Departamento de Microbiología y Parasitología
CIBUS-Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela

DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MOLUSCOS Y MUESTRAS CLÍNICAS. GENOTIPADO Y ESTUDIO POBLACIONAL.

Carmen Fernández Manso
2013

Departamento de Microbiología y Parasitología
CIBUS-Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela

DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MOLUSCOS Y MUESTRAS CLÍNICAS. GENOTIPADO Y ESTUDIO POBLACIONAL.

Memoria que presenta
Carmen Fernández Manso
para optar al grado de
Doctor en Biología



Fdo: Carmen Fernández Manso
Santiago de Compostela,
Julio 2013

Jesús López Romalde, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

Informa: que la presente Tesis Doctoral titulada: "**Detección de Norovirus y virus de la hepatitis A en moluscos y muestras clínicas. Genotipado y estudio poblacional",** que presenta **Carmen Fernández Manso** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología bajo mi dirección, y considerando que se haya concluida, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente

En Santiago de Compostela, a 24 de julio de 2013



Dr. Jesús L. Romalde

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación 10MMA200010PR subvencionado por la Direccion Xeral de I + D de la Xunta de Galicia, dentro del programa sectorial de investigación de Tecnología del Medio Marino.

Durante el desarrollo del mismo, he disfrutado de una beca predoctoral de la Xunta de Galicia.

Imagen de portada:
Título: *Norovirus (formerly Norwalk virus) particle, computer model.*
Fuente: http://www.sciencephoto.com/media/468638/view

Agradecimientos

Sois muchas la personas que de una u otra forma habéis estado conmigo durante todo este tiempo, y a todos vosotros me gustaría daros las gracias.

A mi director, el Dr. Romalde, por acogerme en tu grupo y darme la oportunidad de hacer esta tesis. Jesús, gracias por todo tu apoyo y tu confianza, y por haber sido un amigo, además de un jefe.

Al Dr. Barja, Juan Luis, por estar siempre ahí, aportando respuestas a cualquier duda, desde la ciencia al bricolaje. No se que haríamos sin ti, Flanagan.

A la Dr. Toranzo, Alicia, por tu dedicación y tu apoyo día tras día.

A la Dr. Magariños. Gracias Bea por tener siempre palabras de ánimo.

A todos mis compañeros, porque sin vosotros esto hubiese sido mucho más difícil, y seguro que mucho menos divertido. Gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido. A Celsa y a Berta, por tantas charlas y tantos ánimos, y por ayudarme en todo siempre. A Susana, a Javi y a los "cachorros", Aide, Miguel y Alba. A Nuria, gracias por haber sido un apoyo estos últimos meses. A Noemí, por ser así, la alegría del laboratorio, por hacerme reír siempre. A David, por todas las horas compartidas en la virocueva, por tantos debates y porque la escala de grises no sería lo mismo sin ti. A Ana, gracias por tu ayuda y tu apoyo en el laboratorio pero, sobre todo, gracias por tu amistad, porque siempre puedo contar contigo. Y gracias a mi Sabe, por todo. Porque hemos recorrido juntas un camino muy largo. Gracias por las risas y los lloros, por tu comprensión, por tus ánimos, y por estar siempre a mi lado pase lo que pase, nunca habrá distancia suficiente…

A mis amigos. A las "niñas", Crisbri, Noelia y Ana, gracias por todo lo que hemos compartido juntas desde el patio del colegio. A los "jinetes". A

Xoana, por ser como eres, por aguantarme, por alegrarme los días y por tener siempre una sonrisa. A Antón, por tu sinceridad, tu paciencia y tu sentido del humor, y porque siempre me ayudas a volver a ponerme en pie. Y sobre todo a Ale, por ser un apoyo incondicional durante todos estos años, por conocerme tan bien, por aconsejarme y por comprenderme. Gracias por estar siempre a mi lado, eres única.

A mi familia. A mis abuelos y a Madrina, gracias por todo. A Raúl y a mis "peques", Claudia y Sara. A María, porque sé que siempre puedo contar contigo, porque no sólo eres mi hermana, eres mi mejor amiga. A mis padres. Porque me habéis enseñado todas las cosas que son realmente importantes, me habéis apoyado en todas las decisiones y siempre estáis ahí con vuestros sabios consejos. Todos mis logros son también vuestros. Simplemente no me imagino unos padres mejores.

Lista de Publicaciones Derivadas de esta Tesis

Manso, C.F., Polo, D., Vilariño, M.L., Romalde, J.L. (2010) Genotyping of hepatitis A virus detected in bivalve shellfish in Galicia (NW Spain). Water Science and Thechnology, 61:15-24.

Manso, C.F., Romalde, J.L. (2013) Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in mussels from Galicia (NW Spain). Food and Environmental Virology, 5:110-118.

Manso, C.F., Romalde, J.L. (2013) Role of Norovirus in acute gastroenteritis development in the northwest of Spain during 2010-2011 period. Journal of Mediacal Virology, doi: 10.1002/jmv.23680.

Manso, C.F., Monteagudo, A., Romalde, J.L. (2013) Detection and genotyping of Norovirus from clinical and shellfish samples. Epidemiological implications. En: Proceedings of the 8th International Congress on Molluscan Shellfish Safety. C. MacLeod (ed.) (En prensa).

Manso, C.F., Romalde, J.L. (2013). Molecular epidemiology of Norovirus from patients with acute gastroenteritis in Northwestern Spain. Epidemiology and Infection (Enviado)

Manso, C.F., Romalde, J.L. (2013) Bayesian coalescent inference to determine the difference in evolutionary dinamics among norovirus GII genotypes. Journal of Virology (Enviado)

ÍNDICE

RESUMEN 3

1. INTRODUCCIÓN 9
1.1. Virus entéricos 9
1.2. Moluscos bivalvos como vehículo de transmisiónde virus entéricos 17
1.2.1. Moluscos bivalvos y acuicultura 17
1.2.2. Moluscos bivalvos como bioacumuladores de patógenos humanos 19
1.2.2.1. Mecanismos de bioacumulación de virus entéricos en moluscos bivalvos 21
1.3. Estrategias de control microbiológico del agua y de moluscos bivalvos 23
1.3.1. Bacterias como indicadoras de la presencia de virus entéricos 24
1.3.2. Control microbiológico del agua 25
1.3.3. Controles microbiológicos en moluscos. Clasificación de las áreas de cultivo de moluscos 27
1.4. Principales virus entéricos asociados al consumo de moluscos 29
1.4.1. Norovirus 30
1.4.1.1. Historia de los Norovirus 30
1.4.1.2. Estructura y organización genómica de Norovirus 32
1.4.1.3. Taxonomía 34
1.4.1.4. Infección en humanos 37
A. Vías de transmisión 37
B. Características clínicas de la enfermedad 40
C. Epidemiología 40
D. Principales técnicas de diagnóstico de Norovirus 42
1.4.1.5. Norovirus y consumo de moluscos bivalvos 45
1.4.2. Virus de la hepatitis A 48
1.4.2.1. Historia del virus de la hepatitis A 48
1.4.2.2. Estructura y organización genómica 49
1.4.2.3. Estrategia replicativa y selección preferencial de codones 52
1.4.2.4. Taxonomía 53
1.4.2.5. Infección en humanos 56
A. Vías de transmisión 56
B. Características clínicas de la enfermedad 56
C. Epidemiología 59
1.4.2.6. Virus de la hepatitis A y consumo de moluscos bivalvos 60

2. OBJETIVOS 67

3. MATERIAL Y MÉTODOS 71
3.1. Toma de muestras 71
3.1.1. Moluscos bivalvos procedentes de la ría de Vigo 71

3.1.2. Moluscos bivalvos procedentes de la ría do Burgo 72
3.1.3. Muestras clínicas..... 72
3.2. Procesamiento de las muestras y extracción del RNA 76
3.2.1. Muestras de moluscos bivalvos 76
3.2.2. Muestras clínicas..... 77
3.2.3. Extracción del RNA..... 77
3.3. Detección y cuantificación de Norovirus y virus de la hepatitis A..... 78
3.3.1. Detección viral..... 78
3.3.2.Cuantificación viral..... 79
3.3.3.Conroles utilizados en la RT-qPCR..... 82
3.3.3.1. Eficiencia de extracción..... 82
3.3.3.2. Eficiencia de la RT-qPCR 84
3.3.3.3. Stock y títulos virales 85
3.4. Análisis estadístico..... 87
3.5. Análisis filogenético de las cepas de Norovirus y virus de la hepatitis A detectadas en muestras clínicas y de moluscos 87
3.5.1.Genotipado de las cepas de Norovirus..... 87
3.5.2. Genotipado de las cepas del virus de la hepatitis A..... 91
3.5.3. Análisis de secuencias 95
3.5.3.1. Análisis filogenético 96
3.6. Estudio de coalescencia mediante inferencia Bayesiana de las poblaciones de Norovirus..... 97

4. DETECCIÓN Y GENOTIPADO DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS D MOLUSCOS..... 105
4.1. Resultados 108
4.1.1. Análisis filogenético de las cepas de NoV y HAV detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo..... 108
4.1.2. Detección de NoV y HAV detectadas en moluscos procedentes de la ría do Burgo 114
4.1.3. Análisis filogenético de las cepas de NoV y HAV detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo 121
4.1.4. Comparación de las cepas de NoV y HAV detectadas en la ría de Vigo y en la ría do Burgo. Análisis filogenético 125
4.2. Discusión..... 128

5. DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS CLÍNICAS..... 137
5.1. Resultados 139
5.1.1. Análisis bacteriológicos..... 139
5.1.2. Análisis virológicos 142
5.1.2.1. Rotavirus y Adenovirus..... 142
5.1.2.2. Virus de la hepatitis A 144
5.1.2.3. Norovirus..... 146
5.1.2.4. Infecciones múltiples..... 151
5.2. Discusión..... 155

6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE NOROVIRUS EN GALICIA 165
6.1. Resultados 168
6.1.1. Genotipado y análisis filogenético de las cepas de Norovirus detectadas en muestras clínicas 168
6.2. Discusión 182

7. ESTUDIO DE COALESCENCIA MEDIANTE INFERENCIA BAYESIANA. DIFERENCIA EN LAS DINÁMICAS EVOLUTIVAS DE DISTINTOS GENOTIPOS DE NOROVIRUS GII 189
7.1. Resultados 192
7.1.1. Tasa de cambio evolutivo y tiempo al ancestro común más reciente 192
7.1.2. Relación filogenética de las secuencias de la región parcial de la cápside de Norovirus 196
7.1.3. Inferencia de la dinámica evolutiva 203
7.2. Discusión 209

8. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS 217
8.1. Resultados 218
8.2. Discusión 226

9. DISCUSIÓN GENERAL 221

10. CONCLUSIONES 247

11. BIBLIOGRAFÍA 251

12. ANEXOS 287

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales virus entéricos patógenos 11
Tabla 1.2: Parámetros microbiológicos del agua 26
Tabla 1.3: Resumen de los estándar legales en la UE para moluscos bivalvos vivos 28
Tabla 3.1: Número total de muestras recogidas en cada punto de muestreo de la ría do Burgo 74
Tabla 3.2: Número de muestras de heces analizadas por cada grupo de edad establecido 75
Tabla 3.3: Cebadores y sondas empleados para la detección de NoV y HAV 80
Tabla 3.4: Cebadores utilizados para la secuenciación de una región parcial de la cápside de NoV GI y GII 90
Tabla 3.5: Cebadores utilizados para la secuenciación de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de HAV 94
Tabla 4.1: Resultados obtenidos del análisis de detección de HAV en las muestras de moluscos analizadas procedentes de la ría de Vigo(modificado de Vilariño, 2009) 108
Tabla 4.2: Número de muestras recogidas en cada zona de muestreo y porcentaje de muestras en las que se detecto NoV y HAV 115
Tabla 4.3: Resultados de los niveles de contaminación de HAV en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo 117
Tabla 4.4: Resultados de los niveles de contaminación de NoV GI en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo 117
Tabla 4.5: Resultados de los niveles de contaminación de NoV GII en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo 118
Tabla 4.6: Porcentaje de muestras positivas para NoV y HAV durante los meses fríos y los meses cálidos 119
Tabla 4.7: Tabla de contingencia dos a dos en la que se analiza la correlación existente el número de muestras positivas para HAV y el número de muestras en las que HAV no se detectó y la procedencia dezona B o C de dichas muestras 120
Tabla 4.8: Tabla de contingencia dos a dos en la que se analiza la correlación existente el número de muestras positivas para NoV y el número de muestras en las que HAV no se detecto y la procedencia de zona B o C de dichas muestras 120
Tabla 5.1: Número de muestras pertenecientes a los distintos grupos de edad en las que se detectó la presencia de los diferentes patógenos bacterianos analizados 141
Tabla 5.2: Distribución de los positivos de RV y AdV en los distintos grupos de edad establecidos 143
Tabla 5.3: Distribución de los positivos de RV y AdV durante los distintos meses 144

Tabla 5.4: Distribución de los positivos de HAV en los distintos grupos de edad establecidos 145
Tabla 5.5: Distribución de los positivos de HAV durante los distintos meses..... 146
Tabla 5.6: Distribución de los positivos de NoV detectados con ambos conjuntos de cebadores y sondas, así como el número total de muestras positivas para NoV, en los distintos grupos de edad establecidos 148
Tabla 5.7: Distribución de los positivos de NoV detectados en los distintos meses empleando ambos conjuntos de cebadores y sondas. Se indica también la temperatura media del aire (ºC) y las lluvias (L/m^2) registradas durante cada mes 149
Tabla 5.8: Porcentajes de infecciones mixtas NoV-*Campylobacter*, NoV-*Salmonella* y NoVs-otros patógenos 152
Tabla 5.9: Rangos de cuantificación (y desviación estándar) para NoV GI y NoV GII en cada grupo de edad analizado..... 154
Tabla 6.1: Resumen de los resultados de la caracterización de las cepas de NoV detectadas en los diferentes grupos de edad 171
Tabla 7.1: Tasas de sustitución nucleotídica y tiempos de divergencia de cepas de NoV pertenecientes al genotipo GII.4, GII.14, GII.3, GII.7 y GII.13, calculados mediante inferencia Bayesiana empleando Secuencias de una región parcial del gen de la cápside 194
Tabla 7.2: Estimación de cómo de ajustado es el modelo de reloj molecular relajado (CoV) y de las probabilidades marginales obtenidas para el modelo de reloj molecular estricto y relajado, como una medida de la calidad del análisis..... 195

