes,^b Jesus Rodriguez-Manzano,^a Apostolos Vantarakis,^c Anita Kern,^d Ester Suñen,^e Rosina Girones,^a and Sílvia Bofill-Mas^a

Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain^a; Poultry Health Center of Catalonia and Aragón, Tarragona, Spain^b; Department of Public Health, Medical School, University of Patras, Patras, Greece^c; Department of Water Microbiology, National Institute for Environmental Health, Budapest, Hungary^d; and Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of Basque Country, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain^e

Poultry farming may introduce pathogens into the environment and food chains. High concentrations of chicken/turkey parvoviruses were detected in chicken stools and slaughterhouse and downstream urban wastewaters by applying new PCR-based specific detection and quantification techniques. Our results confirm that chicken/turkey parvoviruses may be useful viral indicators of poultry fecal contamination.

Animal populations can serve as reservoirs for human pathogens and may facilitate transmission of those crossing the species barrier. Therefore, the origin of animal fecal contamination must be identified and tracked to monitor water quality, assess potential health risks, and determine optimal remediation strategies. In particular, poultry farming is an industry that produces a large volume of different by-products occasionally used as manure to fertilize crops, which can introduce pathogens into the surrounding environment and into the food chain (1, 5, 8). However, until recently, there had been little effort to develop suitable techniques to characterize the origin of avian fecal contamination (2, 13, 17).

Bacterial fecal indicators often fail to predict the presence of pathogenic microorganisms in water and food (7). Thus, viruses have emerged as a promising tool to increase water quality standards, due to their high host specificity and stability in different environments (9, 11, 14, 20, 21).

The high levels of prevalence of parvovirus in chickens (ChPV) and turkeys (TuPV) in different countries (3, 18, 19, 23, 24) and the high level of stability of animal parvovirus (15, 22) have been described. Here, the potential role of ChPV/TuPV as a new tool for microbial source tracking was evaluated by developing nested and also quantitative PCR-based assays for the detection and quantification of ChPV/TuPV in environmental samples.

All sequences available in GenBank for ChPV and TuPV were aligned, and two nested PCR (nPCR) assays, targeting the non-structural and VP1/VP2 regions, and a quantitative PCR (qPCR), targeting the VP1/VP2 regions, were optimized (Table 1).

A total of 30 chicken fecal pools were collected from different farms in Catalonia (coastal Northeast Spain), the Basque Country (Northern Spain), Patras (Greece), and Budapest (Hungary) between February and December 2010. Three turkey, 2 partridge, and 7 hen pooled fecal samples collected from farms in Catalonia were also tested. All samples were collected from the ground and distributed into sterile 50-ml polyethylene containers that were kept at 4°C for less than 24 h prior to the analysis. Viral particles were concentrated from 250 mg of fecal material that was homogenized by vortexing with 2.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) during 2 min and centrifuged at 3,000 × g for 15 min, after

Received 21 April 2012 Accepted 7 August 2012

Published ahead of print 17 August 2012

Address correspondence to Rosina Girones, rgirones@ub.edu.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01283-12

TABLE 1 Oligonucleotide primers used for the detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses

Primers	Genome region ^a	Position ^b	Amplification reaction	Amplicon size (bp)	Annealing temp (°C)	Sequence (5'–3')
Par1	NS	661–682	First	412	53	GGTACAAGATATGCTAGATTTG
Par2		1053–1073				CGGATGGCTAAATTATCATCT
Par3		718–739	Nested	325	53	CCATCGCAGGAATTAACCTCCAG
Par4		1022–1043				GTGTCAACATCTCCATGTATTG
VP-Par1	VP1/VP2	3119–3140	First	373	56	TGGAATTGTGATACTATATGGG
VP-Par2		3473–3492				TCYTGATCTGCAAATATTG
VP-Par3		3173–3196	Nested	249	64	CATTGTGTCTGTCTWATGCGTGAC
VP-Par4		3405–3422				GTTTTCTGGATGACTTGCA
Q-PaV-F	VP1/VP2	3326–3345	qPCR	81	60	AGTCCACGAGATTGGCAACA
Q-PaV-R		3388–3407				GCAGGTTAAAGATTTTCACG
Q-PaV-Pr		3356–3378				6FAM-AATTATTCGAGATGGCGCCACG-BHQ1

^a NS, nonstructural protein 1; VP1, virion protein 1; VP2, virion protein 2.

^b The sequence positions are with reference to accession number GU214706 from GenBank.

TABLE 2 Detection of chicken/turkey parvoviruses in avian feces and in environmental samples by nPCR of the NS region

Source of sample	No. of positive samples/total no. of samples	% positive
Chicken feces	22/30	73
Catalonia	8/10	80
Basque Country	2/7	29
Greece	6/7	86
Hungary	6/6	100
Hen feces	5/7	72
Turkey feces	3/3	100
Partridge feces	1/2	50
Duck feces	0/17	0
Seagull feces	0/25	0
Chicken slaughterhouse raw wastewater	5/5	100
Chicken slaughterhouse treated wastewater	4/5	40
Urban raw wastewater with poultry industry effluents	4/9	44
Urban raw wastewater without poultry industry effluents	0/11	0
Urban treated wastewater	0/5	0
Urban biosolids	3/4	7

which the supernatant was recovered and kept at -80°C until the nucleic acid extraction was performed.

The presence of ChPV/TuPV was also evaluated in chicken slaughterhouse raw and effluent wastewater samples (5 samples of each) and in raw and treated urban sewage (9 and 5 samples, respectively), as well as in biosolids (4 samples) from a sewage treatment plant (STP) located downstream from the slaughterhouse to prove a potential route of dissemination of these viruses into the environment. Also, 11 raw sewage samples from an STP from an area with no poultry industry were analyzed.

Viral particles were concentrated as described in previous studies (4). Nucleic acids from all viral concentrates were extracted by using the QIAmp viral RNA kit (QIAGEN, Inc.) using the QIAcube automated platform.

nPCR assays based on the NS region were performed in 50- μl reaction mixtures containing $1 \times$ Gold buffer, 50 mM MgCl_2 , 25 mM each deoxynucleoside triphosphate, 10 μM each primer (Table 1), 2 U of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Inc.), and 10 μl of DNA sample. For the nested amplification, 49- μl reaction mixtures were prepared identically and 1 μl of the first-round PCR product was added. nPCR assays targeting the VP1/VP2 regions were prepared in the same way except that all primers were used at a concentration of 25 μM (Table 1).

qPCR amplifications were performed in a 25- μl reaction mixture containing 10 μl of DNA sample and 15 μl of TaqMan environmental PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.3 μM forward primer, 0.9 μM reverse primer, and 0.25 μM fluorogenic probe (Table 1). qPCR standards were generated and

used as previously described (10, 12). In our assays, the average R^2 value was 0.996 ± 0.003 , and the slope values ranged between -3.164 and -3.417 (mean value, -3.297). The estimated mean efficiency of the assay was 97.4%.

The specificity of the assays was studied by testing a wide selection of samples: 3 raw porcine and 3 bovine slaughterhouse sewage samples, 9 pooled duck fecal samples of *Anas platyrhynchos* and 8 of *Cairina moschata*, 14 seagull samples of *Larus michahellis* and 11 of *Larus audouinii*, 2 feline parvovirus attenuated vaccines (Fecell 4 [Pfizer] and PureVax RcPch FelV), 1 canine parvovirus attenuated vaccine (Eurican CHPP12-LR), and porcine parvovirus viral particles obtained by cell culturing. Raw hospital sewage samples containing exclusively human fecal/urine contamination and serum samples containing human parvovirus B19 were also tested. None of the samples tested provided amplification with any of the assays developed.

ChPV/TuPV were detected in 73% of pooled chicken stool samples from the different geographical areas tested, with a mean value of 9.07×10^8 genome copies (GC)/g. No differences in the percentages of positive samples attributable to the number of animals represented in the pooled samples or to the geographic origin were observed. The viruses were also detected in turkey and partridge feces. All chicken slaughterhouse raw wastewater samples and 80% of slaughterhouse treated wastewater tested positive. The mean concentration of the virus in raw wastewater obtained from the slaughterhouse was 4.63×10^5 GC/ml. Forty-four percent of downstream raw urban sewage samples and 75% of the biosolids produced in this STP tested positive, with mean values of 2.65×10^2 GC/ml and 1.29×10^5 GC/g, respectively. Interestingly, none of the samples collected in a STP in an area that was not identified as receiving effluent from the poultry industry tested positive by the assays developed here (Tables 2 and 3).

Nucleotide sequences were obtained from VP1/VP2 nPCR assay amplicons and compared to sequences already available in GenBank (6). Intrasample variability ranging from 96.4 to 100% was observed by cloning one of the amplicons obtained and studying the sequences of 9 clones.

Phylogenetic analysis showed that the sequence grouping could not be associated with geographical origin or sample type. All sequences studied were similar to previously reported sequences, with similarity values ranging between 85 and 100% (Table 4).

The assays designed here have proved to be useful for the specific detection and quantification of poultry fecal contamination, for evaluating their dissemination within the environment, and for discriminating poultry pollution from many other sources of fecal contamination potentially present in urban wastewater. Further studies for determining the presence of ChPV/TuPV in environmental samples susceptible of receiving poultry contamination via polluted water or as a consequence of the application of polluted biosolids may be conducted by applying the tools developed here.

TABLE 3 Quantification of chicken/turkey parvoviruses in different types of environmental samples

Type of sample	No. of samples	% positive	Mean value	Range
Chicken feces	21	81	9.07×10^8 GC/g	1.97×10^2 – 1.07×10^{10} GC/g
Slaughterhouse raw wastewater	3	100	4.63×10^5 GC/ml	1.90×10^5 – 8.14×10^5 GC/ml
Urban raw wastewater	2	50	2.65×10^2 GC/ml	2.65×10^2 GC/ml
Urban biosolids	2	100	1.29×10^5 GC/g	1.07×10^5 – 1.51×10^5 GC/g

TABLE 4 Typification and diversity of the chicken/turkey parvovirus strains identified by sequencing the amplicons obtained from the analyzed samples

Sample (GenBank accession no.)	Type of sample	Geographic origin	Genomic region ^a	% similarity to indicated virus ^b (geographic origin)
CT-Par1 (JX434399)	Turkey feces	Catalonia	NS	97, TuPV 1078 (USA)
CT-Par2 (JX434400)	Chicken feces	Catalonia	NS	95, TuPV 260 (USA)
CT-Par3 (JX434401)	Chicken feces	Catalonia	NS	95, TuPV 260 (USA)
CT-Par4 (JX434402)	Chicken feces	Catalonia	NS	95, TuPV 260 (USA)
CT-Par5 (JX434403)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	NS	97, TuPV 260 (USA); 96, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par6 (JX434404)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	NS	96, TuPV 260 (USA); 96, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par7 (JX434405)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	NS	98, ChPVABU-P1 (Hungary); 97, TuPV 260 (USA)
CT-Par8 (JX434406)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	NS	94, TuPV 260 (USA); 93, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par9 (JX434407)	Urban sewage	Catalonia	NS	97, ChPVABU-P1 (Hungary); 97, TuPV 260 (USA)
CT-Par10 (JX434408)	Urban sewage	Catalonia	NS	98, ChPVABU-P1 (Hungary); 97, TuPV 260 (USA)
CT-Par11 (JX434409)	Urban sewage	Catalonia	NS	98, ChPVABU-P1 (Hungary); 97, TuPV 260 (USA)
CT-Par12 (JX434410)	Chicken feces	Hungary	NS	94, TuPV 260 (USA); 94, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par13 (JX434411)	Chicken feces	Hungary	NS	93, TuPV 260 (USA); 92, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par14 (JX434412)	Chicken feces	Hungary	NS	94, TuPV 260 (USA); 93, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par1 (JX434386)	Turkey feces	Catalonia	VP1/VP2	98, TuPV 1078 (USA)
CT-Par7 (JX434387)	Chicken feces	Catalonia	VP1/VP2	97, TuPV 260 (USA); 97, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par8 (JX434388)	Chicken feces	Catalonia	VP1/VP2	95, TuPV 260 (USA); 95, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par9 (JX434389)	Chicken feces	Catalonia	VP1/VP2	94, TuPV 260 (USA); 94, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par10 (JX434390)	Chicken feces	Catalonia	VP1/VP2	95, TuPV 260 (USA); 95, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par11 (JX434391)	Chicken feces	Catalonia	VP1/VP2	95, TuPV 260 (USA); 95, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par12 (JX434392)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	VP1/VP2	98, ChPVABU-P1 (Hungary)
CT-Par14 (JX434393)	Slaughterhouse sewage	Catalonia	VP1/VP2	99, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par15 (JX434394)	Chicken feces	Basque Country	VP1/VP2	99, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par16 (JX434395)	Chicken feces	Basque Country	VP1/VP2	99, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par17 (JX434396)	Chicken feces	Greece	VP1/VP2	99, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par18 (JX434397)	Chicken feces	Greece	VP1/VP2	99, ChPV ABU-P1 (Hungary)
CT-Par19 (JX434398)	Chicken feces	Hungary	VP1/VP2	100, ChPV ABU-P1 (Hungary)

^a NS, nonstructural protein; VP1, virion protein 1; VP2, virion protein 2.

^b ChPVABU-P1, chicken parvovirus ABU-P1 (GenBank accession number GU214704.1); TuPV 260, turkey parvovirus 260 (GU214706.1); TuPV 1078, turkey parvovirus 1078 (GU214705.1).

ACKNOWLEDGMENTS

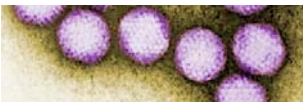
The research described in the manuscript was supported by the Ministry of Education and Science of the Spanish government (AGL2008-05275-C03-01) and a collaborative European project coordinated by David Kay and Peter Wyn-Jones from the University of Aberystwyth, United Kingdom (VIROCLIME, contract no. 243923). During the development of this study, Anna Carratalà was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Science.

We are thankful to Elisabet Arantegui, Núria Vidal, and Anna Bofill for their assistance in the sampling of sewage from hospitals and to Marta Cerdà for her assistance in the sampling of seagull feces. We thank Juan Bécares and Marina Rodríguez for providing seagull and duck fecal samples and Susana Guix and Annika Allard for providing porcine parvovirus and parvovirus-positive human serum samples, respectively. We are also grateful to Eva Torrecillas and Fernando Cabello for their help in the sampling of urban wastewater. Finally, we thank the Serveis Científico-Tècnics of the University of Barcelona for their efficient sequencing services and the Agència Catalana de l'Aigua (ACA) for kindly providing wastewater samples from one of their wastewater treatment facilities.

REFERENCES

- Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. 1997. Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 3:285–293.
- Baker-Austin C, Rangdale R, Lowther J, Lees DN. 2010. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Sci. Technol.* 61:1–7.
- Bidin M, Lojkić I, Bidin Z, Tiljar M, Majnarić D. 2011. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia. *Avian Dis.* 55:693–696.
- Bofill-Mas S, et al. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7894–7896.
- Carter MJ. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* 98:1354–1380.
- Day JM, Zsak L. 2010. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. *Virology* 399:59–64.
- Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am. J. Public Health* 69:1116–1119.
- Guan Y, et al. 2000. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 74:9372–9380.
- Hernroth BE, Condén-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4523–4533.
- Hundesda A, et al. 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J. Virol. Methods* 163:385–389.
- Hundesda A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R. 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7886–7893.
- Hundesda A, et al. 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Methods* 158:130–135.
- Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. 2010. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109:539–547.
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesda A, Martin M, Girones R. 2004. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1448–1454.
- Mani B, et al. 2007. Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion* 47:1765–1774.

16. Reference deleted.
17. Muniesa M, Payan A, Moce-Llivina L, Blanch AR, Jofre J. 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* **43**: 1559–1564.
18. Palade EA, et al. 2011. High prevalence of turkey parvovirus in turkey flocks from Hungary experiencing enteric disease syndromes. *Avian Dis.* **55**:468–475.
19. Palade EA, et al. 2011. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian Pathol.* **40**:191–197.
20. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3376–3382.
21. Rzesutka A, Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:441–453.
22. Sauerbrei A, Wutzler P. 2009. Testing thermal resistance of viruses. *Arch. Virol.* **154**:115–119.
23. Tarasiuk K, Wozniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. 2012. Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland. *Open Virol. J.* **6**:7–11.
24. Zsak L, Strother KO, Day JM. 2009. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. *Avian Dis.* **53**:83–88.



4. DISCUSSIÓ GENERAL

4. DISCUSSIÓ GENERAL

La contaminació del nostre entorn ha desenvolupat històricament un paper molt important en la transmissió d'una gran varietat de malalties infeccioses (Cooper, 2001). Actualment, segons la Organització Mundial de la Salut, cada any moren aproximadament 2 milions de persones a causa de malalties diarriques associades al consum d'aigua i aliments, la majoria dels quals són nens menors de 5 anys (WHO, 2005). Als països desenvolupats, els virus són els principals responsables d'aquests brots, ja que gràcies als processos de tractament d'aigües residuals, la transmissió de la major part de patògens bacterians ha disminuït dràsticament (Godfree i Farrell, 2005). Tanmateix, els criteris de qualitat d'aigua i aliments encara es basen en paràmetres bacterians com en l'avaluació de *Escherichia coli* o dels enterococs. Lluny de disminuir, l'impacte global de la transmissió de virus contaminants per l'ús o consum d'aigua i aliments, s'ha vist incrementat a causa de nous hàbits i pràctiques agroalimentàries de les poblacions humanes, generalment afavorides per la globalització (Newell et al. 2005).

Fins fa pocs anys, la sensibilitat dels mètodes utilitzats per a la detecció de virus en mostres ambientals dificultava l'estandardització de protocols per a l'anàlisi d'aquests patògens de manera rutinària. Actualment però, els avenços en les tècniques moleculars permeten detectar la major part de famílies víriques ràpidament de manera sensible i específica, amb un cost econòmic acceptable. Els mètodes moleculars han permès determinar la prevalença de determinats virus entèrics com els norovirus o els HEV i HAV en diverses mostres ambientals, i proposar certs grups de virus amb genoma d'ADN (adenovirus i els poliomavirus humans) com a indicadors alternatius a l'ús dels tradicionals paràmetres bacterians.

Dins dels projectes europeus VITAL i VIROCLIME s'han analitzat els adenovirus humans, proposats pel nostre grup com a marcadors de contaminació fecal humana, com a paràmetres per a l'estudi de la disseminació de virus en la cadena alimentària i en el medi aquàtic.

Aquesta tesi doctoral es basa en dues àrees d'estudi de la virologia ambiental. Per una banda s'ha avaluat l'estabilitat de virus contaminants en condicions naturals (Capítol I) i davant processos de desinfecció (Capítol II). En aquests estudis, els indicadors virals/patògens HAdV i JCPyV han estat analitzats. D'altra banda, s'ha proposat una nova eina per a la identificació de l'origen de la contaminació fecal al medi ambient (Capítol III).

Al Capítol I, que inclou els estudis 1, 2 i 3, s'ha caracteritzat els factors ambientals i els mecanismes que intervenen en la inactivació natural dels HAdV a diferents ambients aquàtics i aliments, considerant la temperatura i la llum solar com els agents potencialment més rellevants, així com l'estandardització entre diferents laboratoris d'un mètode de qPCR per a la quantificació dels HAdV en mostres d'aliments (fruits rojos). Al Capítol II (estudis 4, 5 i 6) s'ha estudiat l'efectivitat de

tractaments químics (clor) i físics (llum ultraviolada) en la inactivació de virus contaminants. Finalment, al Capítol III (estudi 7), s'ha considerat que era interessant completar les eines moleculars existents per a identificar les fonts de contaminació fecal en aigua i aliments, i s'ha desenvolupat una nova tècnica molecular per a traçar la contaminació fecal d'aviram al medi ambient, mitjançant la detecció i quantificació dels parvovirus de pollastre i gall d'indi.

Inactivació natural de virus a l'aigua i aliments: temperatura i llum solar

En els estudis 1 i 2, compresos al Capítol I, l'objectiu principal era definir paràmetres per a incorporar l'efecte de la temperatura i la llum solar en models de disseminació de virus contaminants a l'aigua i al medi ambient.

Mentre que hi ha dades experimentals que indiquen que la inactivació dels virus per l'acció de temperatures elevades té lloc majoritàriament per la inhibició del reconeixement o la unió entre el virus i la cèl·lula hoste (Wigginton et al. 2012), la llum solar pot desencadenar originar diversos mecanismes de foto-inactivació (Davies-Colley et al. 1999; Davies-Colley et al. 2000; Kohn i Nelson, 2007; Romero et al. 2011). Per una banda, els danys de la llum solar poden ser ocasionats per l'acció directa de la llum ultraviolada sobre el genoma viral. En la llum solar natural, les longituds d'ona en el rang de la llum UVC (100-280 nm) s'extingeixen abans d'arribar a la superfície de la Terra. Com a conseqüència, els danys directes causats per la llum solar són principalment causats per l'efecte de la radiació UVB (longituds d'ona de 280-320 nm) i productes foto-derivats que poden bloquejar la replicació del genoma, com ara els dímers de pirimidina (Schuch i Menck, 2010).

D'altra banda, la llum solar també pot ser responsable de la inactivació natural dels virus patògens per l'acció de mecanismes de foto-inactivació indirecta. Tant la llum UV com la llum visible, poden iniciar aquests processos, que es basen en l'excitació de determinats compostos per l'acció de la llum (sensibilitzadors), en presència d'oxigen. Aquestes reaccions generen espècies reactives d'oxigen (ROS), que poden inactivar les partícules virals. Els sensibilitzadors poden estar situats dins dels microorganismes i conduir a una inactivació endògena, o fora de la cèl·lula o partícula vírica contribuint en la foto-inactivació exògena (Kohn i Nelson, 2007).

Actualment, la contribució relativa de la temperatura i la llum solar en la inactivació natural dels virus al medi ambient és pràcticament desconeguda. A l'estudi 1, es va investigar la inactivació natural dels HAdV en ambients aquàtics. Per als experiments es van preparar diversos reactors que contenien matrius simples (PBS i aigua mineral), amb un contingut microbià i una absorbància de la llum baixa, i matrius complexes (aigua residual, aigua residual diluïda i aigua de mar), amb un contingut microbià i una absorbància de la llum més elevada. Els experiments es van realitzar per

duplicat paral·lelament en condicions de foscor i sota l'exposició a llum solar simulada a tres temperatures; 7, 20 i 37 °C. La persistència dels HAdV es va estudiar mitjançant anàlisis d'infectivitat i de qPCR. Es van definir els temps d'inactivació necessaris per assolir una reducció dels HAdV2 d'entre 1-4 logaritmes en les diferents condicions estudiades ($t_{90-t99,99}$).

En aquest estudi, no es va assolir una reducció rellevant dels HAdV infecciosos després de 24 hores a la foscor a 7 i 20 °C, en cap dels tipus d'aigua analitzats. No obstant això, a 37 °C es va identificar una reducció lineal dels HAdV d'entre 4 i 6-log en les matrius complexes (aigua residual, aigua residual diluïda i aigua de mar). Aquesta reducció pot ser causada per l'activitat de microorganismes presents als reactors, que poden créixer o ser més actius a les temperatures més altes. L'estabilitat dels virus entèrics en aigua a baixes temperatures s'ha descrit anteriorment, en consistència amb aquests resultats (Enríquez et al 1995; Raphael et al 1985; revisat per Rzetuka i Cook, 2004). També hi ha dades experimentals que demostren l'efecte del contingut microbiològic en la inactivació de patògens virals, tant en aigua de mar com en aigua dolça (Fujioka et al 1980; Gordon i Toze, 2003). En alguns casos s'ha confirmat aquesta hipòtesi mitjançant la repetició dels assaigs en aigua esterilitzada (Girones et al. 1980; Rafael et al. 1985).

L'efecte de la llum solar en la inactivació dels virus contaminants en aigua es va avaluar mitjançant l'estudi de la persistència dels HAdV infecciosos en reactors exposats a llum solar artificial a 7, 20 i 37°C. Els experiments conduïts paral·lelament a la foscor es van utilitzar com a controls. A 7°C, la llum utilitzada en els experiments emet radiació UVB, i després de 24 hores d'anàlisi, la dosi acumulada va ser de 122,91 J/m². A 20 i 37°C, la radiació emesa en aquesta longitud d'ona és inexistent i la làmpada utilitzada només emet radiació ultraviolada en el rang de la UVA.

Actualment, hi ha evidències experimentals que indiquen que la radiació UVB és molt eficaç en la desinfecció de virus entèrics i altres indicadors fecals (Sinton et al. 2002; Kohn i Nelson, 2007; Love et al. 2010). Altres treballs han descrit la radiació UVB com la principal longitud d'ona responsable de la inactivació de MS2, rotavirus, adenovirus i poliovirus en aigua exposada a l'espectre complet de la llum solar (Kohn i Nelson, 2007; Love et al. 2010; Romero et al. 2011). Els resultats obtinguts en aquest estudi a partir dels reactors exposats a la llum solar a 7°C, són consistents amb aquestes observacions. En aquestes condicions, els HAdV van disminuir dràsticament de manera similar en tots els reactors seguint una cinètica bifàsica.

Les cinètiques d'inactivació bifàsiques s'han identificat en molts estudis de desinfecció amb radiació UVC (254 nm). Com en el nostre cas, es caracteritzen per una ràpida inactivació inicial seguida d'una inactivació posterior més estable (Chang et al 1985; Hijnen et al 2006; Nieuwstad i Havelaar, 1994). Tradicionalment, aquestes cinètiques s'han justificat per l'absorbància de la llum per la pròpia mostra o per la presència de virus agregats (Nieuwstad i Havelaar, 1994) o de virus resistents (Cutler et al. 2011) i per la recombinació de virus danyats dins de la cèl·lula hoste (Luria i

Dulbecco, 1949; Galasso et al. 1965; Sharp i Kim, 1966). Més recentment, Mattle i Kohn (2012), han demostrat que les cinètiques bifàsiques no correlacionen amb casos d'agregació viral, absorbància de la llum o subpoblacions resistents a virus, però sí que correlacionen bé amb fenòmens de recombinació.

En condicions de llum solar, a 20 i 37°C en els reactors que contenien aigües simples (PBS i aigua mineral), la inactivació dels HAdV va ser de 2 logaritmes mentre que no es va observar inactivació en la foscor. Pel que fa a les matrius complexes (aigua residual, aigua residual diluïda i aigua de mar) a 20°C, la inactivació dels HAdV és similar a la inactivació observada en PBS i aigua mineral (al voltant de 2 logaritmes en tots els casos). Pel contrari, a 37°C la inactivació de HAdV és equivalent a la inactivació observada en condicions de foscor i per tant, no pot ser deguda a l'efecte de la llum solar. Així, a 37°C en tots els reactors amb aigües complexes, l'efecte dels factors biòtics en la reducció de HAdV infecciosa és més rellevant que l'efecte dels mecanismes de foto-inactivació.