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Principales vías de transmisión de los virus entérico 17
Figura 1.2: Producción comercial en Galicia de mejillón mediterráneo entre los años 2005 y 2010 (JACUMAR) 19
Figura 1.3: Agregados del virus Norwalk visualizado por IEM. X231.500 (Kapikian y col*.,* 1972) 31
Figura 1.4: A) Representación esquemática de la estructuradel virión. B) Esquema de la organización genómica de NoV, en el que se muestran las distintas proteínas codificadas en cada uno de los tres ORF (Modificado de Mesquita, 2011) 33
Figura 1.5: Análisis filogenético de NoV en base a la secuencia completa del ORF2, representando todos los genogrupos y genotipos. La barra representa la unidad para el número esperado de sustitucionespor sitio(Adaptado de Patel y col*.,* 2009 36
Figura 1.6: Principales vías de transmisión de NoV (Modificado de Lopman y col., 2012) 39
Figura 1.7: Ilustración de la posible capacidad de infección de las distintas vías de transmisión. La cantidad total de transmisión resultante de la transmisión directa o de la transmisión ambiental se ve representada por el área existente bajo cada una de las curvas. El número total de casos resultantes de un primer caso (el numero de reproducción) es la suma de las áreas bajo ambas curvas y es complicado de estimar en la práctica (Modificado de Lopman y col., 2012) 39
Figura 1.8: Fotografía de microscopía electrónica del virus de la Hepatitis A. Barra: 100 nm (Obtenida de "The Springer Index of Viruses") 49
Figura 1.9: Representación esquemática de la estructura del virión de HAV y de su organización genómica. La flecha roja representa el primer punto de corte de la proliproteína P0 durante su procesado, dando lugar al complejo macromolecular replicativo 2B-3D y las proteínas estructurales de la cápside (Modificado de Cristina y col*.*, 2007) 51
Figura 1.10: Diagrama esquemático del genoma de HAV en el que se muestran las tres regiones del genoma más variables secuenciadas para la caracterización genotípica de los diferentes aislados del virus (modificado de Costa-Mattioli y col., 2003) 54
Figura 1.11: Análisis filogenético de HAV. El árbol filogenético está construido análizando la región VP1-P2A por el método de Neighbor-Joining. Se muestran los 7 genotipos y los subgenotipos establecidos para HAV (Robertson y col*.*, 1992) 55
Figura 1.12: Evolución de los títulos virales y los signos clínicos durante la infección con HAV: respuesta inmunológica de IgM (violeta) y IgG (azul). Títulos de viremia en heces (amarillo) y en sangre (rojo). En verde se muestran los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) (Modificado de Pintó y col., 2012) 57
Figura 1.13: Prevalencia estimada de HAV a nivel mundial en el año 2005 (Jacobsen y col., 2010) 60

Figura 3.1: Ría de Vigo. En amarillo se muestran los puntos de muestreo clasificados como zona B. En rojo, los clasificados como C 71
Figura 3.2: Ría do Burgo. En amarillo se muestran los puntos de muestreo clasificados como zona B. En rojo, los clasificados como C. Se muestra también la localización del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)..... 73
Figura 3.3: Área sanitaria de A Coruña..... 75
Figura 3.4: Esquema de la posición genómica de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de la región N-terminal de la cápside de NoV GI y GII..... 88
Figura 3.5: Esquema de la posición genómica de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 92
Figura 4.1: Árbol filogenético de la región VP1-P2A de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos)..... 109
Figura 4.2: Árbol filogenético de la región VP3-VP1 de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos)..... 111
Figura 4.3: Árbol filogenético del concatenado de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 112
Figura 4.4: Reconstrucción filogenética basada en secuencias parciales de la cápside de 4 cepas de NoV y cepas de referencia de cada genotipo construido por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) (Códigos de la muestras: B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, E a berberecho)..... 114
Figura 4.5: Reconstrucción filogenética basada en el concatenado de las secuencias de las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1 de las 15 cepas de HAV detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de cada genotipo y subgenotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 122

Figura 4.6: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial de la cápside de las 6 cepas de NoV GI detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de cada genotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 123
Figura 4.7: Reconstrucción filogenética basada en la secuenciación de la cápside de las 10 cepas de NoV GII detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de distintos genotipos por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 125
Figura 4.8: Reconstrucción filogenética basada en el concatenado de las secuencias de las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1 de las cepas de HAV detectadas en la ría de Vigo (Códigos de la muestras: A y B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho) y en la ría do Burgo (destacadas en color naranja), así como de cepas de referencia de cada genotipo y subgenotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 126
Figura 4.9: Reconstrucción filogenética basada en la secuenciación de la cápside de las cepas de NoV GII detectadas en la ría de Vigo (Códigos de la muestras: A y B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho) y en la ría do Burgo (destacadas en color naranja) junto con secuencias de cepas de referencia de distintos genotipos por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos)..... 127
Figura 5.1: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para *Salmonella* spp. y la temperatura ambiental (ºC). Datos de las temperaturas medias mensuales obtenido de www.meteogalicia.es 142
Figura 5.2: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para NoV y la temperatura ambiental (ºC). Datos de las temperaturas medias mensuales obtenido de www.meteogalicia.es 150
Figura 5.3: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para NoV y las lluvias (L/m^2). Datos de las lluvias mensuales obtenidos de www.meteogalicia.es 150
Figura 5.4: Porcentaje de muestras en las que se detectó la presencia de los diversos patógenos analizados, así como de las muestras en las que se detectaron coinfecciones 153
Figura 6.1: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio y de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 169

Figura 6.2: Porcentaje de NoV asignados a los diferentes genotipos detectados 170
Figura 6.3: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio asignadas a las variantes 2006b y 2010, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos)..... 173
Figura 6.4: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio que no pudieron asignarse a ninguna variante específica empleando la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 174
Figura 6.5: Porcentaje de las diferentes variantes de GII.4 detectadas durante los meses cálidos y fríos de 2010/2011 176
Figura 6.6: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV GII.14, así como de cepas de referencia de distintos genotipos construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 177
Figura 6.7: Patrón estacional de NoV GII.4 y GII.14 178
Figura 6.8: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV asignadas a GII.7, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 179
Figura 6.9: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV asignadas a GII.13, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 180
Figura 6.10: Patrón estacional de NoV GII.7 181
Figura 6.11: Patrón estacional de NoV GII.13 181

Figura 7.1: MCCT de 213 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas de Galicia se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 197
Figura 7.2: MCCT de 123 secuencias de NoV GII.14 (periodo de 12 años). Las cepas de Galicia se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 199
Figura 7.3: MCCT de 82 secuencias de NoV GII.14 (periodo de 36 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 200
Figura 7.4: MCCT de 47 secuencias de NoV GII.14 (periodo de 21 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 201
Figura 7.5: MCCT de 52 secuencias de NoV GII.14 (periodo de 13 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 202
Figura 7.6: MCCT de NoV GII.4, GII.14, GII.3, GII.7 y GII.13. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado 204

Figura 7.7: a) Gráfica de línea de cielo (*Bayesian Skyline Plot*, BSP) obtenidas para NoV GII.4. b) Gráfica de linajes a través del tiempo (*Lineages through time plot*, LTTP) obtenidas para NoV GII.4. La gráfica BSP representa la diversidad genética relativa a lo largo del tiempo, mientras que la gráfica LTTP representa el patrón de diversificación expresado como el número de linajes que tuvieron alguna descendencia exitosa en el tiempo 206
Figura 7.8: a) Gráfica de línea de cielo (*Bayesian Skyline Plot*, BSP) obtenidas para NoV GII.14. b) Gráfica de linajes a través del tiempo (*Lineages through time plot*, LTTP) obtenidas para NoV GII.14. La gráfica BSP representa la diversidad genética relativa a lo largo del tiempo, mientras que la gráfica LTTP representa el patrón de diversificación expresado como el número de linajes que tuvieron alguna descendencia exitosa en el tiempo 207
Figura 7.9: Comparación de las gráfica de línea de cielo (*Bayesian Skyline Plot*, BSP) obtenidas para NoV GII.4 (a) y GII.14 (b). Las líneas verdes, que coinciden con el comienzo del año 2009, señalan el aumento en el valor de $N_e\tau$ para GII.4 y la disminución de este valor para GII.14 durante el mismo punto en el tiempo. La línea roja, que coincide con el comienzo del año 2010, representa la disminución del valor de $N_e\tau$ para GII.4 y el aumento de este valor para GII.14 durante el mismo punto en el tiempo 208
Figura 7.10: a) Gráfica de línea de cielo (*Bayesian Skyline Plot*, BSP) obtenidas para NoV GII.3. b) Gráfica de linajes a través del tiempo (*Lineages through time plot*, LTTP) obtenidas para NoV GII.3. c) Gráfica BSP obtenidas para NoV GII.7. d) Gráfica LTTP obtenidas para NoV GII.7 e) Gráfica BSP obtenidas para NoV GII.13. f) Gráfica LTTP obtenidas para NoV GII.13 210
Figura 8.1: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias del concatenado de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 y cepas de referencia de distintos genotipos. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos) 220
Figura 8.2: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias parciales de la cápside de NoV GII.4 2006b y 2010 (de acuerdo con la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*), cepas de referencia de estas variantes y cepas de referencia de distintos genotipos. Las cepas pertenecientes a NoV GII.4 se encuentran señaladas en negrita. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) 221

Figura 8.3: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias parciales de la cápside de NoV GII.6 (de acuerdo con la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*) y cepas de referencia de distintos genotipos. Las cepas pertenecientes a NoV GII.6 se encuentran señaladas en negrita. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos)..... 223

Figura 8.4: MCCT (*Maximun clade credibility tree*) de 224 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas detectadas en muestras clínicas se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Las cepas detectadas en moluscos de la ría do Burgo se encuentran representadas en naranja,y las detectadas en moluscos de la ría de Vigo en rojo. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado..... 225

ABREVIATURAS

95% HPD: (95% *Highest Posterior Density*).

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés *American Type Cell Cultures*)

BSP: Gráficas de líneas de cielo (del inglés *Bayesian Skyline Plot*)

CPE: efecto citopático (del inglés *cytopathic effect*)

Ct: Ciclo-*threshold*

D-MEN: medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DTT: Dithiothreitol

EIA: ensayos inmunoenzimáticos (del inglés *enzime immuno assay*)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (del inglés *Food and Agriculture Organization*)

FRhK-4: hígado fetal de mono (del inglés *fetal Rhesus monkey cells*)

GITC: isotiocianato de guanidina (del inglés *guanidin isothiocyanate*)

HBGA: antígenos de histocompatibilidad sanguíneos tipo A humanos (del inglés *A-like human histo-blood antigens*)

HeLa: Línea celular de cáncer cérvico–uterino humano

IEM: microscopía inmuno-electrónica (del inglés *Immune electron microscopy*)

IRES: sitio interno de entrada ribosomal (del inglés *internal ribosome entry site*)

ISO: Organización Internacional para Estandarización (del inglés *International Organization for Standardization*)

JACUMAR: Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos

kb: Kilobase

KDa: KiloDalton

MB: Métodos Bayesianos

MCCT: árbol de máxima credibilidad de clados (del inglés *Maximun Clade Credibility Tree)*

MCMC: Método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (del inglés *Markov chain Monte Carlo*)

mRNA: RNA mensajero

NCR: región no codificante (del inglés *non coding region*)

NIAID: Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (del inglés *National Institute of Allergy and Infectious Disease*)

NJ: Neighbor-Joining

OD: densidad óptica (del inglés *optical density*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: pautas abiertas de lectura (del inglés *open reading frame*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA (del inglés *RNA dependent RNA polymerase*)

RT-PCR: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *reverse transcription-polymerase chain reaction*)

RT-qPCR: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (del inglés *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*)

SFB: Suero fetal bovino

TCID50: 50% de la dosis infectiva en cultivo celular (del inglés 50% *tissue culture infective dose*)

TMRCA: Tiempo al ancestro común más reciente (del inglés *Time to More Recent Common Ancestry*)

ufp: unidades formadoras de placas de lisis

VPg: proteína viral unida al genoma (del inglés *virus protein genome linked*)

RESUMEN

RESUMEN

Los virus entéricos son un grupo de virus que se encuentran en el intestino humano, se excretan en las heces y son transmitidos mediante la ruta fecal-oral. Debido a la naturaleza filtradora de los moluscos bivalvos, estos pueden concentrar y retener patógenos humanos presentes en ecosistemas acuáticos contaminados con aguas residuales. Se ha detectado la presencia de diversos virus entéricos en moluscos bivalvos, aunque únicamente en el caso de NoV y HAV se ha podido relacionar el desarrollo de brotes enfermedad con el consumo de moluscos que cumplían con los estándares para su comercialización.

La tasa de detección y los niveles de contaminación observados para NoV y HAV en moluscos procedentes de distintas zonas de la ría do Burgo con diferente clasificación de calidad de las aguas, apoya la falta de asociación existente entre los actuales sistemas de clasificación basados en indicadores bacterianos y la presencia de virus entéricos. Todas las cepas de HAV detectadas en los moluscos de Galicia se caracterizaron como subgenotipo IB, lo que podría indicar una circulación endémica de este subgenotipo en el noroeste de España (Península Ibérica). En el caso de NoV, la mayor tasa de detección del genotipo GII.4 en los moluscos analizados, coincide con la situación observada en la población a nivel global. Debido a la elevada diversidad existente en las cepas de NoV, el protocolo de RT-qPCR empleado resulta específico para la detección de NoV, pero la asignación de las cepas detectadas a los genogrupos GI y GII ha de ser comprobada mediante secuenciación.

Los NoV son la principal causa de brotes de gastroenteritis en todo el mundo, así como una de las causas más comunes de casos esporádicos de la enfermedad. Sin embargo, su papel en el desarrollo de los casos

individuales se encuentra infraestimado, debido principalmente a la ausencia de diagnóstico rutinario y a que no todos los casos requieren atención médica. El análisis de muestras de pacientes afectados de gastroenteritis en el área sanitaria de A Coruña, reveló que NoV era el principal agente etiológico de casos esporádicos de gastroenteritis en todos los grupos de edad, incluidos niños menores de 2 años, en los que la presencia de NoV se observó más frecuentemente que la de RV.

Las cepas de NoV detectadas en muestras clínicas pertenecían mayoritariamente al genotipo GII.4. Además de cepas pertenecientes a las variantes 2006b y 2010, se detectaron cepas pertenecientes a la nueva variante emergente Sydney 2012, la cual podría haber estado circulando desde el invierno de 2010/2011, al menos en el suroeste europeo. El genotipo GII.4 es el mayoritario a escala mundial. La elevada incidencia de las infecciones por NoV GII.4 parece estar relacionada con la aparición secuencial y la rápida expansión de nuevas variantes que evolucionan por deriva génica del gen de la cápside. Se observó también una alta prevalencia del genotipo GII.14. La tasa de sustitución nucleotídica y la dinámica poblacional observada para GII.14 es similar a la de GII.4, lo que apoya la hipótesis de que otros genotipos de NoV evolucionan de una forma similar a GII.4, sugiriendo la posible emergencia y dispersión de nuevas variantes epidémicas de estos genotipos.

La ausencia de análisis rutinarios para NoV y de datos epidemiológicos recogidos sobre los pacientes dificultan el poder establecer una relación epidemiológica entre el consumo de moluscos y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los análisis filogenéticos de las cepas de NoV detectadas en muestras clínicas y de moluscos demuestran cómo la diversidad de cepas presentes en moluscos refleja la diversidad presente en la población en una misma área geográfica, poniendo de

manifiesto la inefectividad de los tratamientos de las plantas de aguas residuales en la eliminación viral.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus entéricos

Los virus entéricos son un grupo de virus que se encuentran en el intestino humano, se excretan en las heces y son transmitidos mediante la ruta fecal-oral. En la actualidad, este grupo de virus está considerado como la causa más frecuente de enfermedades asociadas al consumo de alimentos (Lees, 2000). Los principales virus entéricos patógenos encontrados en heces son los Norovirus (NoV), Sapovirus (SV), virus de la Hepatitis A (HAV), Enterovirus (EV), Kobuvirus (KoV), virus de la Hepatitis E (HEV), Astrovirus (AsV), Rotavirus (RV) y Adenovirus (AdV). Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de virus entérico en muestras de heces de pacientes pediátricos, denominado Klassevirus (KV) (Greninger y col., 2009). Las enfermedades causadas por los virus entéricos se engloban en tres tipos principales: gastroenteritis, hepatitis de transmisión entérica y enfermedades que afectan a otras partes del cuerpo como los ojos, el sistema respiratorio y el sistema nervioso central (Koopmans y Duizer, 2004).

El genoma de todos los virus entéricos, exceptuando RV y AdV, consiste en una molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple y sentido positivo. El genoma de RV consiste en 11 segmentos de RNA de doble cadena, mientras que el genoma de AdV consiste en una molécula de doble cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Tabla 1.1). Los virus entéricos, al igual que el resto de los virus, son partículas inertes que debido a su condición de patógenos intracelulares obligados necesitan una célula viva para poder replicarse. Algunos virus entéricos como AsV y RV, así como determinadas cepas de HAV, pueden crecer en cultivo

celular. En el caso de otros virus entéricos, como NoV, no se obtiene replicación *in vitro* ni se dispone de ningún modelo animal en el que puedan replicarse, lo que durante muchos años supuso una limitación a la hora de asociar su transmisión al consumo de alimentos (Tabla 1.1).

Históricamente, la microscopía electrónica ha sido la técnica empleada para la detección de las partículas virales en muestras de heces procedentes de pacientes afectados de gastroenteritis (Atmar y Estes, 2001). Todavía hoy en día se sigue empleándo para el diagnóstico, aunque su sensibilidad es relativamente baja (del orden de un millón de partículas por gramo de heces para la visualización del virus) (Hedberg y Osterholm, 1993). En el caso de AdV, RV grupo A, AsV y algunos NoV, se dispone de ensayos inmunoenzimáticos (EIA, del inglés *enzime immuno assay*) para el diagnóstico rutinario. Esta técnica de diagnóstico es la más utilizada en la actualidad y puede basarse tanto en la detección de antígenos como de anticuerpos. En el caso de HAV, se emplea la detección de anticuerpos específicos IgM en los caso de infecciones recientes. Para el resto de virus entéricos el diagnóstico puede realizarse mediante la detección del ácido nucleico, bien utilizando la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa clásica (RT-PCR, del inglés *reverse transcription-polymerase chain reaction*) o bien la RT-PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR, del inglés *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*).

Tabla 1.1: Principales virus entéricos patógenos

	Familia	Género	Genoma	Virus cultivable	Epidemiología	Vías de transmisón
Norovirus	*Caliciviridae*	Norovirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	no	Principal causa de casos esporádicos y brotes de gastroenteritis aguda	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada. También contacto persona-persona, contaminación de fomites y transmisión por aerosoles
Sapovirus	*Caliciviridae*	Sapovirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	no	Principal causa de casos esporádicos y brotes de gastroenteritis en niños menores de 5 años	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Hepatitis A vírus	*Picornaviridae*	Hepatovirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	si	Principal causa de hepatitis aguda	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Enterovirus	*Picornaviridae*	Enterovirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	si	Rara vez causa gastroenteritis. El virus invade otros órganos	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Kobuvirus	*Picornaviridae*	Kobuvirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	si	Se ha documentado como causa de gastroenteritis aguda	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Klassevirus	*Picornaviridae*	Klassevirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	--	Se necesitan más estudios	Se necesitan más estudios
Hepatitis E vírus	*Hepeviridae*	Hepevirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	no	Junto con el virus de la hepatitis A, es la principal causa de hepatitis aguda	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Astrovirus	*Astroviridae*	Mamastrovirus	ARN Cadena sencilla Sentido positivo	si	Causa gastroenteritis en niños menores de 2 años y ancianos	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Rotavirus	*Reoviridae*	Rotavirus	ARN Doble cadena	si	En niños menores de 4 años, es la causa más importante de gastroenteritis	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada
Adenovirus	*Adenoviridae*	Adenovirus	ADN Doble cadena	si	En niños menores de 4 años es, despues de Rotavirus, la causa más importante de gastroenteritis	Ruta fecal-oral, mediante el consume de agua o comida contaminada.

Estas técnicas son las más empleadas en la actualidad, aunque en el caso de NoV la gran variabilidad de su genoma supone una dificultad a la hora de desarrollar una única prueba de detección. Por otro lado, HAV puede ser detectado en heces y en suero mediante RT-PCR, aunque el diagnóstico aplicando esta técnica no se realiza de manera rutinaria (Koopmans y Duizer, 2004). Existen grandes diferencias entre los límites de detección de las distintas técnicas, variando desde unas pocas partículas (RT-PCR) hasta del orden de un millón de partículas por gramo de heces. Además, la interpretación de los resultados obtenidos de las distintas pruebas es complicada y no está estandarizada: una muestra positiva por microscopía electrónica implica que la persona afectada excreta un gran número de partículas virales en sus heces, mientras que en el caso de una muestra positiva por RT-PCR, el individuo afectado puede estar excretando una cantidad de partículas virales muy bajas. Además, los pacientes sintomáticos no necesariamente excretan más partículas virales en heces que los asintomáticos (Koopmans y Duizer, 2004).

La forma clásica para la detección de contaminación viral en alimentos, en el caso de los virus cultivables, consiste en la inoculación de un extracto obtenido a partir del alimento a evaluar en diversos cultivos celulares para el posterior aislamiento del virus. Los virus infecciosos pueden ser identificados por su habilidad para producir efecto citopático (CPE, del inglés *cytopathic effect*) en células infectadas o bien mediante detección serológica. La ventaja de inocular el extracto obtenido del alimento a evaluar es que los resultados pueden ser interpretados tanto de forma cualitativa como cuantitativa y no se producen resultados ambiguos respecto a la presencia viral y su infectividad. Este último punto resulta muy importante a la hora de determinar la seguridad del consumo de un determinado alimento. Sin embargo, este método resulta costoso y

laborioso y, además, el extracto obtenido de alimentos puede resultar citotóxico, lo que dificulta el crecimiento del virus (Lees, 2000).

Hoy en día, las técnicas más comunes empleadas para la detección de virus entéricos en muestras de alimentos son la RT-PCR y la RT-qPCR. Una de las principales limitaciones a la hora de analizar muestras de alimentos es que el número de virus presentes en las mismas es muy bajo. Estos métodos, unidos a un primer paso de procesado de la muestras para concentrar los virus o sus ácidos nucleicos, permiten la detección de virus entéricos en este tipo de muestras, así como una disminución de inhibidores durante el proceso de extracción. Además, las técnicas moleculares permiten la detección tanto de virus cultivables como no cultivables, aunque con este tipo de procedimientos se identifican tanto partículas virales infectivas como no infectivas.

Los virus poseen dos propiedades fundamentales que limitan la medida en la que pueden suponer un problema de seguridad alimentaria. La primera, es que, debido a la ya mencionada naturaleza intracelular obligada, los virus tienen especificidad de célula huésped. Aunque algunos pueden infectar a varias especies, la infección de especies muy divergentes es poco común (Lees, 2000). La segunda, es que son parásitos intracelulares obligados, incapaces de multiplicarse en el medio ambiente, fómites o alimentos contaminados. Sin embargo, estos patógenos pueden ser extremadamente resistentes y sobrevivir periodos de tiempo relativamente largos tras un evento de contaminación (Lees, 2000).

Los virus mejor adaptados a ser diseminados de esta manera son aquellos transmitidos mediante la ruta fecal-oral. Esto se debe a la gran estabilidad de estos virus fuera del hospedador, a la baja dosis infectiva necesaria para desarrollar la enfermedad y al elevado número de partículas virales que son liberadas al medio en las heces de individuos afectados

(Lees, 2000; Koopmans y Duizer, 2004).

Los virus entéricos son extremadamente resistentes a condiciones ambientales, tales como el calor o la acidificación del medio. La mayoría de ellos resisten la congelación, la desecación y son estables en presencia de solventes lipídicos. De este modo, los virus entéricos pueden resistir tanto el ambiente ácido del intestino de los mamíferos, como la actividad alcalina y proteolítica del duodeno, por lo que son capaces de atravesar estas regiones y colonizar el tracto digestivo inferior. Del mismo modo, estas propiedades les permiten sobrevivir en alimentos ácidos, marinados o encurtidos, así como en alimentos congelados o ligeramente cocinados (Greening, 2006).

Dado que en las heces de los individuos afectados se excretan millones de partículas virales, las aguas residuales resultan la principal fuente por la que los virus entéricos y otros virus pueden contaminar los ambientes acuáticos (Bosch, 1998). Por este motivo, el tratamiento de las aguas residuales resulta crucial para la el bienestar sanitario de cualquier comunidad.

Los contaminantes más importantes de las aguas residuales urbanas son: sólidos en suspensión, materia orgánica biodegradable (proteínas, carbohidratos, grasas animales), patógenos y nutrientes (principalmente nitrógeno y fosforo). Además, en las aguas residuales pueden encontrarse metales pesados (derivados de ciertas actividades comerciales e industriales) y materia orgánica refractaria (agentes tensioactivos o los pesticidas agrícolas).

Los principales procesos incluidos en el tratamiento de las aguas residuales se clasifican en:

- Pretratamiento: Eliminación de los constituyentes de las aguas residuales cuya presencia pueda provocar problemas de mantenimiento y

funcionamiento de los diferentes procesos, operaciones y sistemas auxiliares. Dentro del pretatamiento se incluye:

- Eliminación de sólidos gruesos.

- Flotación para las grasas y aceites.

- Desarenado para la materia en suspensión gruesa.

- Tratamiento primario: Proceso de eliminación de una fracción de los sólidos en suspensión y de la materia orgánica del agua residual. Se lleva a cabo mediante operaciones físicas tales como el tamizado y la sedimentación.

- Tratamiento secundario convencional: Proceso de eliminación en las aguas residuales de los sólidos en suspensión y de los compuestos orgánicos biodegradables. Se lleva a cabo mediante tratamientos biológicos con fangos activados, reactores de lecho fijo, sistemas de lagunaje y sedimentación. En algunos casos, se incluye la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y la desinfección (cloración, radiación ultravioleta, ozonización, empleo de membranas) dentro de los tratamientos secundarios.

- Tratamiento terciario o avanzado: Es el tratamiento necesario, por encima del secundario convencional, para la eliminación de los constituyentes de las aguas residuales que merecen especial atención, como los compuestos tóxicos y los excesos de materia orgánica y de sólidos en suspensión. Se trata de tratamientos fisicoquímicos de coagulación química y floculación y la posterior etapa de separación por decantación y filtración. La eliminación de los nutrientes (nitrógeno y fósforo) y los procesos de desinfección suelen estar incluidos dentro de los tratamientos terciarios.