L'aigua residual i l'aigua de mar tenen un contingut microbià més elevat que l'aigua mineral, així com una presència significativa de matèria orgànica amb substàncies que poden actuar com a sensibilitzadors. Per tant, als reactors amb aigües més complexes la inactivació dels HAdV pot ser deguda tant a mecanismes de foto-inactivació indirectes endògens com exògens. En els reactors amb PBS i aigua mineral, el contingut de matèria orgànica és baix, de manera que la presència de substàncies sensibilitzadores podria ser inferior que a les matrius complexes i per tant, els mecanismes de foto-inactivació indirectes exògens podrien tenir un paper menys rellevant. Tanmateix, a partir dels resultats obtinguts en aquest estudi no és possible determinar la contribució dels sensibilitzadors endògens i exògens en la inactivació natural dels adenovirus en aigua.

En aquest estudi no es va observar cinètiques bifàsiques en els resultats obtinguts a partir dels reactors exposats a llum solar artificial a 20 i 37°C. En aquestes condicions, la inactivació dels HAdV segueix una cinètica de primer ordre en tots els casos. Aquesta observació pot explicar-se per dues raons. En primer lloc, a 20 i 37°C la làmpada no emet en la regió de radiació UVB. Per tant, la inactivació directa és probablement menor o inexistent, i en conseqüència la inactivació dels HAdV menys dràstica. D'aquesta manera, cal considerar la possibilitat que es pogués observar una cinètica bifàsica si el disseny experimental fos més llarg. En segon lloc, és possible que els danys UVB facilitin els processos de recombinació i per tant, en aquests assajos podria ser més probable observar cinètiques d'inactivació bifàsiques. Alguns autors han descrit que els dímers de pirimidina poden facilitar els processos de recombinació (Lin i Howard-Flanders, 1976). A més, altres treballs han descrit que la radiació UVB pot generar la unió creuada de proteïnes, la qual cosa interfereix amb la formació d'agregats virals en els experiments (Mattle i Kohn, 2012). Sorprenentment, l'agregació viral ha demostrat ser eficaç en la inducció de processos de recombinació dels echovirus dins de les cèl·lules hostes (Abel, 1962; Young i Sharp, 1979).

En general, s'ha observat que els HAdV persisteixen durant períodes més llargs en matrius d'aigua simples, com l'aigua mineral, especialment en la foscor i en un interval de temperatura d'entre 7 i 20°C. La llum solar juga un paper rellevant en la inactivació natural dels HAdV a l'aigua però factors com la càrrega microbiològica no s'han de subestimar i poden ser determinants en situacions determinades.

L'estudi 2 es va realitzar en el marc del projecte "VITAL", finançat per la Unió Europea, que tenia l'objectiu d'estudiar la disseminació de virus patògens contaminants en les cadenes de producció d'aliments de diferents països d'Europa. Durant el primer període d'aquest projecte, es va treballar en l'estandardització de mètodes de concentració i detecció de virus en aliments vegetals i en productes derivats del porc. Per a avaluar la robustesa dels mètodes per a fruits i vegetals es va organitzar un assaig interlaboratori col·laboratiu; es va distribuir les suspensions víriques i els estàndards de qPCR necessaris per a la realització dels assajos. Els anàlisis estadístics es van dur a terme seguint recomanacions prèviament publicades (Scotter et al. 2001) per al mètode publicat per Langton i col·laboradors (2002). Aquest mètode defineix la sensibilitat de l'assaig com el percentatge de mostres positives que són correctament identificades i la especificitat com el percentatge de mostres negatives correctament identificades.

El mètode de qPCR analitzat va demostrar ser capaç de detectar fins a un nivell de 10^2 PFU de HAdV en 25 g de mostres contaminades artificialment. La sensibilitat del mètode va ser molt alta (98.5%), però es va identificar inconsistències entre els resultats esperats i els obtinguts als diferents laboratoris. Aquest fet, remarca la importància d'introduir assajos controls en l'anàlisi rutinari d'aliments que permetin identificar els passos concrets que hagin pogut no funcionar (D'Agostino et al. 2011; Rodríguez- Lázaro et al. 2007).

La variabilitat entre els resultats obtinguts en els diferents laboratoris va condicionar els valors d'acordança (repetibilitat dels resultats qualitius) i concordança (reproductibilitat dels resultats qualitius), tot i que els intervals de confiança observats fan pensar que si l'assaig inclogués una selecció més àmplia de laboratoris, s'obtidrien resultats més uniformes. Pel contrari, el valor predictiu negatiu del mètode és excel·lent, ja que cap de les mostres contaminades artificialment es van reportar com a no contaminades.

L'assaig de qPCR per als HAdV utilitzat en aquest estudi és adient per a la quantificació dels HAdV mitjançant l'estimació del nombre de còpies genòmiques en funció a un estàndard extern. Malgrat que en aquest assaig les solucions estàndards d'àcids nucleics es van subministrar juntament amb la resta de materials necessaris per a la prova, els resultats dels diferents laboratoris expressats en còpies genòmiques van ser massa variables per a descriure la robustesa del mètode en termes quantitius. La variació en la quantificació dels HAdV pot ser causada per diversos factors, com ara

per les condicions de temperatura durant l'enviament o a diferències entre els aparells utilitzats a cada laboratori. En qualsevol cas, cal disposar de materials de referència fiables i sistemes externs de control de qualitat per a realitzar, de manera eficient, anàlisis rutinaris de detecció de virus a les cadenes de subministrament d'aliments.

Malgrat aquestes qüestions, els resultats de l'assaig col·laboratiu per al mètode de qPCR per a detectar HAdV en fruits silvestres van ser acceptablement robustos. El mètode avaluat en aquest estudi representa un pas endavant per a l'anàlisi rutinari de virus en les cadenes de subministrament d'aliments vegetals a nivell europeu.

A l'Estudi 3, l'objectiu principal era determinar el paper de la temperatura i la llum solar en la inactivació natural dels HAdV i dels bacteriòfags MS2 en aliments vegetals, utilitzant l'enciam i les maduixes com a models. Per a investigar la inactivació natural dels HAdV en aquestes matrius, es van contaminar artificialment porcions de la superfície d'aquests aliments amb suspensions víriques a una concentració de 10^8 FFU/ml. Els experiments es van realitzar per duplicat paral·lelament en condicions de foscor i sota l'exposició a llum solar simulada a dues temperatures; 4 i 30°C. La persistència dels HAdV es va estudiar concentrant les partícules víriques seguint un protocol basat en l'elució amb un tampó de glicina i mitjançant anàlisis d'infectivitat i de qPCR.

Contràriament als resultats obtinguts en l'estudi 2, en les condicions experimentals utilitzades es va identificar la temperatura com el principal factor en la inactivació dels HAdV en aquestes matrius, fins i tot quan s'exposen a la llum solar simulada. En particular, no es va observar inactivació dels HAdV als aliments conservats 4°C, ni en la foscor com tampoc sota l'exposició a la llum solar. No obstant, a 30°C els nostres resultats mostren reduccions rellevants (d'entre 3 i 4 logaritmes) dels HAdV presents a la superfície de mostres de maduixa i d'enciam en 24 hores, tant en foscor com exposats a la radiació solar. Pel que fa als bacteriòfags MS2, s'ha identificat un logaritme d'inactivació en les mostres d'enciam a 4 °C després d'exposició a la llum i més de 2-log quan la temperatura era de 30°C. En general, la inactivació en altes temperatures sembla més eficaç per HAdV que per MS2.

La temperatura ha estat prèviament descrita com un dels factors més importants que interfereixen en la inactivació de patògens (Melnick i Gerba, 1980; Yates et al. 1990; Bertrand et al. 2012). Tot i que el mecanisme exacte responsable d'aquesta inactivació és desconegut, es sap que les temperatures més elevades poden provocar la degradació tèrmica de la càpsida viral (Yates et al. 1985). Altres estudis també han proporcionat evidències consistents que demostren que la infectivitat viral és estable a les baixes temperatures utilitzades durant l'emmagatzematge d'aliments i s'ha descrit una reducció menor a 1 logaritme en la infectivitat de poliovirus en mostres d'enciam i de maduixa després de 15 dies a 7°C (Kurdziel et al. 2001). Altres estudis han obtingut resultats

similars amb HAV en mostres d'enciam (Croci et al. 2002). Globalment, tots aquests resultats remarquen la idea que les temperatures baixes, que en general s'utilitzen per a evitar el creixement bacterià, no afecten a la persistència del virus contaminants.

No hi ha gaire informació disponible sobre l'estabilitat viral en aliments vegetals exposats a la llum solar a les diferents temperatures que trobem al llarg de l'any. A partir dels nostres resultats, no hem observat un efecte rellevant de la llum solar sobre la infectivitat de HAdV en les superfícies dels enciams i les maduixes. Aquest fet, pot ser degut a que la superfície dels aliments poden protegir les partícules víriques de la inactivació per l'acció de la llum solar o bé que els mecanismes de foto-inactivació difereixen respecte els que s'han descrit com a responsables de la inactivació de virus en aigua per l'acció de la llum solar. Cal disposar de més dades experimentals per a caracteritzar el paper de la llum solar i dels mecanismes de foto-inactivació de virus en matrius no aquoses amb una major profunditat.

Els resultats obtinguts en aquest estudi plantegen un motiu de preocupació pel que fa a la seguretat alimentària. A l'hemisferi nord, els cultius durant l'hivern es troben a temperatures baixes i estan exposats a menys hores de llum solar. Els resultats observats en aquest estudi són consistents amb altres treballs previs que indiquen que els virus són molt resistents a baixes temperatures. Això suggereix que els períodes de l'any amb temperatures més fredes i menys hores de llum solar representen un escenari favorable per a la transmissió de virus patògens. Un cop recol·lectats, els aliments vegetals solen emmagatzemar-se a temperatures baixes per a evitar el creixement bacterià. Un cop més, aquestes condicions afavoreixen la persistència de virus contaminants infecciosos als aliments.

En cultius que creixen a temperatures més elevades, és probable que la infectivitat dels virus contaminants entèrics es redueixi al llarg del temps. En particular, a 30°C segons els nostres resultats calen 18 hores per a assolir una reducció del 99,9% dels HAdV en l'enciam exposat a la radiació solar, i 23,5 hores a la foscor. En les superfícies de maduixa, calen 3,3 hores per assolir una reducció de 99,9% dels HAdV sota la radiació solar, i 4,4 hores en condicions de foscor. Aquestes dades indiquen que els esdeveniments que tinguin lloc en les hores abans de la recol·lecció dels productes frescos són molt importants pel que fa a la transmissió de virus patògens (irrigació, mala manipulació dels aliments, etc). No obstant això, la susceptibilitat a la inactivació pot ser diferent en funció del virus i cal disposar de més dades sobre l'estabilitat dels diferents virus patògens en les condicions que es troben en la cadena de producció d'aliments.

Quantificació viral: qPCR i infectivitat

Tot i que els assajos de qPCR representen una tècnica sensible i molt específica, poden subestimar la inactivació viral davant de processos de desinfecció, ja que els àcids nucleics poden amplificar-se després dels tractaments, sobretot si la llargada del fragment amplificat és limitada (Girones et al. 2010). En alguns estudis, s'han utilitzat tractaments enzimàtics amb l'objectiu de diferenciar virus infectius dels no infectius en base a diferències de la capacitat de les càpsides proteiques per a protegir els genomes davant les proteases i nucleases (Nuanalsuwan i Cliver, 2002; Rodríguez et al. 2009). En cap dels estudis compresos en el Capítol II es va observar una inactivació rellevant dels virus tractats analitzats mitjançant qPCR, fins i tot després de realitzar els tractaments enzimàtics basats en la digestió de DNAses. Segons els nostres resultats, la conveniència de l'ús d'aquests procediments per a reduir el nombre de falsos positius per qPCR no és clara i cal realitzar treball addicional per desenvolupar un mètode molecular que proporcioni dades equivalents als resultats obtinguts pels assajos d'infectivitat i que permeti desenvolupar estudis d'inactivació amb aquells virus que no poden ser cultivats al laboratori. En aquest sentit, el nostre grup manté una col·laboració amb el laboratori de la Dra. Tamar Kohn, que ha desenvolupat aproximacions matemàtiques per a la quantificació de potencials partícules virals infeccioses a partir de virus quantificats per qPCR en tractaments amb UVC.

Desinfecció d'aigües: clor

El Capítol II d'aquesta tesi doctoral recull 3 estudis en els que s'ha investigat l'efectivitat de diversos desinfectants habitualment utilitzats en el tractament d'aigües en la inactivació de virus contaminants. Per una banda, s'ha avaluat l'eficàcia del clor com a tractament químic per a inactivar HAdV, JCPyV i MNV en aigua de mar utilitzada en la depuració de marisc (estudi 4) i el HEV i HAdV en aigua dolça (estudi 5). D'altra banda, s'ha estudiat l'eficàcia de la radiació ultraviolada C en la inactivació de HAdV, JCPyV i MS2 (estudi 6).

La inactivació dels virus per l'acció del clor es pot associar a reaccions de les proteïnes de la càpsida amb el clor lliure però també a canvis en la seva conformació o danys associats a les reaccions que involucren espècies oxidants secundàries. El HOCl i cloramines orgàniques poden reaccionar amb les proteïnes i també amb altres molècules biològiques com ara ADN i ARN (Page et al., 2009).

El valor de $C(t)$, concentració de clor per temps de contacte, pot aportar informació de la eficàcia dels desinfectants en la inactivació de microorganismes patògens però depèn dels virus, de

les característiques de l'aigua, la temperatura i les condicions de PH. A més, certs factors poden facilitar l'estabilitat dels virus en aigua clorada com per exemple temperatures baixes, presència de contaminants orgànics, unió a superfícies i la formació de virus agregats.

A l'estudi 4, l'objectiu principal era investigar la capacitat del clor per a inactivar virus amb genoma d'ADN o ARN presents a l'aigua de mar. El clor ha estat un dels primers mètodes per a desinfectar aigua de mar utilitzada en la depuració de marisc. Normalment en aquests processos s'aplica una solució d'hipoclorit de sodi a una concentració entre 2 i 3 mg de clor lliure/l durant un temps de contacte de fins a una hora (Lee et al. 2008). En aquest estudi, els MNV-1 es van avaluar en substitució dels norovirus humans, per als quals no es disposa de mètodes d'infectivitat, i els HAdV i els JCPyV es van estudiar com a virus indicadors de la contaminació fecal d'origen humà (Pina et al. 1998). Les cinètiques d'inactivació es van caracteritzar tant per qPCR com mitjançant assajos d'infectivitat.

Quan el clor s'aplica per a desinfectar aigua de mar, la concentració del clor lliure residual disminueix al llarg del temps en dues fases (Din et al. 2000). A la primera, disminueix molt ràpidament però posteriorment, la disminució és més lenta i sostinguda al llarg del temps. Aquesta disminució del clor lliure és deguda a la interacció del compost amb altres components orgànics presents a l'aigua de mar, com per exemple l'amoni (NH_3) i el ferro (Fe^{2+}), de manera que el clor disponible per a la desinfecció dels patògens es redueix. Si l'aigua de mar té un pH al voltant de 8, l'addició de clor generarà espècies oxidants secundàries com HOCl , OCl^- , HOBr i OBr^- , que estableixen un ambient hostil per als microorganismes (Din et al. 2000). D'aquesta manera, fins i tot en concentracions de clor lliure baixes pot tenir lloc la desinfecció dels microorganismes presents a l'aigua.

Actualment, s'accepta que en presència de compostos orgànics, com els components de les cèl·lules hostes i proteïnes, el clor perd activitat virucida i bactericida (Shin i Sobsey, 2008). Per tant, les suspensions virals utilitzades durant l'estudi es van preparar utilitzant PBS i evitant la presència de restes de cèl·lules o de medi de cultiu. Tot i que la presència de matèria orgànica és més alta a l'aigua de mar natural, en aquest estudi no es va detectar diferències estadísticament significatives entre el comportament dels virus avaluats en aigua de mar natural i en aigua de mar artificial.

Els nostres resultats suggereixen que els MNV-1 són més sensibles al clor que els HAdV2 i que inicialment s'inactiven molt ràpid. Aquests resultats són consistents amb estudis prèviament publicats per altres autors (Cannon et al. 2006; Cromeans et al. 2010; Shin i Sobsey, 2008). Aquesta reducció inicial tan notable probablement és deguda a que els MNV-1 són més sensibles a l'acció del clor lliure que a l'acció de les espècies secundàries oxidants de clor combinat. Tot i que aquests virus s'inactiven ràpidament, el temps necessari per assolir una reducció de 2 logaritmes és major que els temps d'inactivació calculats als estudis esmentats. Aquesta observació suggereix que factors

ambientals com la força iònica i els compostos presents a l'aigua de mar poden alentir el procés de desinfecció però no afecten la seva eficàcia global.

Els HAdV2 s'inactiven per l'acció del clor lliure en el primer minut de contacte i poden inactivar-se pel clor combinat, tot i que no completament en els 60 minuts de l'assaig. Les cinètiques d'inactivació dels HAdV2 segueixen models bifàsics amb una ràpida inactivació inicial, seguida per una inactivació gradual que pot dependre de la qualitat de l'aigua (Page et al. 2009). Com ja s'ha discutit a l'estudi 2, en un estudi recent realitzat per Mattle i Kohn (2012), s'ha observat una correlació entre les cinètiques bifàsiques i els fenòmens de recombinació entre diferents virus danyats dins la cèl·lula hoste.

Alguns autors han observat que els HAdV tractats amb clor lliure són capaços d'unir-se als receptors de les cèl·lules A549, tot i que són incapaços de desenvolupar plaques (Page et al. 2010). Aquest descobriment, indica que el mecanisme d'inactivació del clor lliure implica la inhibició de passos del cicle d'infecció dels HAdV2 posteriors a la unió dels virus amb la cèl·lula hoste, com per exemple la expressió proteica temprada.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, els assajos de qPCR i RT-qPCR són mètodes de detecció i quantificació sensibles i específics però subestimen la inactivació viral deguda a l'acció del clor, ja que els àcids nucleics de virus no infecciosos poden ser amplificats en la PCR (Pecson et al. 2009). Contràriament, al que s'ha observat al Capítol II, en aquest estudi tot i que el nombre de rèpliques és limitat, els resultats obtinguts indiquen que les cinètiques d'inactivació dels HAdV analitzades per infectivitat o ET-qPCR són semblants. Per tant, en les condicions experimentals d'aquest estudi, la ET-qPCR pot ser útil per a inferir la infectivitat dels HAdV. Tanmateix, aquesta correlació no es va observar per als MNV-1. És convenient seguir treballant per a desenvolupar mètodes moleculars que permetin obtenir informació sobre la infectivitat dels virus analitzats, ja que els mètodes d'infectivitat solen ser cars i lents.

En conclusió, podem destacar que l'ús de 2.5 mg de clor lliure/l requereix de temps de contacte més llargs del que actualment s'apliquen per a disminuir significativament la càrrega viral de l'aigua de mar, ja que després de 60 minuts encara es van detectar HAdV infecciosos. Cal disposar de més dades experimentals que permetin definir els temps de contacte i les dosis més adients per a l'ús del clor en la desinfecció de l'aigua de mar utilitzada en la depuració de marisc. Tots els resultats d'aigua de mar natural i artificial van ser equivalents, la qual cosa suggereix que l'aigua de mar artificial pot ser utilitzada com una font d'aigua neta per a la depuració de mol·luscs bivalves.

A l'estudi 5, per tal de caracteritzar l'efectivitat del clor en la inactivació del HEV i dels adenovirus humans, es va realitzar experiments en aigua amb o sense presència d'aigua residual; un factor que pot interferir en els processos de desinfecció. El virus de la hepatitis E origina brots d'hepatitis agudes molt importants cada any i presenten una transmissió fecal-oral, principalment associada a aigua contaminada (WHO, 2012). Dades experimentals avaluant l'estabilitat del virus a desinfectants com el clor, són per tant, molt necessàries. Les dades generades en aquest estudi constitueixen els primers resultats experimentals sobre la inactivació del HEV en aigua mitjançant tractaments de cloració.

El rang de PH normal en aigües superficials és entre 6.5 i 8.5, i en aigua subterrània entre 6 i 8.5. En aquest estudi es va escollir un pH de 8 ja que hi ha evidències que demostren que les espècies de clor presents en aquestes condicions són més eficients en la desinfecció de microorganismes (Kahler et al., 2010).

Les corbes d'inactivació dels HEV i dels HAdV van seguir cinètiques bifàsiques, que en aquest tipus de tractaments de desinfecció, poden ser explicades per l'acció de diferents espècies del clor (Sobsey et al. 1991). Certs estudis han demostrat que la inactivació viral pel clor pot estar inicialment associada a reaccions de proteïnes de la càpsida amb formes de clor lliures com ara el HOCl i en una segona fase, amb espècies secundàries de clor com cloramines (Deborde i Von Gunten, 2009; Kahler et al. 2010).

Les cinètiques obtingudes per a HEV i HAdV van ser estadísticament equivalents ($p \approx 1$) amb un valor de $C(t)_{99}$ major per a HAdV (3,9 minuts) que per al HEV (0,41 minuts). Es va detectar partícules de HEV i HAdV infeccioses després de 30 minuts de contacte, i no es va observar inactivació significativa mitjançant els assajos de qPCR. Pel que fa als temps d'inactivació, els valors de $C(t)$ per assolir una reducció viral de 1-log van ser entre 0.15 i 0.12 mgxmin/l pel HEV tant obtingut a partir del cultiu cel·lular com a partir de suspensions fecals. Valors més elevats es van observar per als HAdV2; 1.15 mgxmin/l per a una reducció de 1-log i 3.90 mgxmin/l per a una reducció de 2-log. Les corbes d'inactivació obtingudes per al HEV en presència d'aigua residual (1%) van permetre calcular valors de $C(t)$ que van incrementar de 0.41 fins a 11.12 mg x min/ l per a assolir una inactivació de 2-log. Una reducció similar es va descriure mitjançant assajos de qPCR, demostrant que el clor lliure a altes concentracions inicials (com 23 mg /l) actua tant sobre les proteïnes com sobre el genoma viral.

Els experiments amb HAdV2 es van realitzar en condicions equiparables als dels experiments amb HEV però en un experiment concret es va utilitzar una concentració de virus més elevada ($7,2 \times 10^5$ FFU/ml). Els resultats obtinguts van permetre quantificar els HAdV2 després de 60 minuts de contacte i un valor $C(t)$ de 1.65 mgxmin/l per a una reducció de 4-log.

S'ha demostrat que els valors de $C(t)$ poden augmentar en funció al pH de l'aigua i depenen en bona part del disseny experimental utilitzat en l'estudi. Tot i aquesta consideració, els valors de $C(t)$ obtinguts per als HAdV2 són consistents amb altres resultats obtinguts en un treball previ que estudiava la desinfecció dels HAdV40 en aigua (Thurston-Enriquez et al. 2003).

Els resultats d'aquest estudi representen les primeres dades experimentals de les cinètiques d'inactivació del HEV en tractaments de desinfecció per clor i en presència d'aigua residual. La sensibilitat del HEV al clor ha estat qüestionada en un anterior article (Boccia et al. 2006). Aquest fet, i la importància dels brots causats per HEV han fet absolutament necessari obtenir dades experimentals per a desenvolupar recomanacions i estratègies per a protegir poblacions vulnerables. La comparació dels valors de $C(t)$ entre estudis diferents és complicada a causa de les diferents condicions experimentals i mètodes utilitzats als estudis publicats. Tanmateix, els valors obtinguts en aquest estudi han estat consistents amb valors descrits en altres estudis (Thurston-Enriquez et al. 2003).

Els adenovirus humans són coneguts per la seva resistència davant l'acció del clor en comparació a la majoria de bacteris (Kahler et al., 2010) i ha estat utilitzat en aquest estudi com una referència comparativa per a l'avaluació de la inactivació del HEV. Les dades mostren que el HEV és sensible a les concentracions analitzades de clor lliure en les condicions assajades i que la seva cinètica d'inactivació no és diferent de la observada per als HAdV2.

Desinfecció d'aigües: llum ultraviolada C

Els processos de desinfecció mitjançant la llum UVC de baixa pressió (253.7 nm) s'utilitzen molt freqüentment en la desinfecció d'aigua residual i de beguda. No obstant s'ha demostrat que certs virus amb genoma d'ADN poden ser molt resistents a aquests tractaments (Thompson et al. 2003; Mena i Gerba, 2009). A l'estudi 6, s'ha avaluat l'eficàcia d'aquest mètode en la inactivació dels JCPyV i dels HAdV, com a indicadors virals de la contaminació fecal, del bacteriòfag MS2 com a control del procés. Els NoV van ser avaluats, per ser un dels principals patògens transmesos per l'aigua, únicament mitjançant assajos de q-RT-PCR, ja que no existeix una línia cel·lular eficient que permeti desenvolupar estudis d'infectivitat.

Les suspensions virals, a una concentració inicial de 10^6 FFU/mL, es van exposar a diferents dosis de llum UVC de baixa pressió monocromàtica (253.7 nm); 0, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 i 1400 J/m^2 . La inactivació dels virus es va analitzar mitjançant assajos d'immunofluorescència (IFA) i per assajos de qPCR.

A partir dels resultats obtinguts, es va identificar una reducció en el títol de HAdV2 de 2,14 logaritmes, després de ser exposats a una dosi de UVC de 1400 J/cm². Aquests resultats suggereixen que els HAdV2 poden ser més estables als tractaments amb UVC del que s'havia descrit fins ara (Ballester et al. 2004; Gerba et al. 2002, Shin et al. 2005). Aquesta observació podria explicar-se pel tipus d'assaig d'infectivitat utilitzat en aquest estudi. Els assajos d'immunofluorescència són mètodes molt específics i sensibles per a analitzar la infectivitat dels virus, i fins i tot es poden detectar virus que han perdut la capacitat de produir efecte citopàtic o plaques de lisi.

Les cinètiques d'inactivació per als JCPyV, demostren una reducció de 1,71 logaritmes després d'una dosi de radiació UVC de 1400 J/cm². Sorprenentment, l'estabilitat que s'ha observat per als JCPyV és fins i tot lleument superior que l'observada en el cas dels HAdV2. Els dos virus tenen un genoma de ADN i poden ser reparats per la maquinària de la cèl·lula hoste durant el cicle de replicació viral. A més, el genoma dels JCPyV té una conformació de doble cadena superenrotllada i unida covalentment a histones cel·lulars. Aquestes característiques del genoma dels JCPyV poden representar una protecció davant la desinfecció per llum UVC. La inactivació dels bacteriòfags MS2, amb genoma de ARN, observada en aquest estudi és similar que la reducció identificada en altres estudis previs (Pecson et al. 2009). Concretament, es va assolir una reducció de 4 logaritmes al final de l'experiment (1.400 J/cm²).