A pesar de que actualmente las plantas municipales de tratamiento de aguas residuales eliminan una carga sustancial de virus mediante una

combinación de adsorción e inactivación con desinfectantes, la eficiencia de este proceso puede variar, llevando a la descarga de virus patógenos en los efluentes (Formiga-Cruz y col., 2002; Charles y col., 2008). Se ha demostrado que los virus entéricos se mantienen en aguas dulces, estuarios y aguas saladas durante varias semanas a 4ºC (Jaykus y col., 1994). El tiempo de supervivencia de los virus entéricos en la columna de agua depende de la temperatura y está inversamente relacionado con el aumento de la misma. Además, parece que su supervivencia puede aumentar si se unen a material particulado o a sedimentos (Nasser, 1994; Callahan y col., 1995). Por este motivo, el marisco procedente de zonas costeras contaminadas con aguas residuales puede estar contaminado con virus entéricos.

El agua es también un factor clave en la contaminación de productos frescos, que pueden ser regados o lavados con agua contaminada. Estos, junto con el marisco, son los que presentan el principal riesgo de contaminación antes de su recolección. Sin embargo, otros muchos tipos de alimentos pueden ser contaminados durante el procesado, almacenamiento, distribución o preparación final de cualquiera de ellos por personas infectadas. Es también frecuente la contaminación por contacto con un ambiente contaminado (Figura 1.1).

En todos los virus entéricos pertenecientes a distintos géneros existen cepas animales y humanas, aunque en muchos casos no se conoce si las cepas que afectan a animales pueden afectar a humanos y viceversa. Las cepas patógenas de AsV, AdV y EV que afectan a animales parecen ser distintas de las que afectan a humanos. En el caso de NoV, aunque han sido aislado en heces animales, hasta ahora no se ha demostrado su implicación en el desarrollo de la enfermedad en humanos (Sugieda y col., 1998; van der Poel y col., 2000; Oliver y col., 2003). En cuanto a las

infecciones zoonóticas, estas no suelen ser transmitidas por alimentos, siendo posiblemente HEV el primer virus del que se conoce que causa una enfermedad viral zoonótica asociada al consumo de alimentos (Tei y col., 2003).

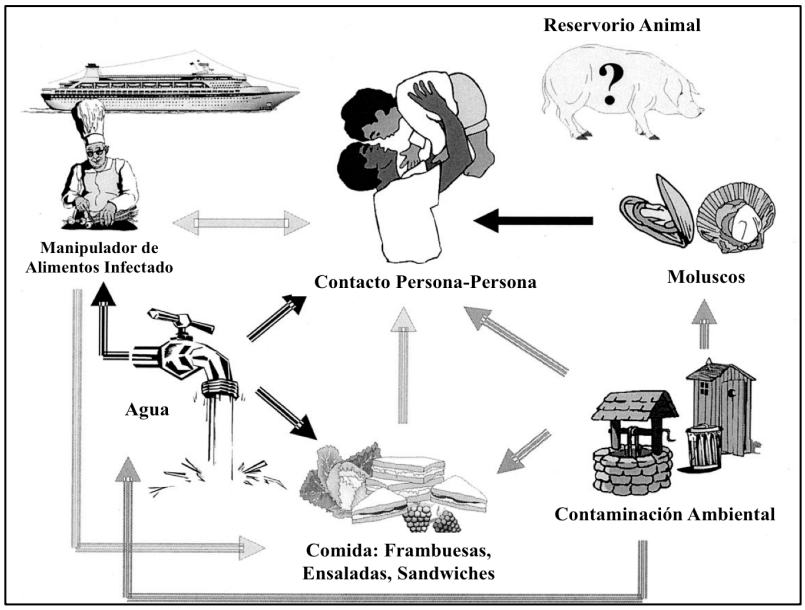


Figura 1.1: Principales vías de transmisión de los virus entérico (Modificada de Moreno-Espinosa y col., 2004).

1.2. Moluscos bivalvos como vehículo de transmisión de virus entéricos

1.2.1. Moluscos bivalvos y Acuicultura

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization*) define la acuicultura como la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del

medio, la producción de los organismos en cuestión. La acuicultura es uno de los sistemas de producción alimentaria de más rápido crecimiento en el mundo desde mediados del siglo XX. Debido a la estabilización de la producción pesquera mundial y el hecho de que las características de los moluscos bivalvos los hacen adaptables al cultivo en condiciones intensivas y semiintensivas, se ha producido un desarrollo muy importante en este campo dentro de la acuicultura durante las últimas décadas, aumentando la importancia de los moluscos bivalvos como proteína de consumo.

En España se crían en la actualidad hasta 50 especies distintas de peces, moluscos y crustáceos, situándose entre los 20 países con mayor producción acuícola del mundo y como segundo en Europa, con más de 280.000 toneladas anuales. En el año 2010, la producción de moluscos superó las 220.000 toneladas (el 78,5% del total) de las cuales 216.000 se correspondieron con mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). El resto de la producción de moluscos fue principalmente de almeja babosa (*Venerupis corrugata*), fina (*V. decussata*) y japonesa (*V. philippinarum*), ostra plana (*Ostrea edulis*) y japonesa (*Crassostrea gigas*) y berberecho (*Cerastoderma edule*) (Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, JACUMAR).

En Galicia, la Acuicultura marina esta muy desarrollada, especialmente el cultivo de especies de agua fría, siendo la principal el mejillón. En las rías gallegas están fondeadas 3.515 bateas, de las que 3.242 están dedicadas al cultivo del mejillón, mientras que las restantes son de policultivos o de otras especies, como ostra y vieira. Existen también 1.190 parques de cultivo de moluscos (fundamentalmente almeja fina, babosa y japonesa), 22 granjas marinas y 17 criaderos para el cultivo de peces. Galicia es responsable de la producción de 227.000 toneladas del

total de la producción acuícola nacional en 2010 (JACUMAR), de las cuales 212.000 se corresponden a la producción de mejillón mediterráneo, un 98% de la producción total nacional (JACUMAR) (Figura 1.2).

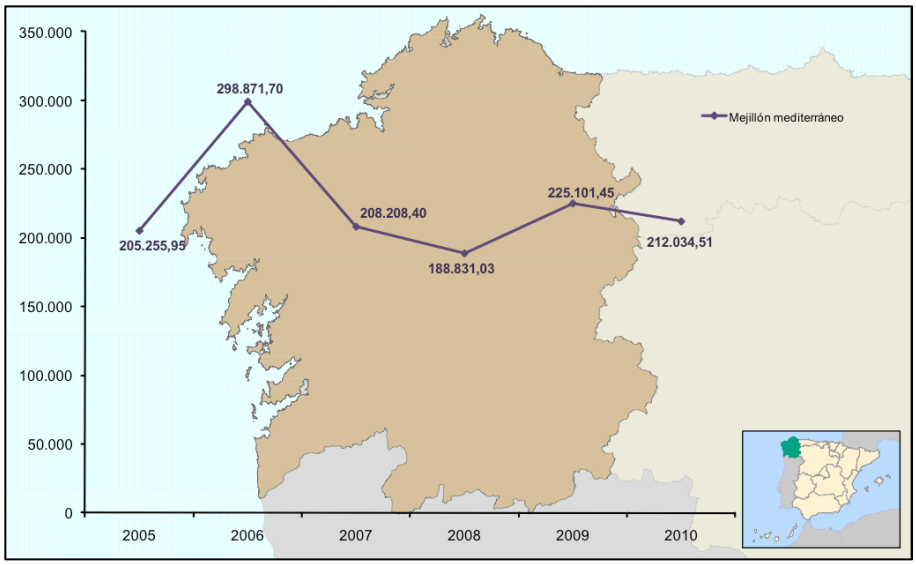


Figura 1.2: Producción comercial en Galicia de mejillón mediterráneo entre los años 2005 y 2010 (JACUMAR)

1.2.2. Moluscos bivalvos como bioacumuladores de patógenos humanos

Los ecosistemas acuáticos contienen cantidades variables de virus, bacterias y microalgas marinas que forman parte de la comunidad planctónica microbiana. La concentración de virus en aguas no contaminadas se estima entre 10^5 y 10^8 partículas por ml (Berg y col., 1989; Børheim, 1993; Maranger y Bird, 1995; Pina y col., 1998). Sin embargo, en zonas cercanas a núcleos de población, el medio acuático recibe aportes de grandes concentraciones de virus que son excretados a través de las heces y la orina de individuos afectados, incluso aunque estos

sean asintomáticos. En este medio se pueden encontrar hasta 100 especies distintas de virus infecciosos para el ser humano, de los cuales la gran mayoría son virus entéricos (Bosch, 1986). La concentración de estos virus en aguas residuales puede alcanzar valores de 10^5 unidades formadoras de placas de lisis por litro (ufp/l), llegando a ser de 1-10 ufp/l en aguas superficiales dependiendo del grado de contaminación fecal (Schwartzbrod, 1995).

Debido al proceso de filtración para la obtención de alimentos, los moluscos bivalvos que se encuentran en ecosistemas acuáticos contaminados con aguas residuales pueden concentrar y retener estos patógenos humanos. Se ha estimado que los bivalvos pueden filtrar entre 0,5 y 4 litros de agua por hora, dependiendo de su tamaño y de las condiciones ambientales, lo que los convierte en verdaderos concentradores biológicos. Mitchell y col. (1966) observaron que las ostras que se sometían durante una hora a bioacumulación en agua de mar que contenía 10^3 ufp/l de Poliovirus tipo 1, podían tener una concentración 27 veces superior en su organismo. Una vez acumulados en el tejido de los moluscos, los virus pueden persistir y permanecer infectivos durante largos periodos de tiempo, es decir, desde que son recolectados hasta su consumo (Tierney y col., 1982). En estudios posteriores llevados a cabo con técnicas moleculares de detección, se demostró que los virus entéricos se acumulan principalmente en el tracto digestivo de los moluscos bivalvos (Romalde y col., 1994). Si se analiza exclusivamente el hepatopáncreas, no sólo se reduce la cantidad de inhibidores presentes en los tejidos del molusco, sino que los resultados obtenidos son más representativos de la contaminación global de la muestra (1,5 g de hepatopáncreas equivalen a 5 ostras o 10 mejillones) (Power y Collins, 1990; Romalde y col., 1994; Le Guyader y col., 2000).

El peligro de la bioacumulación de microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos radica principalmente en que muchas especies se consumen crudas o ligeramente cocinadas y a que se ingiere el animal completo, incluidas las vísceras. Estas circunstancias son únicas para moluscos bivalvos, por lo que estos suponen un caso especial entre los peligros microbiológicos asociados con alimentos.

1.2.2.1. Mecanismos de bioacumulación de virus entéricos en moluscos bivalvos

Se han propuesto distintos mecanismos por los que los moluscos bivalvos bioacumulan virus entéricos, aunque actualmente no se ha llegado a una total comprensión de cómo tiene lugar este proceso. El primer paso para la entrada de un virus en el molusco es la adsorción de las partículas virales al mucus de las branquias durante la filtración de agua. Esta adsorción ocurre principalmente por la formación de enlaces iónicos entre las partículas virales y los mucopolisacáridos, especialmente el ácido hialurónico, que existe como hialuronosulfatos en los compuestos mucosos. Se ha sugerido que este proceso se ve afectado por la salinidad y el pH del mucus (Di Girolamo y col., 1977; Bedford y col., 1978). La producción de mucus depende del contenido de glucógeno del tejido conectivo y del desarrollo gonadal del individuo (Galtsoff, 1964). Se han observado variaciones en los niveles de glucógeno relacionados con la gametogénesis. Existen patrones similares en el caso de diversas especies de moluscos bivalvos como la almeja, la navaja o la ostra. El glucógeno se acumula durante el otoño y el invierno, durante el periodo sexualmente activo de los individuos (noviembre y diciembre) y el comienzo de la gametogénesis (enero-marzo). El contenido más bajo de glucógeno ocurre

durante la madurez (mayo-agosto) y especialmente durante el desove (junio-agosto) (Rodríguez de la Rúa y col., 2002).

Una vez en el estómago y en la glándula digestiva, aunque algunos virus avanzan hacia el intestino y son eliminados en las heces, otros son transportados a través de las paredes del tracto digestivo a regiones más internas del molusco (Le Guyader y col., 2006a; McLeod y col*.,* 2009). Así, se ha detectado HAV en células basales del epitelio del tejido digestivo (Romalde y col*.,* 1994) y NoV en el lumen del tracto digestivo, dentro de las células gastrointestinales y dentro de fagocitos tanto en epitelio como en tejido conectivo (Le Guyader y col., 2006a; McLeod y col*.,* 2009). Los hemocitos son un tipo de células presentes en el lumen del tracto digestivo y en la hemolinfa, y cuya función es la digestión de partículas exógenas y la fagocitosis de patógenos. Estudios recientemente realizados en ostras han demostrado que, además de las células gastrointestinales y los fagocitos, los virus persisten en el interior de los hemocitos, al resistir la digestión de las vesículas de ácido fagolisosomal (Provost y col., 2011). La internalización de partículas virales intactas al interior de las células puede ser una explicación para la poca eficiencia que generalmente tienen los procesos de depuración a la hora de eliminar virus presentes en moluscos bivalvos. Sin embargo, se han observado diferencias en la bioacumulación y en las tasas de depuración de distintos virus entéricos en moluscos bivalvos (Nappier y col*.,* 2008). Esto podría estar relacionado con determinadas propiedades virales o bien con la especificidad de ligandos. En el caso de NoV, se ha demostrado la unión especifica de determinadas cepas al tracto digestivo de los moluscos mediante ligandos similares a los antígenos de histocompatibilidad sanguíneos tipo A humanos (HBGA, del inglés *A-like human histo-blood*

antigens) (Tian y col., 2006; 2007), sugiriendo esta especificidad como un potencial mecanismo para la concentración del virus.