En els darrers anys, s'ha desenvolupat algunes estratègies per a quantificar partícules virals viables mitjançant mètodes moleculars com per exemple la qPCR (revisades a Rodriguez et al. 2009). En aquest treball, els resultats obtinguts van demostrar que les suspensions virals tractades o no tractades amb una digestió amb DNAsa van presentar cinètiques d'inactivació semblants, amb menys d'un logaritme de reducció al final dels experiments.

Pel que fa als NoV, es va observar una lleu reducció (0.5 logaritmes) mitjançant qPCR. Aquest resultat és consistent amb altres estudis previs que descriuen com la llum UVC actua inhibint la injecció del genoma viral a la cèl·lula hoste i la seva replicació, i ocasiona danys tant a la càpsida com al genoma viral (Wigginton et al. 2012).

En conclusió, aquest estudi representa els primers resultats experimentals sobre l'estabilitat dels JCPyV en els tractaments amb UVC. A més, s'ha demostrat que utilitzar dosis de radiació UVC de 1400 J/m² no és efectiu per a assolir una inactivació de 4-log de certs virus amb genoma d'ADN com els HAdV i els JCPyV. Per a millorar l'efectivitat dels tractaments de desinfecció basats en la llum UVC és necessari desenvolupar més estudis sobre l'estabilitat d'aquests virus a dosis més elevades de radiació UVC.

Identificació de l'origen de contaminació fecal d'aviram al medi ambient

En l'estudi de la contaminació fecal al medi aquàtic i aliments, la estabilitat dels patògens i la seva desinfecció són dos temes de gran rellevància. Un tercer tema en el que s'ha treballat molt en els darrers anys és la identificació de les fonts de contaminació fecal per avaluar exhaustivament el risc per a la salut pública associat així com per a implementar accions de remediació.

A l'estudi 7, l'objectiu principal era desenvolupar una nova eina per a identificar l'origen de la contaminació fecal d'aviram al medi ambient mitjançant la detecció i quantificació de parvovirus de pollastre/gall d'indi en mostres ambientals. Certs residus generats a les granges s'utilitzen com a fertilitzants de sòls amb ús agrícola i mitjançant mecanismes de contaminació difosa. D'altra banda, aigües residuals generades als escorxadors poden arribar a incrementar els nivells de contaminació fecal en aigües superficials i subterrànies.

Per a avaluar l'especificitat dels assajos desenvolupats es va analitzar la presència de parvovirus de pollastre/gall d'indi en un ampli conjunt de mostres que incloïa aigua residual d'origen humà recollida en dos hospitals diferents, vacunes comercials per a parvovirus de gossos i gats, mostres de sèrums de pacients afectats per parvovirus humans, mostres d'escorxadors de boví i porcí, i mostres d'ànecs i gavines, entre altres. En tots els casos els resultats van ser negatius.

D'acord amb altres estudis realitzats als Estats Units, Hongria i Croàcia (Zsak et al. 2009; Bidin et al. 2011; Palade et al. 2011; Tarasiuk et al. 2012), es va identificar una alta prevalença de parvovirus de pollastre/gall d'indi a Catalunya, Hongria i Grècia. Els valors de prevalença van oscil·lar entre el 80% i el 100%. Al País Basc es va observar un nivell de prevalença inferior que a les altres zones geogràfiques estudiades. En aquesta regió, de les 4 granges estudiades, només una va ser positiva (en les dues mostres recollides). Tot i que el nombre de mostres estudiades no era gran, és probable que hi hagi un cert grau de variabilitat en la prevalença d'aquests virus entre diferents granges. Mostres de femtes de gallina, gall d'indi i perdiu també van ser analitzades per a determinar la gamma d'hostes dels parvovirus de pollastre/gall d'indi. Cinc de 7 mostres de gallina i les 3 mostres de gall d'indi analitzades van donar un resultat positiu. De les 2 mostres fecals de perdiu disponibles, una d'elles també va donar positiu.

Gràcies a l'aplicació dels mètodes desenvolupats, es va detectar la presència dels parvovirus de pollastre/gall d'indi en un escorxador de pollastres. Cinc mostres d'aigües residuals crues escorxador va donar positiu per nPCR i es van quantificar per qPCR, obtenint un valor mitjà de 4.63×10^5 GC/ml. Els virus estudiats van ser detectats fins i tot, en 2 de 5 mostres d'efluents d'aigua residual d'escorxador. Els efluents dels escorxadors estudiats, juntament amb aigües residuals d'origen animal i aigües residuals urbanes són rebudes en una planta de tractament d'aigua residual situada a la mateixa localitat. Quatre de les nou mostres analitzades en aquesta planta van donar un

resultat positiu en l'anàlisi de la presència dels parvovirus de pollastre/gall d'indi. Els virus presents en una d'aquestes mostres es van quantificar mitjançant qPCR en 2.65×10^2 GC/ml. Concentracions superiors, 1.29×10^5 GC/g, es van quantificar en mostres de biosòlids generats en la mateixa planta de tractament. Encara que cap de les 5 mostres d'efluents d'aquesta planta va donar positiu per nPCR, és necessari l'anàlisi d'un nombre de mostres més elevat per a caracteritzar l'estabilitat d'aquests virus en el medi ambient i davant dels mètodes de tractament més habituals que s'utilitzen per eliminar els patògens de l'aigua. Altres autors han descrit una estabilitat elevada per a determinats parvovirus animals (Mani et al. 2007; Sauerbrei i Wutzler, 2009).

En aquest treball, els parvovirus de pollastre/gall d'indi no van ser detectats en una planta de tractament d'aigües residuals urbanes que no rep efluents d'escorxadors o granges d'aviram properes. Aquest fet recolza els resultats observats en els assajos d'especificitat i remarca el fet que els escorxadors de pollastre representen una font de contaminació fecal d'aviram per als cursos d'aigua propers.

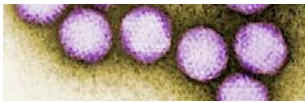
Les mostres positives obtingudes al llarg de l'estudi es van confirmar posteriorment nPCR i caracteritzat per seqüenciació. La variabilitat genètica en una mostra de l'escorxador de pollastres es va analitzar per seqüenciació de 9 clons diferents. Entre les seqüències obtingudes, es va observar similituds entre el 96,4% i el 100%. D'altra banda, a partir dels arbres filogenètics realitzats no es va poder observar una agrupament de les seqüències associada amb la procedència geogràfica o amb el tipus de mostra.

Les tècniques desenvolupades en aquest estudi són altament sensibles i específiques en la detecció i quantificació de parvovirus de pollastre/gall d'indi. En resum, els assajos desenvolupats en aquest estudi poden ser utilitzats per a la detecció i quantificació de parvovirus de pollastre i de gall d'indi en mostres d'aigua i del medi ambient representant una nova eina per a la identificació de la contaminació fecal d'aviram al medi ambient. Malgrat els resultats prometedors obtinguts en l'estudi, és necessari continuar ampliant la base de dades analitzant més mostres en diferents àrees geogràfiques.

És evident que la contaminació viral en el medi representa un risc d'infecció important en països en vies de desenvolupament però també en zones industrialitzades on els tractaments d'aigua no aconsegueixen eliminar la totalitat dels virus presents. Durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha demostrat que, en molts casos, els mètodes de desinfecció més habituals en la inactivació de virus contaminants no són completament eficients i sovint es detecten virus infecciosos després de tractaments a les dosis o concentracions habitualment utilitzades. Aquesta observació demostra la importància de seguir treballant per a caracteritzar els diversos factors i

mecanismes particulars que condicionen la inactivació natural dels virus patògens al medi ambient, i de desenvolupar i optimitzar nous mètodes de desinfecció per assolir la inactivació d'un rang de microorganismes més ampli, més enllà dels indicadors bacterians tradicionals.

Els avanços en la virologia ambiental han d'anar forçosament acompanyats d'avenços en els tècniques i mètodes utilitzats, que han de permetre detectar, quantificar i caracteritzar els virus presents al medi de manera rutinària. En aquest sentit, els mètodes moleculars representen eines valuoses que faciliten l'estudi de diversos aspectes de la disseminació de virus al medi ambient, com per exemple identificar l'origen de la contaminació fecal per a implementar mesures de remediació a les fonts de contaminació més rellevants en cada localitat. Els virus patògens contaminants representen un problema de salut pública que cal resoldre imperativament millorant els processos de control microbiològica de recursos tant imprescindibles com són l'aigua i els aliments, introduint paràmetres virals que complementin als indicadors fecals bacterians estàndards.



5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

- **El desenvolupament dels objectius plantejats en aquesta tesi han donat lloc a una sèrie de resultats publicats o en fase de publicació, les principals conclusions dels quals es detallen a continuació:**
 - 1) La inactivació natural dels virus a l'aigua és un procés complex i multifactorial. En aigua mineral s'ha observat que el factor principal responsable de la inactivació dels HAdV és la llum solar, ja que no s'ha identificat inactivació en cap dels experiments desenvolupats a la foscor.
 - 2) En aigües complexes, com l'aigua residual i l'aigua de mar, amb una càrrega microbiològica que pot ser elevada, la llum té un efecte important en la inactivació dels HAdV en les temperatures més baixes però a 37°C, tant a la foscor com en condicions de llum, la inactivació observada és elevada i probablement estaria associada a l'activitat de microorganismes presents a l'aigua.
 - 3) S'ha definit paràmetres de temps d'inactivació ($t_{90-t_{99,99}}$) per a les diferents matrius d'aigua en presència i en absència de llum solar a les diferents temperatures estudiades.
 - 4) S'ha demostrat que les tècniques moleculars de qPCR són útils per a la detecció i quantificació de virus contaminants d'aliments. No obstant, la variació interlaboratori observada a partir dels resultats obtinguts en assajos col·laboratius remarca la necessitat d'implementar mètodes estandarditzats i materials de referència per a la detecció de virus en el control d'aliments per a millorar la seguretat alimentària.
 - 5) S'ha identificat la temperatura com el factor principal en la inactivació dels HAdV contaminants de maduixes i enciams. No s'ha observat una inactivació rellevant associada a l'efecte de la llum solar en les condicions estudiades. El valor de $t_{99,99}$ és de 24.4 hores en enciam i 4.8 hores en maduixes.
 - 6) L'ús d'una concentració entre 2,5 mg/litre de clor lliure, per a assolir una disminució significativa de la càrrega viral present en aigua de mar, requereix un temps de contacte més llarg del que habitualment s'aplica en la desinfecció d'aigües de beguda. S'ha observat partícules infeccioses de HAdV després de 60 minuts de contacte amb el clor.

- 7) S'ha demostrat que el HEV és sensible a concentracions inicials de clor lliure d'entre 1-2 mg/l i que la cinètica d'inactivació observada en aigua és estadísticament equivalent a la dels HAdV. La presència d'aigua residual (1%) redueix l'eficiència de la desinfecció i incrementa el valor de $C(t)$ de 0.41 a 11.21 mg·min/l.
- 8) Els HAdV i els JCPyV són molt resistents a la desinfecció per UVC. Després de l'exposició a una dosi de 1400 J/cm², només s'ha observat una reducció de 2 logaritmes en comparació als 4 logaritmes observats en el cas dels bacteriòfags MS2. Aquests resultats indiquen la necessitat d'utilitzar dosis més elevades de UVC en els tractaments de desinfecció per a assolir una reducció significativa en la càrrega viral de l'aigua.
- 9) L'ús de tractaments enzimàtics per a aproximar els resultats de qPCR als d'infectivitat ha generat resultats positius en el tractament de clor en aigua de mar però no en altres tractaments o matrius estudiades. Cal més estudis, incloent models matemàtics, per a desenvolupar tècniques moleculars que siguin informatives sobre la viabilitat dels virus detectats.
- 10) S'ha proposat una nova eina per al control i la identificació de la contaminació fecal d'origen animal al medi ambient, els parvovirus de pollastre i gall d'indi com a indicadors de contaminació fecal d'aviram.
- 11) Les tècniques moleculars de PCR dissenyades són sensibles i específiques per a la detecció i quantificació dels parvovirus de pollastre i gall d'indi. L'aplicació d'aquestes tècniques ha permès identificar una elevada prevalença d'infeccions asimptomàtiques per parvovirus de pollastre i gall d'indi.
- 12) El marcador dissenyat presenta una alta prevalença i elevades concentracions en explotacions d'aviram i en escorxadors de les diferents àrees geogràfiques d'Europa estudiades.

5. CONCLUSIONS

- **The objectives developed in this Thesis have led to obtain results already published or under publication, concluding the following main points:**
 - 1) The natural inactivation of viruses in the environment is a complex multifactorial process. In mineral water, the main factor responsible of HAdV inactivation is sunlight, and no inactivation was detected in the experiments performed at dark in the studied conditions.
 - 2) In complex water matrices such as wastewater and seawater, which may have a higher microbial content, sunlight plays an important role in HAdV inactivation at lower temperatures. At 37°C, both in the dark and under sunlight, HAdV inactivation is high and may be probably due to the action of biotic agents present in the water matrix.
 - 3) Inactivation parameters (t_{90} - $t_{99,99}$) for the water matrices were calculated both in presence or absence of sunlight at the studied temperatures.
 - 4) It has been shown that molecular techniques based on qPCR analysis are useful to detect and quantify viral contaminants in food. However, the inter-laboratory variations observed in the collaborative assays highlights the need of reference materials and to implement standardized detection methods to analyze viruses in food production chains.
 - 5) Temperature has been identified as the major factor interfering on the stability of HAdV in strawberry and lettuce surfaces. No inactivation due to solar radiation has been observed in the studied conditions. The $t_{99,99}$ value is 24.4 hours in lettuce and 4.8 hours in strawberries.
 - 6) A concentration of 2,5 mg of free chlorine/liter, to achieve a significant reduction of viral concentration in seawater, requires a longer contact time than is usually applied in the disinfection of drinking water. Infectious HAdV have been detected after 60 minutes of contact with chlorine.
 - 7) It has been shown that HEV is inactivated by initial concentrations of free chlorine between 1-2 mg/l, and that the inactivation kinetics are statistically equivalent to those observed for HAdV. The presence of wastewater (1%) diminished the disinfection process efficiency incrementing the C(t) value from 0.41 to 11.21 mg·min/l.