1.3. Estrategias de control microbiológico del agua y de moluscos bivalvos

El consumo de agua contaminada es la principal vía de transmisión de virus entéricos y otros microorganismos patógenos para el ser humano. Por este motivo, la mala calidad del agua sigue representando uno de los principales problemas para la salud humana. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las gastroenteritis son responsables de 1,8 millones de muertes cada año. Se estima que el 88% de estas muertes se debe a la falta de un suministro de agua limpia, afectando mayoritariamente a niños de países en vías de desarrollo. No obstante, en países desarrollados, los virus entéricos también suponen un problema de contaminación de las aguas, dado que son excretados en las heces de individuos afectados y las plantas de tratamiento de aguas no aseguran su completa eliminación (da Silva y col., 2007; Schuster y col., 2010).

Asimismo, el consumo de moluscos bivalvos esta implicado en la transmisión de diferentes enfermedades infecciosas, siendo las de etiología vírica las más comunes (Lees, 2000). Aunque algunas de las enfermedades transmitidas por moluscos están causadas por la presencia natural de determinados patógenos (por ejemplo, *Vibrio* spp.), los virus entéricos proceden únicamente de la contaminación fecal mayoritariamente de origen humano. El tratamiento de las aguas residuales constituye la primera línea de defensa para evitar la contaminación de las zonas de crecimiento de los moluscos bivalvos. Sin embargo, dado que el

tratamiento de las aguas residuales no garantiza la completa eficacia a la hora de eliminar la presencia de virus entéricos, la mayoría de países han intentado mejorar los controles sanitarios aplicados a la producción de moluscos, basándose principalmente en el uso de bacterias indicadoras de contaminación fecal como medida principal de control del producto final y de las zonas de producción (Lees, 2010).

1.3.1. Bacterias como indicadoras de la presencia de virus entéricos

Dado que los virus entéricos son transmitidos mediante ruta fecal-oral, la detección de componentes presentes en las heces mediante pruebas sencillas podría ser utilizado como indicador de la presencia de microorganismos patógenos, incluidos virus. Estos indicadores de contaminación fecal pueden ser tanto químicos como microbiológicos. La detección de indicadores químicos, como el coprostanol es compleja y los equipos empleados tienen una sensibilidad limitada (Dutka y col., 1974). Por el contrario, las pruebas microbiológicas resultan más sencillas, pudiendo detectar microorganismos vivos con un equipo mínimo y fácilmente utilizable, aumentando de este modo el número de laboratorios capaces de realizar los análisis. Además, generalmente, la sensibilidad de estas pruebas es mayor. Por este motivo, en la mayoría de estudios se han empleado bacterias como indicadoras de la contaminación fecal.

Para ser utilizadas como indicadores de contaminación viral, las bacterias deben poseer determinadas características. La más importante es que su presencia debe estar bien correlacionada con la presencia de virus entéricos en un determinado ambiente; si no se detecta la bacteria indicadora, los virus entéricos tampoco deben detectarse o estar presentes en bajo número de copias. Por el contrario, si la presencia de la bacteria

indicadora es alta, los virus entéricos deben detectarse con mucha frecuencia. Además, no deben ser patógenas, simplificando los procedimientos necesarios para su cultivo e identificación, así como el peligro de una posible contaminación accidental para los trabajadores del laboratorio. Por último, deben sobrevivir en un ambiente dado aproximadamente tanto como el virus, de manera que su detección pueda relacionarse con la presencia de virus en ese mismo momento (Berg y Metcalf, 1978).

Las bacterias comúnmente utilizadas como indicadores de la contaminación fecal son *Escherichia coli*, coliformes, estreptococos fecales, *Clostridium perfringens* y bacterias anaerobias presentes en el intestino humano (*Bacteroides*).

1.3.2. Control microbiológico del agua

La importancia para la salud pública de las aguas destinadas al consumo humano hace necesaria la fijación de normas de calidad. Con este fin se ha establecido la reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público (Anónimo, 2003). Según esta normativa, la cual es aplicable a todas las aguas destinadas al consumo humano (salvo las minerales naturales y las medicinales), deben determinarse los siguientes parámetros microbiológicos mediante métodos analíticos estandarizados:

* *Escherichia coli* (concentración máxima admisible 0 ufc/100 ml)

* *Enterococcus* (concentración máxima admisible 0 ufc/100 ml)

* *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas) (concentración máxima admisible 0 ufc/100 ml)

En situaciones particulares que requieran una especial vigilancia sanitaria del agua, conviene completar los análisis determinando además

bacteriófagos fecales, *Salmonella*, estafilococos patógenos y enterovirus. Además, el agua no debe contener organismos parásitos, ni algas ni otros elementos particulados.

Asimismo, con el objetivo de controlar el riesgo sanitario que las aguas recreativas representan para la salud humana, se aprobó la Directiva 2006/7/CE (Anónimo, 2006a) que incluye los estándares de calidad relativos a las aguas de baño. En esta legislación se establecen unos valores guía que determinan la calidad microbiológica del agua, tal y como se resume en la Tabla 1.2.

Actualmente, la valoración de la calidad del agua se lleva a cabo basándose fundamentalmente en parámetros bacterianos. El control rutinario de estos parámetros puede significar una mejora, aunque las limitaciones que presentan dichos estándares conducen a una revisión de la normativa y a considerar alternativas.

Tabla 1.2: Parámetros microbiológicos del agua

AGUAS CONTINENTALES				
Parámetro	Calidad excelente	Calidad buena	Calidad suficiente	Métodos de análisis de Referencia
Enterococos intestinales (ufc/100 ml)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 o ISO 7899-2
Escherichia coli (ufc/100 ml)	500 (*)	1000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 o ISO 9308-1
AGUAS COSTERAS Y DE TRANSICIÓN				
Parámetro	Calidad excelente	Calidad buena	Calidad suficiente	Métodos de análisis de Referencia
Enterococos intestinales (ufc/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 o ISO 7899-2
Escherichia coli (ufc/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 o ISO 9308-1

(*) Con arreglo a la evaluación del percentil 95
(**) Con arreglo a la evaluación del percentil 90

1.3.3. Controles microbiológicos en moluscos. Clasificación de las áreas de cultivo de moluscos

Con el fin de producir moluscos bivalvos aptos para el consumo humano tanto la legislación de la UE como la de EEUU, recoge normativas según las cuales las zonas de crecimiento de moluscos se clasifican en función de indicadores bacterianos de contaminación fecal. Los niveles de indicadores fecales detectados determinan el tratamiento apropiado que los moluscos necesitan para ser aptos para consumo humanos. La tabla 1.3 muestra un resumen de la legislación europea para el control de la contaminación microbiológica de moluscos bivalvos (Anónimo, 2004 a-d; Anónimo, 2005; Anómino, 2008a).

En la UE, la legislación establece que los indicadores bacterianos han de determinarse en la carne de los moluscos y en el agua intervalvar, mientras que en EEUU se establece que los niveles de los indicadores se evaluarán en las aguas de cultivo. En ambas legislaciones se establece que el método a utilizar para la determinación de los niveles de indicadores es la técnica del número más probable empleando la variante de 5 tubos y 3 diluciones.

Los puntos críticos de entrada de contaminación se identifican mediante una evaluación de la línea costera y, en función de estos datos, se establece un programa de monitorización adecuado. En la actualidad, en Galicia existe una normativa desarrollada para actualizar y dar cumplimiento a la reglamentación europea, la Orden del 8 de Septiembre de 2006 (DOG nº 177 del 13 de Septiembre del 2006 y corrección de los errores DOG nº 235 del 7 de Diciembre del 2006 [Anónimo 2006b,c]) por la que se declaran y clasifican las zonas de producción de moluscos bivalvos y otros invertebrados marinos en las aguas de competencia de la Comunidad Autónoma de Galicia.

De acuerdo con la legislación vigente en la UE, se clasifican como zonas de "categoría A" aquellas que presentan niveles microbiológicos menores de 230 *E. coli* por 100 g de molusco. Los moluscos recolectados en estas zonas se consideran aptos para el consumo humano, sin necesidad de ningún procesado posterior (Tabla 1.3).

Las zonas de "categoría B" son aquellas en las que los moluscos presentan entre 230 y 4600 *E. coli* por 100 g de molusco. Los moluscos procedentes de estas zonas pueden comercializarse tras ser sometidos a un proceso de depuración o de reubicación en una zona clasificada como A (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Resumen de los estándar legales en la UE para moluscos bivalvos vivos.

Clasificación de la UE	Estándar Microbiológico 100 g de molusco	Tratamiento de los moluscos
Categoría A	< 230 *E.coli*	No requerido
Categoría B	< 4600 *E.coli*	Depuración/Reubicación
Categoría C	4600-46000 *E.coli*	Reubicación (> 2 meses)

Las zonas de "categoría C" son aquellas en las que los moluscos presentan niveles entre 4600 y 46000 *E. coli* por 100 g de molusco (Tabla 1.3). Los moluscos recolectados en estas zonas solamente podrían ser comercializados tras un periodo prolongado de reubicación (se especifica un periodo mínimo de dos meses) en aguas de categoría A. También podrían comercializarse tras un procesado industrial mediante tratamiento por calor. Sin embargo, los tratamientos por calor implican la consiguiente pérdida del valor comercial, que puede llegar a suponer hasta un 30% de

su precio en fresco. Los moluscos recolectados en zonas que exceden los niveles microbiológicos descritos anteriormente o que proceden de zonas sin clasificar no pueden ser comercializados para consumo humano.

Numerosos estudios muestran que los coliformes fecales no son buenos indicadores de la presencia de virus entéricos y que su control no es suficiente para evitar posibles brotes de enfermedades de origen vírico (Doré y col., 2000, 2003; Romalde y col., 2002). A pesar de que en numerosos países la depuración se practica de forma rutinaria, especialmente en moluscos que se comen crudos, como por ejemplo diferentes especies de ostra, existe un gran número de casos en los que los brotes de gastroenteritis están asociados al consumo de moluscos depurados que cumplen la actual normativa (Chalmers y Mcmillan, 1995; Perrett y Kudesia, 1995; Ang, 1998; Pintó y col., 2009; Guillois-Becel y col., 2009) y por tanto, este proceso no garantiza la protección del consumidor.

Por este motivo, se especificó en el reglamento 2073/2005 (Anónimo, 2005) que cuando los métodos analíticos estuviesen lo suficientemente desarrollados deberían establecerse criterios para la detección de virus patógenos en moluscos vivos. Actualmente, ya se dispone de un método de referencia para la detección de NoV y HAV en muestras de alimentos (ISO/TS 15216).

1.4. Principales virus entéricos asociados al consumo de moluscos

Dentro de los virus considerados como entéricos cabe destacar la importancia de NoV y HAV en términos epidemiológicos y en cuanto a gravedad de la enfermedad, respectivamente. NoV es el patógeno que

habitualmente causa más episodios de gastroenteritis aguda en personas de todas la edades en todo el mundo (Koopmans y Duizer, 2004). HAV es la causa más común de hepatitis a nivel global, siendo la enfermedad más grave causada por los virus transmitidos vía fecal-oral (Koopmans y Duizer, 2004).

A pesar de que en moluscos procedentes de aguas contaminadas se han detectado otros virus entéricos además de NoV y HAV, estos son los únicos cuya implicación en brotes de la enfermedad asociada al consumo de moluscos bivalvos ha podido ser demostrada (Le Guyader y col., 1996; Lees, 2000; Shieh y col., 2000).

1.4.1. Norovirus

1.4.1.1. Historia de los Norovirus

En 1929, Zahorsky describe por primera vez una enfermedad altamente infecciosa que causa diarrea, vómitos y calambres abdominales durante un periodo de tiempo relativamente corto y que generalmente tiene lugar durante los meses de invierno. Esta enfermedad fue denominada como "hiperémesis hemis" o "enfermedad de vómitos invernal" (en inglés *Winter vomiting disease*) (Zahorsky, 1929). Durante las cuatro décadas siguientes se informó de múltiples brotes de enfermedades que, clínica y epidemiológicamente, coincidían con la descrita por Zahorsky (Miller y Raven, 1936; Riemann y col., 1945; Smillie y col., 1948; Ingalls y Britten, 1951; Hopkins, 1958; Foley y Chin, 1959; Cumming y McEvedy, 1969; Levitt y col., 1970). Además, se realizaron numerosos estudios con voluntarios a los que se les transmitió la enfermedad durante las décadas de los 40 y 50, y posteriormente a comienzos de los años 70, pero todos los intentos de cultivar *in vitro* y caracterizar el agente etiológico de la enfermedad fueron infructuosos

(Blacklow y col., 1972; Clarke y col., 1972; Gordon, 1955; Gordon y col., 1947; Jordan, 1953; Kojima y col., 1948). No fue hasta 1972 cuando se determinó el agente etiológico de la enfermedad (Dolin y col., 1972; Kapikian y col., 1972). Para ello, se infectó a un grupo de voluntarios con un filtrado de heces obtenido de un brote de gastroenteritis aguda en una escuela de Norwalk, Ohio (EEUU), cuatro años antes. Tras la administración oral del inóculo, se examinaron los filtrados de las heces de los voluntarios infectados mediante microscopía inmuno-electrónica (IEM, del inglés *Immune electron microscopy*), lo que permitió identificar el virus.

A principios de la década de los noventa, Xi y col. (1990) inocularon en personas voluntarias filtrados de heces obtenidas del brote de Norwalk, con el fin de obtener una cantidad de partículas virales suficiente para la posterior caracterización del virus. Estos autores consiguieron clonar el genoma viral, permitiendo realizar una caracterización inicial que situó al virus Norwalk como miembro de la familia *Caliciviridae,* dentro del género Norovirus (previamente denominado como "virus tipo Norwalk" [*Norwalk-like viruses*]) (Figura 1.3).