- 8)** HAdV and JCPyV are highly resistant to UVC disinfection. After exposed to a dose of 1400 J/cm², a minor decay of 2 logs was achieved as compared to 4 logs observed for MS2. These results indicate the convenience of applying higher doses of UVC to achieve a significant inactivation of viral contaminants in water.
- 9)** The use of enzymatic treatments before qPCR analysis to approximate the results to those obtained by infectivity has shown positive results in chlorine seawater treatments but not in other matrices or treatments analyzed. Further studies are required, including mathematical approaches, to develop molecular methods informative about viral viability.
- 10)** The use of Ch/tu PaV as indicators of poultry fecal contamination has been proposed as a novel tool to track fecal contamination of animal origin in the environment.
- 11)** The PCR techniques designed are sensitive and specific to detect and quantify chicken/turkey parvoviruses. Applying these techniques, a high prevalence of asymptomatic infections of Ch/Tu PaV has been detected in poultry farms and slaughterhouses.
- 12)** The developed marker is highly prevalent, in relevant concentrations, in the different geographical areas studied in Europe.



6. REFERÈNCIES

7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- A -

- Abbaszadegan M, Hasan MN, Gerba CP, Roessler PF, Wilson BR, Kuennen R, Van Dellen E. 1997. The disinfection efficacy of a point-of-use water treatment system against bacterial, viral and protozoan waterborne pathogens. *Water Research*. 31(3): 574-582.
- Abel P. 1962. Multiplicity reactivation and marker rescue with vaccinia virus. *Virology*. 17: 511-9.
- Albinana-Gimenez N, Miagostovich M, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water-treatment plants. *Water Research*, 43: 2011-2019.
- Anònim, 1992. B.O.E. 288/1992: Real Decreto 1315/1992, de 30 de octubre por el que se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril. 40563-40565.
- Anònim, 2007. B.O.E. 294/2007: Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Pp. 50639-50661.
- Anònim, 2007. Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Pp. 12-29.
- Appleton H. 2000. Control of food-borne viruses. *Br Med Bull*. 56(1):172-83.
- Atmar RL. 2006. Molecular methods of virus detection in foods. *Viruses in Foods. Food Microbiology and Food Safety Series (Goyal SM ed.)*, pp. 121–149. Springer, New York, NY.
- Atmar RL & Estes MK. 2001. Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 15–37.

- B -

- Badawy, A.S., Rose, J.B. and Gerba, C.P. 1990. Comparative survival of enteric viruses and coliphage on sewage irrigated grass. *J Environ Sci Health* 8, 937–952.
- Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, Lebeau B, Stals A, Van Coillie E, Herman L, Uyttendaele M. 2011. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol*. 151(3):261-9.
- Baert, L., C. E. Wobus, E. Van Coillie, L. B. Thackray, J. Debevere, and M. Uyttendaele. 2008. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time

- reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 543–546.
- Baker-Austin C, Rangdale R, Lowther J, Lees DN. 2010. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Sci. Technol.* 61:1–7.
 - Ballester NA, Malley JP. 2004. Sequential Disinfection of adenovirus type 2 with UV-Chlorine-Chloramine. *Journal American Water Works Association.* 96(10): 97-103.
 - Baxter CS, Hofmann R, Templeton MR, Brown M, Andrews RC. 2007. Inactivation of adenovirus types 2, 5, and 41 in drinking water by UV light, free chlorine, and monochloramine. *J Environ Eng.* 133:95-103.
 - Bernhard AE, Field KG. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1587-94.
 - Bertrand, I., Schijven, J., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A. M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N. Gantzer, C. 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology.* 112 1059-1074.
 - Bhattacharya SS, Kulka M, Lampel KA, Cebula TA, Goswami BB. 2004. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *J Virol Methods.* 2 15;116(2): 181-7.
 - Bidin M, Lojkić I, Bidin Z, Tiljar M, Majnarić D. 2011. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia. *Avian Dis.* 55:693– 696.
 - Bitton, G. (1999) *Wastewater Microbiology*, 2nd edn. New York: Wiley- Liss.
 - Black S, Thurston JA, Gerba CP. 2009. Determination of Ct values for chlorine of resistant enteroviruses. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 44:336-9.
 - Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson, MA, et al. 2006. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000–2004. *J Infect Dis.* 193:413–21.
 - Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *App Environ Micro.* 72(12): 7894-7896.
 - Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 66(1): 238-45.

- Boxman I, Dijkman R, Verhoef L, Maat A, van Dijk G, Vennema H, Koopmans M. 2009. Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study. *J Food Prot.* 72(8): 1753-5.
- Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R. Sanchez, G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl Environ Microbiol* 75, 4155–4161.

- C -

- Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, Girones R. 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods.* 153(2):79-83.
- Cannon, R.O., Poliner, J.R., Hirschhorn, R.B., Rodeheaver, D.C., Silverman, P.R., Brown, E.A., Talbot, G.H., Stine, S.E. et al. 1991. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with the consumption of commercial ice. *J Infect Dis* 164, 860–863.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 69:2761–2765.
- Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM. 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio.* 4; 2(5).
- Carter, MJ. 2005 Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1354-1380.
- Carvalho C, Thomas H, Balogun K, Tedder R, Pebody R, Ramsay M, Ngui S. 2012. A possible outbreak of hepatitis A associated with semi-dried tomatoes, England, July-November 2011. *Euro Surveill.* 9;17(6).
- Casteel MJ, Schmidt CE, Sobsey MD. 2008. Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *Int J Food Microbiol.* 31; 125(3): 267-73.
- Chang JC, Ossoff SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD. 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 49(6): 1361-5.
- Chandra V, Kalia M, Hajela K, Jameel S. 2010. The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex. *J Virol.* 84(8): 3857-67.
- Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. Margolin, A.B. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and

- evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 66, 2520–2525.
- Charles, K.J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A. Pedley, S. 2009. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J Appl Microbiol* 106, 1827–1837.
 - Chen YS, Vaughn JM. 1990. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Appl Environ Microbiol*. 56(5):1363-6.
 - Chung, H.M., Jaykus, L.A. and Sobsey, M.D. 1996. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl Environ Microbiol* 62, 3772–3778.
 - Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardí R, Martín M, Bofill-Mas S, Girones R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis*. 9(4): 448-54.
 - Cooper WJ, Zika RG, Petasne RG, Fischer AM. 1989. In *Aquatic Humic Substances*; Suffet IH, McCarthy P. Eds; American Chemical Society. Washington DC.
 - Cooper PF. Historical aspects of wastewater treatment. In: *Decentralized sanitation and reuse concepts, systems and Implementation*. Lens P, Zeeman G, Lettinga G, eds. IWA Publishing. London (UK). 2001; 11-38.
 - Cossaboom CM, Córdoba L, Cao D, Ni YY, Meng XJ. 2012. Complete genome sequence of hepatitis E virus from rabbits in the United States. *J Virol*. 86(23): 13124-5.
 - Crabtree, K.D., Gerba, C.P., Rose, J.B. and Haas, C.N. 1997. Waterborne adenoviruses – a risk assessment. *Water Sci Technol* 35, 1–6.
 - Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol*. 73(1): 29-34.
 - Cromeans TL, Kahler AM, Hill VR. 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl Environ Microbiol*. 76(4): 1028-33.
 - Cutler T, Wang C, Qin Q, Zhou F, Warren K, Yoon KJ, Hoff SJ, Ridpath J, Zimmerman J. 2011. Kinetics of UV(254) inactivation of selected viral pathogens in a static system. *J Appl Microbiol*. 111(2): 389-95.
 - Curtis TP, Mara DD, Silva SA. 1992. Influence of pH, Oxygen, and Humic Substances on Ability of Sunlight To Damage Fecal Coliforms in Waste Stabilization Pond Water. *Appl Environ Microbiol*. 58(4): 1335-43.

- D -

- D'Agostino, M., Cook, N, Rodríguez-Lázaro, D., and Rutjes, S. 2011. Nucleic acid amplification-based methods for detection of enteric viruses: definition of controls and interpretation of results. *Food Environ. Virol.* 3: 55-60.
- Davies, K. J. A., S. W. Lin, and R. E. Pacifici. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 4. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 262: 9914–9920.
- Davies-Colley R.J, Donnison A.M, Speed D.J. 1997. Sunlight wavelenghts inactivating faecal indicator microorgansims in waste stabilization ponds. *Water Sci. Technol.* 35, 219-225.
- Davies-Colley R.J, Donnison A.M, Speed D.J, Ross C.M, Nagels J.W. 1999. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Res.* 33, 1220-1230.
- Dawson DJ, Paish A, Staffell LM, Seymour IJ, Appleton H. 2005. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J Appl Microbiol*, 98(1):203-9.
- Day JM, Zsak L. 2010. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. *Virology* 399:59–64.
- Deboosere N, Legeay O, Caudrelier Y, Lange M. 2004. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *Int J Food Microbiol.* 93(1): 73-85.
- Deborde M, Von Gunten U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment– kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Res.* 42:13–51.
- de Roda Husman AM & Bartram J. 2008. Global supply of virus safe drinking-water. *Human Viruses in Water* (Bosch A, ed.), pp. 127–162. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Din AMS, Rasheed AA, Hammoud AA. 2000. On the chlorination of seawater. *Desalination* 129: 53– 62.
- D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C, Jaykus L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol.* 108(1): 84-91.
- Duizer, EP. Bijkerk, B. Rockx, A. De Groot, F. Twisk, and M. Koopmans. 2004. Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4538–4543.

- E -

- Enriquez, C.E., Hurst, C.J. Gerba, C.P. 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. *Water Res.* 29, 2548–2553.
- Ethelberg S, Lisby M, Bottiger B, Schultz AC, Villif A, Jensen T, Olsen KE, Scheutz F, Kjølso C, Muller L. 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark. *Euro Surveill.* 11; 15(6).
- Eischeid AC, Meyer JN, Linden KG. 2009. UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:23-28.

- F -

- Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol.* 123(1-2): 32-7.
- Field KG, Samadpour M. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41(16): 3517-38.
- Fong TT, Lipp EK. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2): 357-71.
- Fong TT, Phanikumar MS, Xagoraki I, Rose JB. 2010. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol.* 76(3): 715-23.
- Formiga-Cruz M, Tofiño-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Conden-Hansson AC, Hernroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones MD, Girones R. 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 68(12): 5990-8.
- Fournet N, Baas D, van Pelt W, Swaan C, Ober H, Isken L, Cremer J, Friesema I, Vennema H, Boxman I, Koopmans M, Verhoef L. 2012. Another possible food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands indicated by two closely related molecular sequences, July to October 2011. *Euro Surveill.* 9; 17(6).

- Fujioka, R.S., Loh, P.C. Lau, L.S. 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 39, 1105–1110.
- Fumian TM, Guimarães FR, Pereira Vaz BJ, da Silva MT, Muylaert FF, Bofill-Mas S, Gironés R, Leite JP, Miagostovich MP. 2010. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 8(3):438-45.

- G -

- Galasso GJ, Sharp DG. 1965. Effect of particle aggregation on the survival of irradiated vaccinia virus. *J Bacteriol*. 90(4): 1138-42.
- Gallot C, Grout L, Roque-Afonso AM, Couturier E, Carrillo-Santistevé P, Pouey J, Letort MJ, Hoppe S, Capdepon P, Saint-Martin S, De Valk H, Vaillant V. 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerg Infect Dis*, 17(3):566-7.
- Gerba, C.P. Rose, J.B. 1990. Viruses in source and drinking water. In *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*, Chapter 18 ed. McFeters, G.A. pp. 381–396. New York: Springer Verlag.
- Gerba, C.P., Rose, J.B., Hass, C.N. Crabtree, K.D. 1996. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res* 30, 2929–2940.
- Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol*. 68(10):5167-9.
- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. 2010. Molecular detection of pathogens in water: the pros and cons of molecular techniques. *Water Res*. 44(15):4325-39.
- Girones R, Jofre J, Bosch A. 1989a. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 35 (11), 1015-1021.
- Girones R, Jofre J, Bosch, A. 1989b. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *Journal of Environmental Quality*, 18 (1), 34-39.
- Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med*. 361, 1776–1785.
- Godfree A, Farrell J. Processes for managing pathogens. *J Environ Qual*. 2005; 34(1): 105-13.
- Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.M. and Zmirou, D. 2003. Are waterborne astroviruses implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *J Clin Microbiol*. 27, 74–82.

- Gordon C, Toze S. 2003. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *J Appl Microbiol.* 95: 536-544.
- Goyal SM. 2006. Methods of virus detection in foods. *Viruses in Foods* (Goyal SM, ed.), pp. 101–119. *Food Microbiology and Food Safety Series*. Springer, New York.
- Griffin, D.W., Gibson, C.J., Lipp, E.K., Riley, K., Paul, J.H. Rose, J.B. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Appl Environ Microbiol* 65, 4118–4125.
- Guan Y, et al. 2000. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* 74:9372–9380.
- Gwenzi W, Munondo R. 2008. Long-term impacts of pasture irrigation with treated sewage effluent on shallow groundwater quality. *Water Sci Technol.* 58(12): 2443-52.