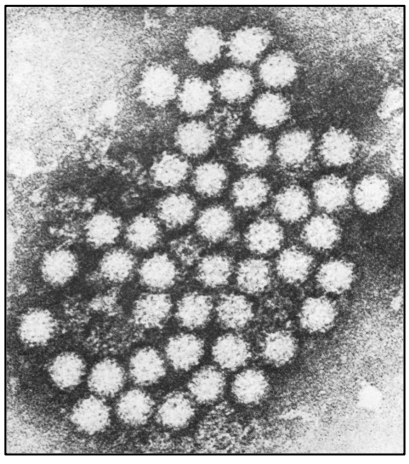


Figura 1.3: Agregados del virus Norwalk visualizado por IEM. (Kapikian y col., 1972)

La secuenciación del genoma del virus Norwalk supuso un gran avance en el conocimiento de la estructura molecular y la epidemiología de este virus, permitiendo el desarrollo de pruebas de diagnóstico, así como la determinación de la carga global de la enfermedad (Xi y col., 1990). Dado que hasta la fecha los NoV no han podido ser cultivados, el serotipado directo utilizando anticuerpos neutralizantes no es posible. Sin embargo, la RT-PCR y la secuenciación del genoma de otros "virus tipo Norwalk" han permitido demostrar que los NoV son genética y serológicamente muy diversos (Zheng y col., 2006).

1.4.1.2. Estructura y organización genómica de Norovirus

NoV son virus no envueltos con simetría icosaédrica. Los viriones consisten en un ácido nucleico y una cápside, alcanzando un tamaño entre 27 y 30 nm de diámetro. El genoma del virus consiste en una molécula lineal de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Debido a estas características, el genoma juega a su vez el papel de RNA mensajero (mRNA). La replicación de NoV tiene lugar en el citoplasma de los enterocitos. En el momento en el que el virus infecta la célula diana, se une a los ribosomas de la célula y comienza la traducción de proteínas, entre las que se encuentra una RNA polimerasa. Esta enzima utiliza el genoma viral como molde para la hebra negativa complementaria, la cual será transcrita en más copias de genoma RNA(+). La polimerasa viral no tiene actividad correctora, por lo que una tasa de error relativamente alta durante la transcripción hace que NoV, al igual que otros virus RNA, sean altamente flexibles y cada vez más diversos.

El genoma viral consiste en 7,3-8,3 kilobases (kb) (van der Poel, 2000), con un contenido de guanina-citosina (G+C) del 45-56% y se organiza en tres pautas abiertas de lectura (ORF, del inglés *open reading*

frame) (Green, 2007). El extremo 5' del genoma es una región no codificante (NCR, del inglés *non coding region*) a la que se encuentra covalentemente unida la proteína VPg (VPg, del inglés *virus protein genome linked*), la cual tiene un papel fundamental en la infectividad y en el comienzo de la traducción. El extremo 3' NCR del genoma se encuentra poliadenilado. La función de esta cola de poli A es dar estabilidad a la molécula de RNA y ayudar a la traducción (Cubitt y col., 2003).

La primera ORF (ORF 1), situada en el extremo 5´, codifica una poliproteína de 194 kiloDalton (KDa) que es escindida por la proteasa viral 3C en 6 proteínas no estructurales, implicadas en la replicación y transcripción del virus: la proteína N-terminal (Nterm) (37 KDa), una nucleótido trifosfatasa (NTPasa) (40 KDa), la proteína p22 (20,2 KDa), la proteína VPg (15,8 KDa), una proteasa (Pro) (19,3 KDa) y una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, del inglés *RNA dependent RNA polymerase*) (56,8 KDa) (Belliot y col, 2003) (Figura 1.4).

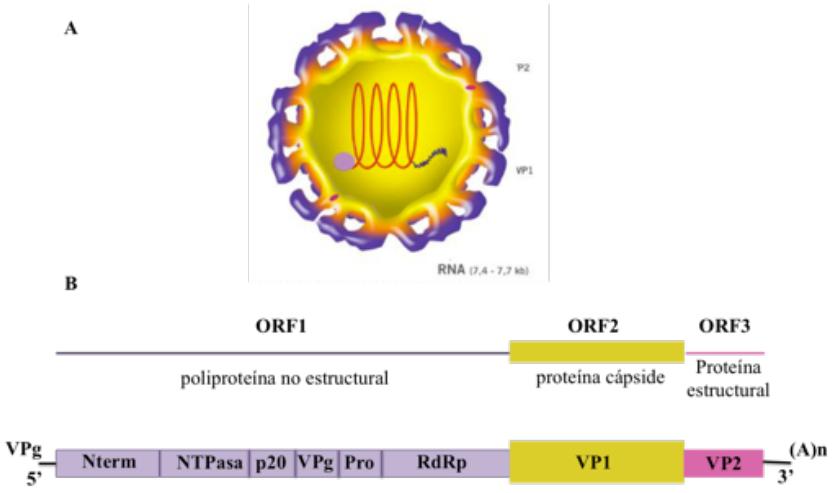


Figura 1.4: A) Representación esquemática de la estructura del virión. B) Esquema de la organización genómica de NoV, en el que se muestran las distintas proteínas codificadas en cada uno de los tres ORF (Modificado de Mesquita, 2011).

La segunda ORF (ORF 2), codifica la proteína principal de la cápside (VP1), de un tamaño de 60 KDa. Esta proteína consta de dos dominios: P (protuberante, dividida en dos subdominios, P1 y P2) y S (concha, del inglés *Shell*). El dominio S, altamente conservado, constituye la región más interna de la cápside. El subdominio P1, moderadamente conservado, es una región de unión entre S y P2. El subdominio P2, el cual se sitúa en la superficie del virus y es codificado por la región más variable del genoma (Chakravarty y col., 2005; Tan y col., 2004), posee receptores de unión al huésped, por lo que se considera responsable de la antigenicidad del virus (Figura 1.4).

La tercera ORF (ORF 3), es una región variable del genoma y codifica para una proteína estructural (VP2) de 23 KDa. La función de esta proteína se asocia con la regulación de la expresión en *cis* de VP1 y la estabilización de la estructura del virus (Bertolotti-Ciarlet y col., 2003) (Figura 1.4).

1.4.1.3. Taxonomía

El género Norovirus, previamente denominado "virus tipo Norwalk", se clasifica dentro de la familia *Caliciviridae*. Esta familia consiste en 5 géneros distintos incluyendo Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus y Nebovirus (Clarke y col., 2012). La familia *Caliciviridae* fue propuesta por primera vez en el año 1974. Hasta entonces, los Calicivirus constituían un género dentro de la familia *Picornaviridae* (Barry y col., 2008). Sin embargo, las diferencias morfológicas, como el tamaño o la densidad de la partícula viral, la composición de la cápside y el proceso de replicación, condujo a la decisión de clasificar los Calicivirus en una familia distinta (Burroughs y Brown, 1974).

Históricamente, la clasificación de NoVs se basaba en experimentos de infección cruzada en voluntarios y en análisis de reactividad cruzada mediante microscopía inmunoelectrónica (Green y col., 1995; Lewis y col., 1995; Okada y col., 1990; Wyatt y col., 1974). Sin embargo, estas clasificaciones antigénicas resultaban muy poco precisas debido, principalmente, a las reacciones cruzadas entre los anticuerpos (Ando y col., 2000). Además, como ya se ha mencionado, los NoV no son cultivables por lo que el serotipado directo basado en seroneutralización no es una técnica aplicable (Duizer y col., 2004). En consecuencia, la RT-PCR y la secuenciación genómica se han convertido en las principales técnicas empleadas para la caracterización de estos virus y para la comprensión de las relaciones existentes entre distintas cepas (Ando y col., 2000; Katayama y col*.,* 2002). Actualmente, la caracterización de NoV se realiza en base a cuatro regiones del genoma, todas ellas conservadas. Estas regiones son la región A (el gen de la RdRp localizado en la ORF1), la región B (extremo 3´de la ORF1), la región C (un fragmento corto próximo al extremo 5' de la ORF2) y la región D (extremo 3´de la ORF2) (Ando y col*.,* 2000; Vinjé y col*.,* 2004).

Con el fin de establecer un sistema de clasificación estándar para NoV, Zheng y col. (2006) realizaron un estudio filogenético detallado en base a la secuencia completa de la ORF2 (Figura 1.5).

La elección de esta región se debió a que, dado que codifica para la proteína estructural VP1, que contiene receptores celulares y determinantes inmunológicos, podría relacionar serotipos y fenotipos virales. Además, es una región de una longitud suficiente como para permitir una adecuada diferenciación entre cepas. NoV se clasifica en 5 genogrupos (GI-GV) dentro de los cuales existen, al menos, 32 genotipos distintos (Zheng y col., 2006; 2010).

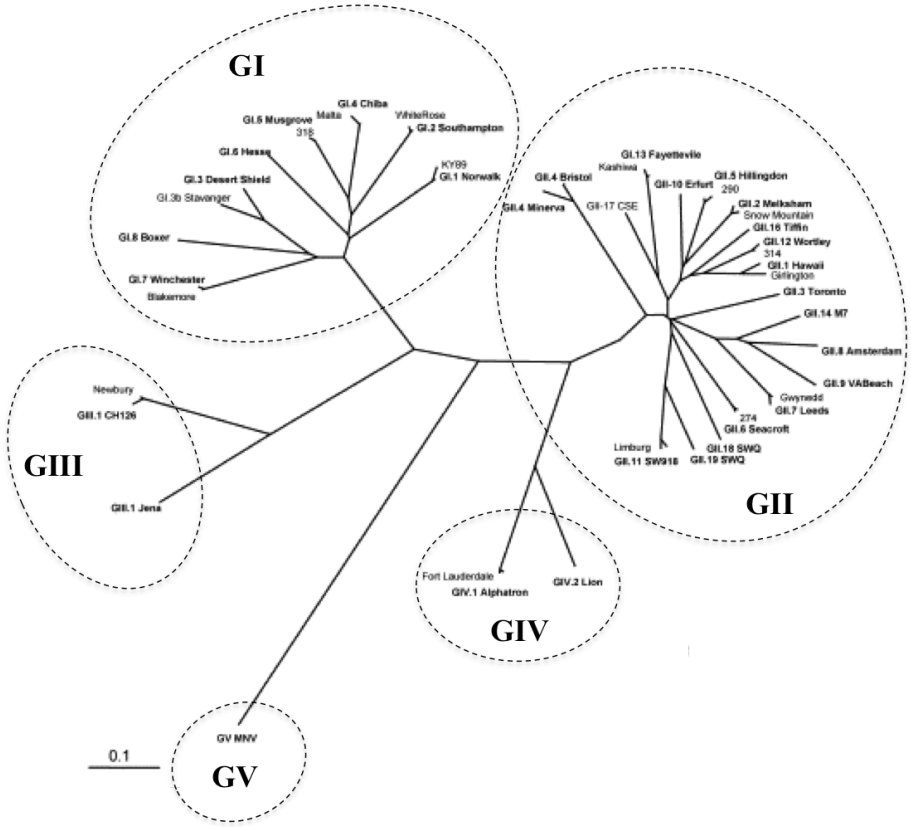


Figura 1.5: Análisis filogenético de NoV en base a la secuencia completa del ORF2, representando todos los genogrupos y genotipos. La barra representa la unidad para el número esperado de sustituciones por sitio (Adaptado de Patel y col., 2009)

Los genogrupos I y II son los más numerosos, contando con 8 y 19 genotipos distintos, respectivamente (Zheng y col., 2006; 2010). Estos 2 genogrupos, junto con el genogrupo IV, afectan a humanos. Dentro del genogrupo II, existen 3 genotipos de NoV porcinos y dentro del genogrupo IV, uno de los dos genotipos que lo componen está formado por cepas que afectan al león (Martella y col., 2007). El genogrupo III incluye cepas bovinas, clasificadas en dos genotipos distintos. El

genogrupo V consta de un único genotipo de cepas de ratón (Zheng y col., 2006). La cepa de origen murino, MNV-1, es el único NoV capaz de crecer en cultivo celular (Karst y col., 2003). Recientemente, se ha propuesto un nuevo genogrupo (GVI) con una única cepa de origen canino (Mesquita y col., 2010).

Las secuencias de NoV presentan una gran divergencia genética. Numerosos estudios establecen que la secuencia del gen de la cápside varía hasta un 60% entre los distintos genogrupos y hasta un 57% en los NoV humanos (Green y col., 1995; Katayama y col., 2002; Vinjé y col., 2000). Este nivel de diversidad es mucho mayor que el de otros virus RNA de cadena sencilla, lo que sugiere que NoV evoluciona más rápidamente, aunque la dinámica evolutiva sigue siendo desconocida (Zheng y col., 2006).

1.4.1.4. Infección en humanos

A. Vías de transmisión

Los NoV poseen una dosis infectiva muy baja (18-1000 partículas virales) (Teunis y col, 2008). Además, en las heces de los individuos enfermos se excreta un elevado número de copias del virus (10^5-10^9 partículas/g de heces) durante un tiempo prolongado (4-8 semanas). Son estables en el ambiente, pudiendo contaminar una amplio rango de fómites y son resistentes a los agentes químicos de desinfección convencionales. El virus puede diseminarse mediante los aerosoles producidos por el vómito de individuos afectados (hasta 10^7 partículas en un único episodio) (Chesbrough y col., 1997), contaminando el ambiente y provocando futuras exposiciones (Lopman y col., 2012a). Estas características son las ideales para hacer de este virus un patógeno capaz de provocar brotes de gastroenteritis aguda, considerándose como un agente potencial de

bioterrorismo de categoría B, de acuerdo con la clasificación de patógenos importantes para biodefensa del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID, del inglés *National Institute of Allergy and Infectious Disease*).

Los NoV se transmiten por ruta fecal-oral o vómito-oral (Figura 1.7). Se cree que la transmisión del virus mediante contacto directo persona-persona es el principal modo de diseminación en la mayoría de los brotes y casos esporádicos (de Witt y col., 2003; Lopman y col., 2003; Phillips y col., 2010a; Yen y col., 2011). La transmisión mediante el consumo de agua o alimentos contaminados, como moluscos o vegetales, es también muy común (Marks y col., 2000, 2003; Rutjes y col., 2006).

Además, recientemente se ha demostrado que la transmisión a través del ambiente (fómites) está también implicada en la dispersión del virus. Se observó que diversos grupos de personas en un mismo escenario, sin contacto directo entre ellos, resultaron secuencialmente infectados debido a la contaminación presente en dicho ambiente tras un episodio inicial de vómito o a la contaminación de determinadas superficies con materia fecal (Anónimo, 2008b; Otter y col., 2011; Thornley y col., 2011).

Se ha sugerido que, aunque el contacto directo es el mayor riesgo de transmisión, la capacidad de infección es mucho más duradera a partir de superficies contaminadas (Figura 1.7). Generalmente, la capacidad de infección mediante transmisión directa se mantiene, como promedio, sólo un día. Sin embargo, la duración de la secreción de virus en las heces y la potencial transmisión ambiental origina una elevada heterogeneidad en la duración de la capacidad de infección en los distintos casos (Lopman y col., 2012a).

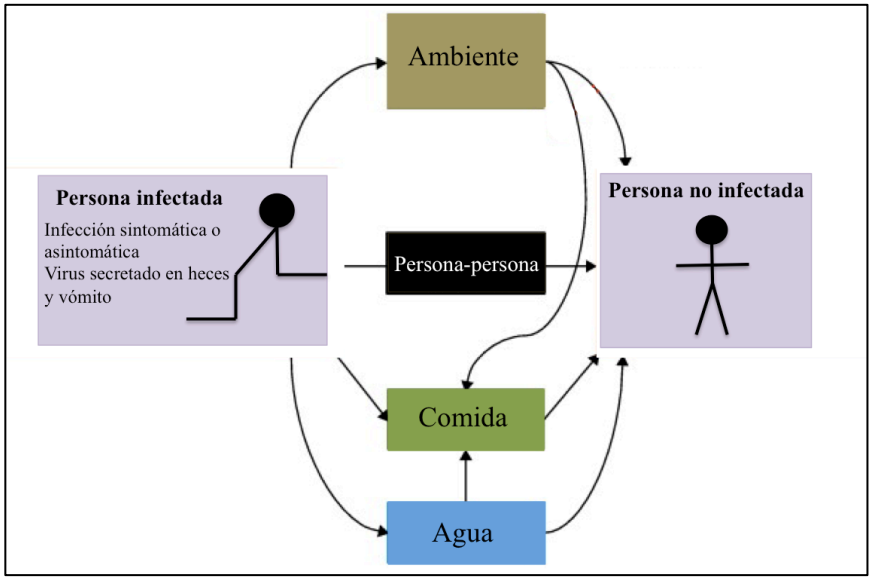


Figura 1.6: Principales vías de transmisión de NoV (Modificado de Lopman y col., 2012a)

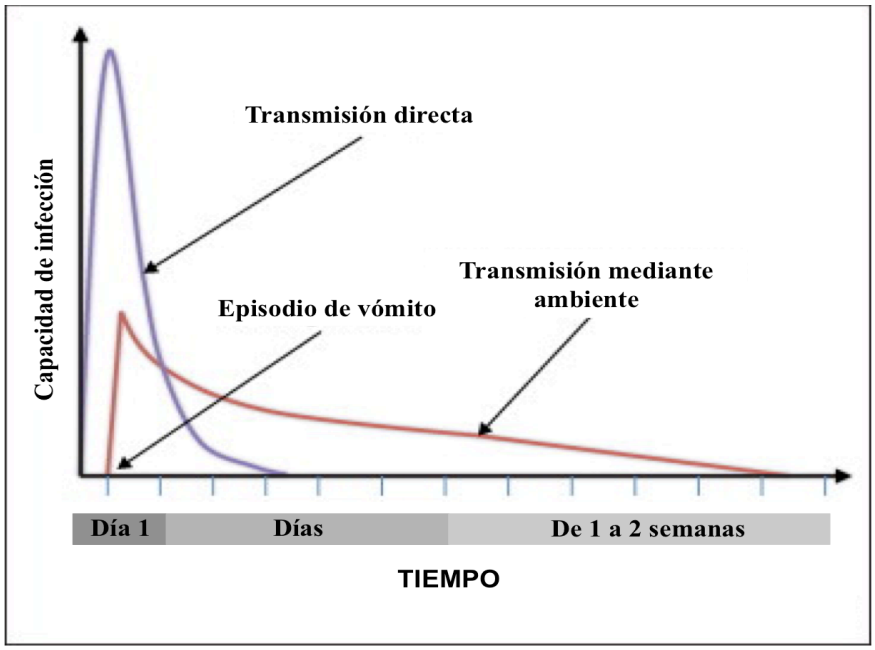


Figura 1.7: Ilustración de la posible capacidad de infección de las distintas vías de transmisión. La cantidad total de transmisión resultante de la transmisión directa o de la transmisión ambiental se ve representada por el área existente bajo cada una de las curvas. El número total de casos resultantes de un primer caso (el numero de reproducción) es la suma de las áreas bajo ambas curvas y es complicado de estimar en la práctica (Modificado de Lopman y col., 2012a).

B. Características clínicas de la enfermedad

La infección por NoV generalmente tiene un periodo de incubación de 24-48 h y se caracteriza por producir en las personas afectadas náuseas, vómitos, calambres abdominales, mialgias y diarrea no sanguinolenta. Los síntomas de la enfermedad suelen durar de 2 a 3 días aunque se ha observado que, en el caso de pacientes afectados durante brotes hospitalarios y en niños menores de 11 años, pueden durar de 4 a 6 días (Rockx y col., 2002; Lopman y col., 2004a). Los vómitos son más frecuentes en pacientes mayores de 1 año, mientras que los niños menores de un año suelen presentar sólo diarrea. (Kaplan y col., 1982; Rockx y col., 2002). En un 37-45% de los casos, los pacientes presentan fiebre, que suele durar aproximadamente 24 h (Kaplan y col., 1982; Dedman y col., 1998). Algunos pacientes pueden presentar formas más severas de la enfermedad, estimándose en un 10% los casos que requieren hospitalización por deshidratación. Los ancianos y los individuos inmunodeprimidos son grupos de riesgo, en los que la infección por NoV puede llegar a producir la muerte del paciente (Rockx y col., 2002; Mattner y col., 2006; Lopman y col., 2004a). Un 30% de las infecciones por NoV resultan asintomáticas. Estos individuos pueden transmitir el virus, aunque en menor medida que los individuos que sí manifiestan la enfermedad. Tras la infección, no se produce inmunidad en el individuo o se produce durante un periodo de tiempo corto, por lo que una persona puede ser infectada repetidas veces (Johnson y col., 1990; Parrino y col., 1977).

C. Epidemiología

NoV son la principal causa de brotes de gastroenteritis aguda en todo el mundo. Se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente el 50% de los brotes totales y de más del 90% de los

brotes de origen no bacteriano (Patel y col., 2009). Aunque los brotes de gastroenteritis causados por NoV tienen lugar durante todo el año, en climas templados el número de brotes es notablemente mayor en los meses fríos (Mounts y col., 2000).

Sin embargo, la prevalencia de NoV como causa de casos esporádicos de gastroenteritis aguda está mucho menos documentada y probablemente se encuentra infraestimada en la mayor parte del mundo. Esta infraestimación puede deberse a: i) la falta de diagnóstico clínico rutinario para NoV, que hace difícil precisar la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, en España no se realizan análisis virológicos rutinarios en caso de gastroenteritis, excepto para rotavirus y adenovirus, que son diagnosticados mediante la técnica de EIA cuando es requerido; ii) la gastroenteritis causada por NoV es una enfermedad leve y auto-limitante, aunque se han documentado varios casos severos de la enfermedad e incluso muertes (Widdowson y col., 2005; Scallan y col., 2011; Harris y col., 2008; Rondy y col., 2011); iii) muchas de las personas afectadas de gastroenteritis no acuden al médico.

Se han realizado algunos estudios en grupos de comunidades pequeñas utilizando técnicas de diagnóstico sensibles, aunque son muy poco frecuentes. Los datos obtenidos a partir de estudios de este tipo llevados a cabo en Inglaterra y Holanda estiman una incidencia en la población de entre 4,1 y 4,6 casos por cada 100 personas al año (de Witt y col, 2001a; Phillips y col., 2010b). Estudios realizados a nivel regional muestran datos similares (Karsten y col., 2009; Hall y col., 2011). Se estima que en EEUU los NoV causan 21 millones de casos de gastroenteritis aguda (Scallan y col., 2011) y más de 70.000 hospitalizaciones anuales en personas de todas las edades (Lopman y col., 2011).

El 90% de los aislados de NoV en casos de gastroenteritis pertenecen al genogrupo II. Dentro de este genogrupo, las cepas mayoritarias son las pertenecientes al genotipo II.4 (Bull y col., 2006; Ramirez y col., 2006; Siebenga y col., 2007a). La elevada incidencia de las infecciones causadas por NoV parecen estar relacionadas con la aparición secuencial y la rápida propagación de nuevas variantes y/o cepas recombinantes de NoV. Las mutaciones clave en la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la cápside VP1 se asocian con la emergencia consecutiva de nuevas variantes de GII.4 en todo el mundo (Vinje y Koopmans, 1996; Lopman y col., 2004b; Gallimore y col., 2007; Siebenga y col., 2007b). Se ha documentado que en los años en los que emerge una nueva variante de GII.4, la carga de la enfermedad aumenta considerablemente incrementando el número de hospitalizaciones hasta aproximadamente el 50% (Lopman y col., 2004b; Lindesmith y col., 2008).

D. Principales técnicas de diagnóstico de NoV

El diagnóstico clínico permite diferenciar los casos causados por NoV de los causados por otros patógenos en base a las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad. Además, existen diversos métodos de detección de NoV, que confirmarían el diagnóstico clínico, entre las que se encuentra la microscopía electrónica, las pruebas inmunológicas, la RT-PCR/RT-qPCR y los ensayos Luminex.

Microscopía electrónica: Está técnica es poco sensible pero específica para el diagnóstico de NoV. Puede suponer una técnica de diagnóstico rápido, siempre y cuando las muestras sean tomadas pocos días después de que comiencen los síntomas. No obstante, en la mayoría de laboratorios de diagnóstico microbiológico no se dispone de microscopios electrónicos ni de personal cualificado para su uso.

Pruebas inmunológicas: Se basan en el uso de anticuerpos específicos para la detección de los antígenos de NoV presentes en las heces. La principal limitación de esta técnica es la elevada diversidad antigénica de NoV (Kirby y col., 2010). Existen distintos tests comerciales en dos formatos distintos, los dispositivos ELISA o los inmuno-cromatográficos. Existen diferencias en los resultados obtenidos para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de estos dispositivos, ya que se ven influenciadas por la diversidad de las cepas incluidas en los estudios (Gray y col., 2007).

RT-PCR/RT-qPCR: actualmente, es el método más empleado en el diagnóstico de NoV. Es una técnica sensible y específica y que, en el caso de la RT-qPCR, permite cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente en la muestras. Además, recientemente se ha desarrollado un ensayo de RT-PCR multiplex, que permite la detección simultanea de diversos patógenos virales, entre ellos NoV, y que ha demostrado ser sensible y específica (Khamrin y col., 2011). No obstante, el tener que adecuar las condiciones para diversas parejas de cebadores en un mismo protocolo de amplificación, así como las cantidades relativas de los ácidos nucleicos de cada patógeno presentes en las muestras clínicas, puede reducir la sensibilidad de la técnica.

Ensayos Luminex: Estos ensayos suponen una alternativa a la multiplex PCR, basándose en la tecnología Luminex. Esta tecnología consiste en la hibridación de productos de PCR marcados y sondas de oligonucleótidos, que se encuentran unidas a microesferas carboxiladas. Estudios empleando esta tecnología en una PCR diseñada para la detección de 5 patógenos gastrointestinales distintos, mostraron que la sensibilidad y especificidad obtenidas eran del 94% para la detección de

NoV, lo cual es comparable a la monoplex-RT-qPCR (Dunbar y col., 2006).

La gastroenteritis causada por NoV es normalmente de duración corta y generalmente los principales síntomas han cesado para cuando los resultados de laboratorio están disponibles. En general, el diagnóstico clínico de la enfermedad no es significativo y no se recomienda su uso dado que no afecta al tratamiento de los pacientes. Sin embargo, existen excepciones a esta recomendación, por ejemplo, en casos de pacientes con gastroenteritis que trabajen en centros de salud, colegios, o manipulen alimentos. En estos casos, el diagnóstico clínico si puede permitir un mejor manejo de los casos, evitando un mayor número de infecciones si se evita la incorporación de los individuos afectados al trabajo, a la espera de los resultados de los análisis de detección (Kirby y Iturriza-Gomara, 2012).

Las técnicas moleculares son la herramienta analíticamente más exacta para la detección de NoV. No obstante, estos procedimientos son relativamente largos, resultando costosos y laboriosos. Los test inmunológicos son rápidos y requieren de menos infraestructura de laboratorio, y pueden resultar útiles cuando no se pueden emplear las técnicas moleculares o en situaciones de brotes. La detección de NoV en los países en desarrollo se realiza únicamente en estudios de investigación, debido a la infraestructura y al alto coste asociado a los análisis moleculares. En los últimos años, en los países desarrollados, la detección de NoV mediante multiplex RT-PCR es cada vez más utilizada para el diagnóstico clínico. Como resultado, cabe esperar que se observe un aumento en los datos de prevalencia, una mejora en la unificación de resultados y una mayor información sobre

morbimortalidad, distribución en la población y características epidemiológicas de la enfermedad (Kirby y Iturriza-Gomara, 2012).

1.4.1.5. Norovirus y consumo de moluscos bivalvos

La relación existente entre el consumo de moluscos bivalvos contaminados y los brotes de gastroenteritis aguda causados por NoV está ampliamente demostrada desde hace décadas. El primer caso documentado de la asociación entre consumo de moluscos y gastroenteritis viral ocurrió en el invierno de 1976/77 en Gran Bretaña, cuando tras el consumo de berberechos cocidos se detectó un brote que afectó a más de 800 personas (Appleton y Pereira, 1977). En las heces de una gran proporción de los pacientes se detectaron por microscopía electrónica pequeñas partículas virales redondeadas, similares al virus Norwalk, identificado como agente etiológico de "la enfermedad de vómitos de invierno" cuatro años antes (Dolin y col., 1972; Kapikian, 1972).