- H -

- Haas CN, Karra SB. 1984. Kinetics of Wastewater Chlorine Demand Exertion. *Water Pollution Control Federation.* 56(2): 170-173.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. Meng, X. J. 2001 Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 82, 2449–2462.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S. 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res.* 44(6):1747-52.
- Havelaar AH, Pot-Hogeboom WM, Furuse K, Pot R, Hormann MP. 1990. F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *J Appl Bacteriol.* 69(1): 30-7.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986–994.
- Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 40(1): 3-22.
- Hoigné J, Faust BG, Haag WR, Sully FE, Zepp RG. 1989. In *Aquatic Humic Substances*; Suffet IH, McCarthy P. Eds; American Chemical Society. Washington DC

- Hotze EM, Badireddy AR, Chellam S, Wiesner MR. 2009. Mechanisms of bacteriophage inactivation via singlet oxygen generation in UV illuminated fullerol suspensions. *Environ Sci Technol.* 43(17): 6639-45.
- Hundesa A, Bofill-Mas S, Maluquer de Motes C, Rodriguez-Manzano J, Bach A, Casas M, Girones R. 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods.* 163(2): 385-9.
- Hundesa A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, Rosina Girones R. 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods.* 158(1-2):130-5.
- Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N. & Girones, R. 2006 Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(12), 7886–7893.
- Hunter PR. *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology.* Ed.: J. Wiley & Sons. 1997.
- Hurst CJ, Benton WH, McClellan KA. 1989. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can J Microbiol.* 35(4): 474-80.
- Hsieh S, Meng X, Wu Y, Liu S, Tam A, Lin D, Liaw Y. 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.* 37(12): 3828-34.
- Hsu CC, Riley LK, Livingston RS. 2007. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes.* 34(2): 147-55.

- | -

- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo CG. 2005. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis.* 192(7): 1166-72.
- ISO 5667-1:2006. *Water quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques.*
- ISO 18593:2004. *Surface sampling techniques, with contact plates and swabs.*

- J -

- Jagger, J. 1985. Solar-UV actions on living cells. Praeger Publishers, New York.
- Jiménez-Clavero MA, Fernández C, Ortiz JA, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV, Roblas N, Ley V. 2003. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl Environ Microbiol.* 69(10): 6311-5.

- K -

- Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. 1999. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol.* 73(10):8848-50.
- Kahler AM, Cromeans TL, Roberts JM, Hill VR. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:5159-5164
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. 2012. Hepatitis E. *Lancet.* 30;379(9835):2477-88.
- Kaplan, J.E., Goodman, R.A., Schonberger, L.B., Lippy, E.C. Gary, G.W. 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis.* 146, 190–197.
- Khan, A. 2006. Device physics: A bug-beating diode. *Nature* 441, 299.
- Kohn T, Nelson KL. 2007. Sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage via exogenous singlet oxygen produced by sensitizers in natural waters. *Environ Sci Technol.* 1; 41(1): 192-7.
- Koivunen J, Heinonen-Tanski H. 2005. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Res.* 39(8): 1519-26.
- Koopmans M & Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 90: 23–41.
- Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, Sener K, Durmaz R. 2011. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiol.* 34(1):17-24.
- Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M.L., Maunula, L., Bonsdorff, C.H.V. Jaatinen, P. 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 29, 415–418.

- 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.
- Kurdziel AS, Wilkinson N, Langton S, Cook N. 2001. Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *J Food Prot*, 64(5):706-9.
- Kutz SM, Gerba CP. 1988. Comparison of Virus Survival in Freshwater Sources. *Water Science & Technology*. 20; 11-12:467–471.

- L -

- Lamhoujeb, S., I. Fliss, S. E. Ngazoa, and J. Jean. 2008. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3349–3355.
- Langford, M. 2005. The United Nations Concept of Water as a Human Right: A New Paradigm for Old Problems? *Water Resources Development*. 21 (2):273–282.
- La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. 2008. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol.* 153(11):2077-83.
- Laverick, M.A. Wyn-Jones A.P, Carter M.J. 2004. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett. Appl. Microbiol*, 39 (2):127–136.
- Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. 2010. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109: 539 –547.
- Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferré V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol.* 155(1): 11-5.
- Lee R, Lovatelli A, Ababouch L. 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Fisheries technical paper 511. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 59, 81–116.
- Ley V, Higgins J, Fayer R. 2002. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.* 68(7): 3455-61.

- Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.* 11(12): 1958-60.
- Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. 2002. Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 68(10): 4951-5.
- Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. 2004. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Res.* 38(6): 1514-9.
- Lin PF, Howard-Flanders P. 1976. Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage λ DNA molecules: the role of DNA replication. *Molecular and General Genetics.* 146 (2): 107-15.
- Lodder WJ, Vinjé J, van De Heide R, de Roda Husman AM, Leenen EJ, Koopmans MP. 1999. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol.* 65(12): 5624-7.
- Love DC, Silverman A, Nelson KL. 2010. Human virus and bacteriophage inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage inactivation at a southern California beach. *Environ Sci Technol.* 15; 44(18): 6965-70.
- Luria SE, Dulbecco R. 1949. Genetic Recombinations Leading to Production of Active Bacteriophage from Ultraviolet Inactivated Bacteriophage Particles. *Genetics.* 34(2): 93-125.

- M -

- Mani B, et al. 2007. Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion* 47:1765–1774.
- Martellini A, Payment P, Villemur R. 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* 39(4): 541-8.
- Mattle MJ, Kohn T. 2012. Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environ Sci Technol.* 46(18): 10022-30.
- McGuigan KG, Conroy RM, Mosler HJ, du Preez M, Ubomba-Jaswa E, Fernandez-Ibañez P. 2012. Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. *J Hazard Mater.* 235-236:29-46.

- McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. 2009. Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by Taq-Man quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3379–3388.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5(5): 607-25.
- Melnick JL, Gerba CP, Wallis C. Viruses in water. *Bull World Health Organ.* 1978; 56(4): 499-508.
- Melnick JL, Gerba CP. 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *CRC Critical Reviews in Environmental Control.* 10, 65.
- Mena KD, Gerba CP, Ver. *Environ. Contam. Toxicol*, 2009, 198, 133.
- Meng XJ, Purcell RH, Halburg PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(18):9860-5.
- Muniesa M, Payan A, Moce-Llivina L, Blanch AR, Jofre J. 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43: 1559–1564.
- Mushahwar IK. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol.* 80(4):646-58.

- N -

- Nenonen NP, Hannoun C, Larsson CU, Bergström T. 2012. Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. *Appl Environ Microbiol.* 2012. 78(6): 1846-52.
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, van der Giessen J, Kruse H. 2010. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol.* 30; 139 Suppl 1: S3-15.
- Nieuwstad TJ, Havelaar AH. 1994. The kinetics of batch ultraviolet inactivation of bacteriophage-MS2 and microbiological calibration of an ultraviolet pilot-plant. *J Environ Sci Health A.* 29(9), 1993-2007.
- Nuanualsuwan, S. Cliver, DO. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J. Virol. Methods* 104: 217–225.

- Nuanualsuwan, S., Cliver, DO. 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 350–357.

- O -

- O'Brien, R.; Newman, J. 1979. Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (6), 1034–1039.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res. Commun.* 289(5): 929-36.
- Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. 2010. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 7(6): 2620-37.

- P -

- Page MA, Shisler JL, Mariñas BJ. 2009. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Res.* 43:2916-26.
- Palade EA, Demeter Z, Hornyák A, Nemes C, Kisary J, Rusvai M. 2011. High prevalence of turkey parvovirus in turkey flocks from Hungary experiencing enteric disease syndromes. *Avian Dis.* 55(3): 468-75.
- Palade EA, Kisary J, Benyeda Z, Mándoki M, Balka G, Jakab C, Végh B, Demeter Z, Rusvai M. 2011. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian Pathol.* 40(2):191-7.
- Papapetropoulou M, Vantarakis AC. 1998. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *J Infect.* 36(1):101-3.
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 44(1):1-8.
- Payan A, Ebdon J, Taylor H, Gantzer C, Ottoson J, Papageorgiou GT, Blanch AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M. 2005. Method for isolation of Bacteroides bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol.* 71(9): 5659-62.
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E., Prevost, M. 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int J Environ Health Res* 7, 5–31.

- Pecson BM, Martin LV, Kohn T. 2009. 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.* 75(17): 5544-54.
- Pereira LS, Cordery I, Iacovides I. 2009. *Coping with water scarcity: Addressing the challenges.* Berlin, Germany: Springer.
- Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, Gómez MT, Moreira V. 2007. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg.* 77(5):893-6.
- Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol.* 33(5):826-33.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3376-3382.
- Ponka, A., Maunula, L., Von Bonsdorff, C.-H. and Lyytikäinen, O. 1999. An outbreak of Calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol Infect* 123, 469–474.
- Poschetto, L. F., A. Ike, T. Papp, U. Mohn, R. Bohm, and R. E. Marschang. 2007. Comparison of the sensitivities of noroviruses and feline calicivirus to chemical disinfection under field-like conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5494–5500.
- Prinsze, C., Dubbelman T.R., and J. Vansteveninck. 1990. Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1038: 152–157.
- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. 1994. Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 60(8):2963-70.
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. 2008. *J Hepatol.* 48(3):494-503.

- R -

- Raphael, R.A., Sattar, S.A. and Springthorpe, V.S. 1985. Long term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol* 31, 124–128.

- Reed RH. 1997. Solar inactivation of faecal bacteria in water: the critical role of oxygen. *Lett Appl Microbiol.* 24(4):276-80.
- Regli, S., Rose, J.B., Haas, C.N. Gerba, C.P. 1991. Modelling the risk from Giardia and viruses in drinking water. *J Am Water Works Assoc* 83, 76–84.
- Reid, T.M.S. and Robinson, H.G. 1987. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol Infect* 98, 109–112.
- Reopanichkul P, Schlacher TA, Carter RW, Worachananant S. 2009. Sewage impacts coral reefs at multiple levels of ecological organization. *Mar Pollut Bull.* 58(9):1356-62.
- Repp KK, Keene WE. 2012. A point-source norovirus outbreak caused by exposure to fomites. *J Infect Dis.* 205(11):1639-41.
- Riera-Montes M, Brus Sjölander K, Allestam G, Hallin E, Hedlund KO, Löfdahl M. 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol Infect.* 139(12): 1928-35.
- Rodríguez RA, Pepper IL, Gerba CP. 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 75(2):297-307.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzeżutka A, Bosch A, Gironés R, Carducci A, Muscillo M, Kovač K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff CH, de Roda Husman AM, Hernández M, van der Poel WH. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 36(4): 786-814.
- Rodríguez-Lázaro D, Lombard B, Smith HV et al. 2007. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci Technol* 18: 306–319.
- Rodríguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R. 2012. Standard and new fecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.* 66(12): 2517-23.
- Rodríguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jardi R, Girones R. 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health.* 8(2): 346-54.
- Romero OC, Straub AP, Kohn T, Nguyen TH. 2011. Role of temperature and Suwannee River natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environ Sci Technol.* 45(24): 10385-93.

- Roslev P, Bukh AS. 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89(5): 1341-55.
- Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, Vennema H, Duizer E, Koopmans M, de Roda Husman AM. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(3):381-7.
- Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, van Duijnhoven YT, de Roda Husman AM. 2006. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J Food Prot.* 69(8): 1949-56.
- Rzezutka A, Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* 28(4): 441-53

- S -

- Sano D, Pintó RM, Omura T, Bosch A. 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environ Sci Technol.* 44(2):808-12.
- 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(2): 260-7.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2009. Testing thermal resistance of viruses. *Arch. Virol.* 154: 115–119.
- Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol.* 2001; 65(2): 282-92.
- Schuch AP, Menck CF. 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J Photochem Photobiol B.* 1; 99(3):111-6.
- Scotter SL, Langton S, Lombard B, Schulten N, Nagelkerke N, In't Veld PH, Rollier P, Lahellec C. 2001. Validation of ISO method 11290 part 1--detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol* 64:295.
- Sedlak DL, von Gunten U. 2011. Chemistry. The chlorine dilemma. *Science.* 7; 331(6013):42-3.
- Sharp DG, Kim KS. 1966. Multiplicity reactivation and radiation survival of aggregated vaccinia virus. Calculation of plaque titer based on MR and particle aggregation seen in the electron microscope. *Virology.* 29(3): 359-66.

- Shin GA, Lee JK, Linden KG. 2009. Enhanced effectiveness of medium-pressure ultraviolet lamps on human adenovirus 2 and its possible mechanism. *Water Sci Technol.* 60(4):8517.
- Shin GA, Sobsey MD. 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl Environ Microbiol.* 69(7): 3975-8.
- Shin GA, Sobsey MD. 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42(17): 4562-8.
- Simonet J, Gantzer C. 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl Environ Microbiol.* 72(12): 76717.
- Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol.* 68(3): 1122-31.
- Sirikanchana K, Shisler JL, Mariñas BJ. 2008. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. *Water Res.* 42(6-7): 1467-74.
- Slomka, M.J. and Appleton, H. 1998. Feline calicivirus as a model system for heat-inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiol Infect* 121, 401–407.
- Smith AJ, McCarthy N, Saldana L, Ihekweazu C, McPhedran K, Adak GK, Iturriza-Gómara M, Bickler G, O'Moore É. 2012. A large foodborne outbreak of norovirus in diners at a restaurant in England between January and February 2009. *Epidemiol Infect.* 140(9): 1695-701.
- Sobsey, M. D., D. A. Battigelli, G. A. Shin, and S. Newland. 1998. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Sci. Technol.* 38:91–94.
- Staatscourant. 2001. Dutch Drinking Water Decree, Jan 9th 2001. The Hague, the Netherlands: Dutch Government.
- Stapleton CM, Wyer MD, Kay D, Crowther J, McDonald AT, Walters M, Gawler A, Hindle T. 2007. Microbial source tracking: a forensic technique for microbial source identification? *J Environ Monit.* 9(5): 427-39.
- Stewart, D. J.; Napolitano, M. J.; Bakmutova-Albert, E. V.; Margerum, D. W. 2008. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide oxidation of tryptophan. *Inorg. Chem.* 47 (5), 1639–1647.
- Stoeckel DM, Harwood VJ. 2007. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol.* 73(8):2405-15.

- Sundsfjord A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. 1994. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol.* 32(5):1390-4.

- T -

- Tarasiuk K, Wozniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. 2012. Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland. *Open Virol. J.* 6:7–11.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. 2004. 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.* 74(1):67-70.
- Templeton MR, Andrews RC, Hofmann R. 2005. Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Res.* 39(15): 3487-500.
- ter Waarbeek HL, Dukers-Muijers NH, Vennema H, Hoebe CJ. 2010. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J Clin Virol.* 47(3): 268-72.
- Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 80(8):1468-76.
- Thompson, S. S., J. L. Jackson, M. Suva-Castillo, W. A. Yanko, Z. El Jack, J. Kuo, C. L. Chen, F. P. Williams, and D. P. Schnurr. 2003. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ. Res.* 75: 163–170.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol.* 69(7): 3979-85.
- Topping JR, Schnerr H, Haines J, Scott M, Carter MJ, Willcocks MM, Bellamy K, Brown DW, Gray JJ, Gallimore CI, Knight AI. 2009. Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *J Virol Methods.* 156(1-2): 89-95.

- Toropova, K.; Basnak, G.; Twarock, R.; Stockley, P. G.; Ranson, N. A. 2008. The Three-dimensional Structure of Genomic RNA in Bacteriophage MS2: Implications for Assembly. *J. Mol. Biol.* 375 (3), 824–836.
- Tree, J. A., Adams, M. R. & Lees, D. N. 2003. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2038–2043.

- U -

- Urbanucci A, Myrmel M, Berg I, von Bonsdorff CH, Maunula L. 2009. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *Int J Food Microbiol.* 135(2):175-8.
- USA EPA (1991) Guidance Manual for Compliance with the Filtration and Disinfection Requirements for Public Water Systems Using Surface Water Sources. Washington, DC: EPA Press.

- V -

- Vasickova P, Psikal I, Widen F, Smitalova R, Bendova J, Pavlik I, Kralik P. 2009. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Sci.* 87(1):143-8.
- Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, Koopmans M; Food-Borne Viruses in Europe Network. 2010. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 16(4):617-24.
- Vivancos R, Shroufi A, Sillis M, Aird H, Gallimore CI, Myers L, Mahgoub H & Nair P. 2009. Food-related norovirus outbreak among people attending two barbeques: epidemiological, virological, and environmental investigation. *Int J Infect Dis* 13: 629–635.

- W -

- Waar K, Herremans MM, Vennema H, Koopmans MP, Benne CA. 2005. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J Clin Virol.* 33(2):145-9.
- Wadell, GA. Allard, L. Svensson, I. Uhnoo. 1988. Enteric adenoviruses. In: M. Farthing (Ed.), *Viruses and The Gut*, Proceedings of the Ninth BSG-SK&F International Workshop, Swan Press Ltd., London, UK (1988), pp. 71–78

- Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F., & Metzler, A. 1994. Solar water disinfection: Scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*, 43(4), 154-169.
- Whitehead K, McCue KA. 2010. Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. *Am J Infect Control*. 38(1):26-30.
- WHO [World Health Organization]. WHO Report on Diarrhoeal disease. 2009. Disponible a: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>.
- Wigginton, K. R.; Menin, L.; Montoya, J. P.; Kohn, T. 2010. Oxidation of virus proteins during UV254 and singlet oxygen mediated inactivation. *Environ. Sci. Technol.* 44 (14), 5437–5443.
- Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol.* 46(21):12069-78.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80:5104–5112.
- Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007: 2395-436.
- Wyn-Jones AP, Pallin R, Dedoussis C, Shore J, Sellwood J. 2000. The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Methods*. 87(1-2):99-107.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 91(6):945-62.

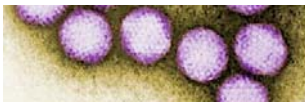
- Y -

- Yarbough PO. 1999. Hepatitis E virus: Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches. *Intervirolgy*. 42(2-3):179-84.
- Yates MV, Gerba CP, Kelley LM. 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl Environ Microbiol.* 49:778-81.
- Yates MV, Stetzenbach LD, Gerba CP, Sinclair NA. 1990. The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water. *J Environ Scientific Health*, 25:81-100.
- Yen C, Wikswo ME, Lopman BA, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. 2011. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clin Infect Dis*. 53(6):568-71.

- Young DC, Sharp DG. 1979. Partial reactivation of chlorine-treated echovirus. Appl Environ Microbiol. 37(4):766-73.

- Z -

- Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology. 346:312-23.
- Zsak L, Strother KO, Day JM. 2009. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. Avian Dis. 53:83– 88.



7. ANNEX

7. ANNEX

- **A continuació es detallen per ordre cronològic altres publicacions no incloses en aquesta tesi:**
- 1) **Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Carratala A, Buti M, Jordi R, Girones R.** 2010. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health* 8(2):346-54.
 - 2) **Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Carratala A, Girones R.** 2010. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virol J.* 28;7:141.
 - 3) **Girones R, Ferrus MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Correa AA, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S.** 2010. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44(15):4325-39.
 - 4) **Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Hundesa A, Girones R.** 2011. Occurrence of waterborne enteric viruses in two settlements of eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. *J Water Health.* 9(3): 515-524.
 - 5) **Bofill-Mas S, Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Carratala A, Rusiñol M, Guerrero L, Girones R.** 2012. Cost-Effective Applications of Human and Animal Viruses as Microbial Source-Tracking Tools in Surface Waters and Groundwater. Chapter in "Faecal Indicators and pathogens. Proceedings of the 2011 FIPs Conference." Edinburgh. Royal Society of Chemistry, London. Kay, D. and Fricker, C. (Eds) (2012) p 90-101.
 - 6) **Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrus MA, Moreno Y, Amoros I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R.** Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants: microbiological parameters for improving the Control of Reclaimed Water. *Water Sci Technol.* 66 (12): 2517-23.
 - 7) **Rusiñol M, Carratalà A, Hundesa A, Bach A, Kern A, Vantarakis A, Girones R, Bofill-Mas S.** Description of a novel polyomavirus (OPyV) as a tool to identify and quantify faecal pollution derived from sheep. *Sotmès.*

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

ABBREVIATIONS

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



SHORT REPORT

Open Access

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

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

Abstract

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

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

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

Findings

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

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

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

* Correspondence: sbofill@ub.edu

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

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



Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques

Rosina Girones^{a,*}, Maria Antonia Ferrús^b, José Luis Alonso^c, Jesus Rodriguez-Manzano^a, Byron Calgua^a, Adriana de Abreu Corrêa^{a,d}, Ayalkibet Hundesa^a, Anna Carratala^a, Sílvia Bofill-Mas^a

^a Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Biotechnology, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

^c Institute of Water Engineering and Environment, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain

^d Department of Microbiology and Parasitology, Laboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2010

Received in revised form

10 June 2010

Accepted 14 June 2010

Available online 19 June 2010

Keywords:

Pathogen

Water

Virus

Protozoa

Bacteria

PCR

ABSTRACT

Pollution of water by sewage and run-off from farms produces a serious public health problem in many countries. Viruses, along with bacteria and protozoa in the intestine or in urine are shed and transported through the sewer system. Even in highly industrialized countries, pathogens, including viruses, are prevalent throughout the environment. Molecular methods are used to monitor viral, bacterial, and protozoan pathogens, and to track pathogen- and source-specific markers in the environment. Molecular techniques, specifically polymerase chain reaction-based methods, provide sensitive, rapid, and quantitative analytical tools with which to study such pathogens, including new or emerging strains. These techniques are used to evaluate the microbiological quality of food and water, and to assess the efficiency of virus removal in drinking and wastewater treatment plants. The range of methods available for the application of molecular techniques has increased, and the costs involved have fallen. These developments have allowed the potential standardization and automation of certain techniques. In some cases they facilitate the identification, genotyping, enumeration, viability assessment, and source-tracking of human and animal contamination. Additionally, recent improvements in detection technologies have allowed the simultaneous detection of multiple targets in a single assay. However, the molecular techniques available today and those under development require further refinement in order to be standardized and applicable to a diversity of matrices. Water disinfection treatments may have an effect on the viability of pathogens and the numbers obtained by molecular techniques may overestimate the quantification of infectious microorganisms. The pros and cons of molecular techniques for the detection and quantification of pathogens in water are discussed.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: MST, microbial source-tracking; HAdV, human adenoviruses; HAV, hepatitis A virus; HEV, hepatitis E virus; JCPyV, human polyomavirus JC; BKPyV, human polyomavirus BK; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase PCR; NASBA, acid sequence-based amplification; CFU, colony-forming units; mPCR, multiplex PCR; IFAs, immunofluorescent assays; IMS, immunomagnetic separation; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; mRNA, messenger RNA; PAdV, porcine adenoviruses; BPyV, bovine polyomaviruses; EMA, ethidium monoazide; PMA, propidium monoazide; VBNC, viable non-culturable; PBS, phosphate buffered saline; nPCR, nested-PCR.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1483; fax: +34 93 403 9047.

E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones).

0043-1354/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2010.06.030

Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources

Laura Guerrero-Latorre, Anna Carratala, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Ayalkibet Hundesa and Rosina Girones

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a common cause of water-borne acute hepatitis in areas with poor sanitation. In 2004 an outbreak of HEV infection affected around 2,000 people in Eastern Chad (Dar Sila). This paper describes the decrease in the incidence of acute jaundice syndrome (AJS) from 2004 until 2009 when a mean incidence of 0.48 cases/1,000 people/year was recorded in the region. Outbreaks of AJS were identified in some of the camps in 2007 and 2008. Moreover, water samples from drinking water sources were screened for human adenoviruses considered as viral indicators and for hepatitis A virus and HEV. Screening of faecal samples from donkeys for HEV gave negative results. Some of the samples were also analysed for faecal coliforms showing values before disinfection treatment between 3 and >50 colony forming units per 100 mL. All water samples tested were negative for HEV and HAV; however, the presence of low levels of human adenoviruses in 4 out of 16 samples analysed indicates possible human faecal contamination of groundwater. Consequently, breakdowns in the treatment of drinking water and/or increased excretion of hepatitis viruses, which could be related to the arrival of a new population, could spread future outbreaks through drinking water.

Key words | acute jaundice syndrome, drinking-water, Eastern Chad, HEV, HAdV, humanitarian action

Laura Guerrero-Latorre
Intermon Oxfam Humanitarian Action Program,
C/Roger de Llúria, 15,
08010 Barcelona,
Spain

Laura Guerrero-Latorre
Anna Carratala
Jesus Rodriguez-Manzano
Byron Calgua
Ayalkibet Hundesa
Rosina Girones (corresponding author)
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona,
Avd. Diagonal 645,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: rgirones@ub.edu

ABBREVIATIONS

AJS	acute jaundice syndrome	PCR	polymerase chain reaction
EWARS	Early Warning Alert and Response System	qPCR	quantitative polymerase chain reaction
GC	genomic copies	RT-PCR	reverse transcription-PCR
HAdV	human adenoviruses	SD	standard deviation
HAV	hepatitis A Virus	UV	ultraviolet
HEV	hepatitis E Virus	WaSH	water, sanitation and hygiene
IDPs	internally displaced persons		
NCBI	National Center for Biotechnology Information		
nPCR	nested PCR		
ORF1	open reading frame 1		
ORF2	open reading frame 2		
PBS	phosphate-buffered saline		

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) and hepatitis A virus (HAV) are small, non-enveloped viruses that contain positive sense

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

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

ABSTRACT

This study involved collaboration between three centres with expertise in viruses, bacteria and protozoa. The focus of the research was the study of the dissemination and removal of pathogens and faecal indicators in two sewage treatment plants (STPs) using tertiary treatments. Samples were collected over a period of 5 months through a sewage treatment processes. Analysis of the samples revealed that the plants were not efficient at removing the faecal indicators and pathogens tested during the study. From entry point (raw sewage) to effluent level (tertiary treatment effluent water), the experimental results showed that the reduction ratios of human adenoviruses were $1.2 \log_{10}$ in STP1 and $1.9 \log_{10}$ in STP2. Whereas for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. the reduction ratios were $2.3 \log_{10}$ for both pathogens in STP1, and 3.0 and $1.7 \log_{10}$ in STP2, respectively. Furthermore, the presence of faecal indicators and pathogens at different sampling points was evaluated revealing that the tested pathogens were present in reclaimed water. Human adenovirus and *Arcobacter* spp. showed positive results in infectivity assays for most of the tertiary effluent water samples that comply with current legislation in Spain (Real Decreto 1620/2007). The pathogens detected must be evaluated using a risk assessment model, which will be essential for the development of improved guidelines for the re-use of reclaimed water.

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