En 1978, tuvo lugar un brote asociado al consumo de ostras en Sydney (Australia), afectando a más de 2000 personas (Murphy y col., 1979). Las investigaciones realizadas no encontraron ninguna bacteria en las muestras analizadas, pero sí se observaron por microscopía electrónica en las heces de algunos pacientes unas partículas similares a los parvovirus. Posteriormente, estas partículas se identificaron como virus Norwalk, demostrando la implicación de este virus en un caso de enfermedad entérica por consumo de moluscos. Este brote se asoció a una contaminación ocasional de la zona de cultivo de las ostras por aguas residuales tras un periodo de fuertes lluvias. De hecho, ostras congeladas procedentes de la misma zona fueron la causa de otro brote en Darwin (Australia) en diciembre de 1978 donde, de nuevo, se detectó el virus de

Norwalk en las heces de los pacientes mediante microscopía electrónica e inmunoelectrónica (Linco y Grohmann, 1980).

Estudios posteriores, consistentes en ensayos de consumo de moluscos contaminados experimentalmente, realizados en Australia con voluntarios demostraron la importancia del virus de Norwalk como agente causal de gastroenteritis (Grohmann y col., 1981). En 1981, Appleton y col. examinaron materia fecal procedente de 10 brotes independientes de gastroenteritis asociada al consumo de moluscos y detectaron partículas virales similares al virus Norwalk en el 90% de las muestras, evidenciando así el importante papel de este virus en las infecciones transmitidas por moluscos en Gran Bretaña (Appleton y col., 1981).

Desde estos primeros estudios se han publicado numerosos casos y ejemplos de brotes de gastroenteritis causados por Norovirus asociados al consumo de moluscos (Richards, 1985; Jaykus y col., 1994; Rippey, 1994; Mead y col., 1999). En EEUU, los primeros casos documentados datan de 1980 en el Estado de Florida, con varios individuos afectados tras el consumo de ostras (Guun y col., 1982). Posteriormente, en 1982, la situación se describió como de proporciones epidémicas con 103 brotes y más de 1000 personas infectadas tras el consumo de almejas u ostras sólo en el Estado de Nueva York (Morse y col., 1986). El virus de Norwalk se consideró el agente causal en base a la sintomatología clínica, datos de seroconversión en los pacientes y detección de este virus en los moluscos por radioinmunoensayo. Los moluscos provenían de varios estados del noreste de EEUU y, de nuevo, la fuente de contaminación eran las aguas residuales tras periodos de fuertes lluvias.

Estos y otros brotes ocurridos en la década de los 80, propiciaron la importación en EEUU de moluscos depurados procedentes de países europeos, principalmente Gran Bretaña. Sin embargo, al menos 14 brotes

independientes de gastroenteritis, que afectaron a más de 2.000 personas en Nueva York y Nueva Jersey en un periodo de tres meses durante 1983, se relacionaron con el consumo de almejas importadas (Richards, 1985). Sólo uno de estos brotes afectó a más de 1.100 individuos tras consumir almejas en un picnic. En Gran Bretaña también aparecieron casos de gastroenteritis producidos por Norovirus asociados a moluscos depurados. Así, en 1983, ostras que habían sido depuradas durante 72 horas fueron las responsables de un brote que afectó a más de 300 personas (Gill y col., 1983), con una incidencia del 79% entre los individuos que habían consumido moluscos. En años posteriores hubo más evidencias en Europa de la asociación de brotes de gastroenteritis y moluscos depurados, principalmente ostras (Heller y col., 1986; Chalmers y Mcmillan, 1995; Perrett y Kudesia, 1995; Ang, 1998).

Hasta la fecha, siguen surgiendo brotes de gastroenteritis viral asociados al consumo de moluscos bivalvos en un gran número de países. Los incidentes varían en alcance e importancia, pero los NoV son invariablemente la causa principal en todos ellos (Le Guyader y col., 2006b, 2010; Nenonen y col., 2009; Iizuka y col., 2010).

Los NoV detectados en moluscos pertenecen tanto al genogrupo I como al genogrupo II. Sin embargo, los estudios realizados sobre la epidemiología molecular de NoV en muestras clínicas revelan un predominio a escala global del genogrupo II respecto al I. Las aguas residuales que pueden contaminar las áreas de crecimiento de los moluscos, frecuentemente contienen cepas de NoV pertenecientes a este genogrupo predominante. Sin embargo, es importante destacar que NoV GI también suele estar implicado en brotes de gastroenteritis debido a que, aunque su prevalencia es menor, presenta una mayor resistencia durante

los procesos de tratamiento de las aguas residuales (Le Guyader y col. 2006b; da Silva y col. 2007).

1.4.2. Virus de la hepatitis A

1.4.2.1. Historia del virus de la hepatitis A

Las primeras referencias existentes en la literatura sobre la hepatitis vírica datan de hace siglos. Hipócrates, 400 años A.C., describió una enfermedad caracterizada por episodios de ictericia que probablemente se correspondiesen con una hepatitis vírica. La ictericia era también una enfermedad bien documentada en textos de la antigua China y Roma (Nainan y col., 2006). Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando, a mediados de los años 40, se definieron dos tipos distintos de hepatitis: la hepatitis infecciosa o hepatitis entérica, que tiene un periodo de incubación corto y se transmite por ruta fecal-oral, y la hepatitis sérica, también de naturaleza infecciosa pero de incubación más larga y de transmisión parenteral. En 1968 se describió por primera vez el virus de la hepatitis B (HBV), agente etiológico de la hepatitis sérica, demostrándose por primera vez la naturaleza vírica de esta enfermedad (Bayer y col., 1968). En 1973, se identificó mediante microscopía electrónica en muestras de heces un segundo virus de hepatitis, el virus de la hepatitis A (HAV) (Figura 1.8), agente etiológico de la de la hepatitis infecciosa (Feinstone y col., 1973).

A medida que la identificación y el estudio de virus en muestras de sangre se fueron haciendo rutinarios, se descubrió una tercera forma de hepatitis, llamada hepatitis no-A, no-B o NANB hepatitis. Dos décadas después se identificaron el virus de la hepatitis D (HDV) (Rizzetto y col., 1987) y el virus de la hepatitis C (HCV) (Choo y col., 1989), ambos de transmisión parenteral. En 1983, Balayan y col. identificaron el virus de la

hepatitis E (HEV) que, al igual que HAV, es transmitido por ruta fecal-oral.

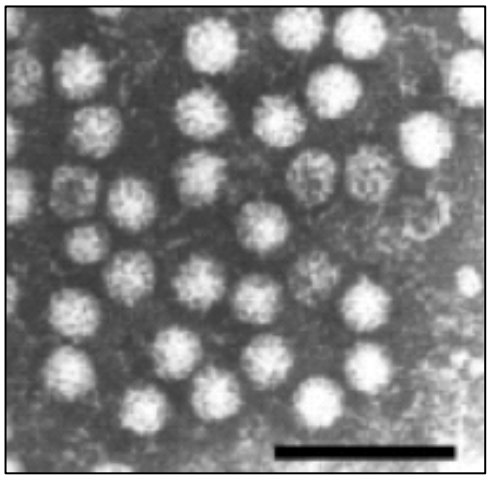


Figura 1.8: Fotografía de microscopía electrónica del virus de la hepatitis A. Barra: 100 nm (Obtenida de "The Springer Index of Viruses").

En 1979 se llevó a cabo por primera vez la replicación *in vitro* de HAV (cepa HM-175) en cultivo celular (Provost y Hilleman, 1979), lo que supuso un gran avance en la investigación de la biología, patogénesis y epidemiología de HAV y permitió el desarrollo de vacunas inactivadas y atenuadas (Binn y col., 1986; Midthun y col., 1991; Mao, 1990; Kallinowski y col., 1992). En 1987, se elucidó la secuencia nucleotídica completa de HAV (Cohen y col., 1987), lo que supuso un gran avance para posteriores estudios sobre la estructura y organización genómica del virus.

1.4.2.2. Estructura y organización genómica

Los viriones de HAV son partículas icosaédricas no envueltas de 27-32 nm de diámetro, formados por una cápside y un ácido nucleico. El

genoma consiste en un RNA de cadena sencilla positiva de aproximadamente 7,5 Kb. El extremo 5´NCR representa un 10% del genoma y se encuentra unido covalentemente a la proteína VPg. Esta región contiene el sitio interno de entrada ribosomal (IRES, del inglés *internal ribosome entry site*), una secuencia nucleotídica que permite el inicio de la traducción de proteínas. El extremo 3´NCR tiene un tamaño mucho menor y está poliadenilado. Entre los dos extremos no codificantes se encuentra una única ORF que codifica una poliproteína (P0) de aproximadamente 250 KDa. La ORF se encuentra dividida en tres regiones: P1, P2 y P3 (Figura 1.9). La región P1 codifica para proteínas estructurales o de la cápside, 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) y 1D (VP1). Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales implicadas en la replicación 2A, 2B, 2C y 3A, 3B, 3C, 3D, respectivamente. Las proteínas 2B, 2C, 3A y 3B constituyen el complejo proteico VPg, cuya función se cree que es servir como cebador para la síntesis de RNA. La proteína 3C es una proteasa, responsable de la mayor parte del procesado post-trancripcional de la poliproteína P0 y la proteína 3D, en una RNA polimerasa RNA dependiente (Cristina y col., 2007).

Como se ha explicado anteriormente, en el momento en el que el virus infecta la célula diana el genoma viral RNA (+) actúa como mRNA, uniéndose a los ribosomas de la célula y comienza la traducción de proteínas. El procesado proteolítico de la poliproteína P0 llevado a cabo por la proteasa 3C ocurre de forma simultanea a la traducción del RNA. El primer corte de la poliproteína ocurre en la unión 2A/2B (Martin y col., 1995). El segmento formado por las proteínas no estructurales 2B-3D forman un complejo macromolecular replicativo que comienza la síntesis de nuevo RNA viral (Gosert y col., 2000). Esto ocurre en las membranas del retículo endoplasmático de la célula (Gosert y col., 2000). El precursor

estructural resultante es cortado de nuevo generando dos precursores de las proteínas de la cápside: VP0 (VP4/VP2) y VP1/2A (Anderson y Ross, 1990), así como la proteína madura VP3. Mientras que VP0 es procesado por la proteasa 3C, el caso de VP1-2A es distinto. La proteína 2A, que en otros Picornavirus posee actividad proteolítica, en el caso de HAV es una extensión de la proteína estructural VP1 que actúa como señal primaria para el ensamblaje de la partícula viral (Figura 1.9). Durante la maduración de la cápside, 2A es eliminada por una proteína desconocida de la célula hospedadora (Morace y col., 2008).

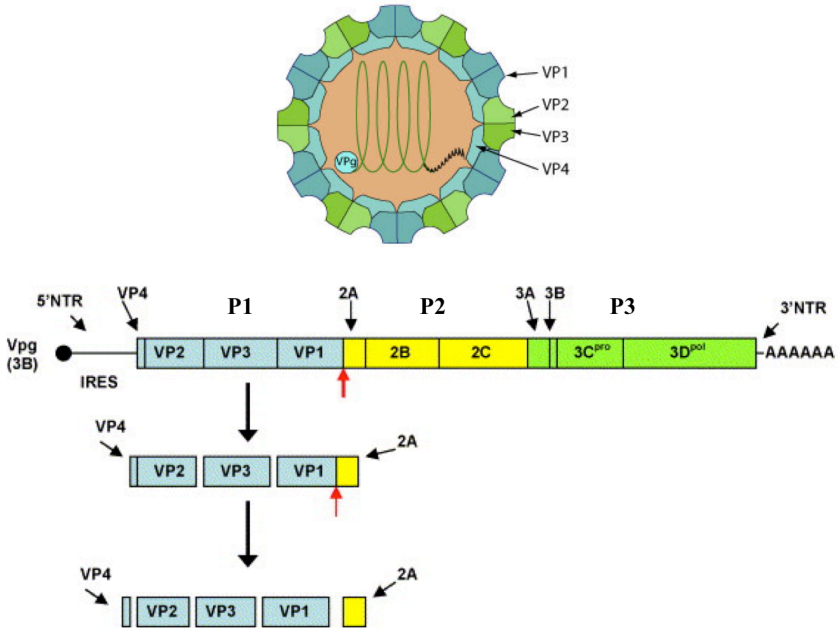


Figura 1.9: Representación esquemática de la estructura del virión de HAV y de su organización genómica. La flecha roja representa el primer punto de corte de la proliproteína P0 durante su procesado, dando lugar al complejo macromolecular replicativo 2B-3D y las proteínas estructurales de la cápside (Modificado de Cristina y col., 2007).

La mayoría de Picornavirus tienen cuatro polipéptidos en la cápside, incluida la proteína VP4 de pequeño tamaño localizada en el extremo amino terminal de la poliproteína. La poliproteína de HAV parece tener un polipéptido VP4 de un tamaño mucho menor que la mayoría de Picornavirus. Además, en el resto de virus de esta familia ocurre una miristilación en VP4 importante para la morfogénesis del virión (Tesar y col., 1993) que no ocurre en el caso de HAV. El motivo por el cual el ensamblaje de la cápside de HAV es diferente del resto de Picornavirus es desconocido, pero se cree que puede estar relacionado con la replicación intrahepática de este virus.

1.4.2.3. Estrategia replicativa y selección preferencial de codones

Un hecho a destacar sobre la estrategia replicativa del genoma de HAV es que el IRES de este virus es único entre los Picornavirus, constituyendo el modelo tipo III (Brown y col., 1994; Ehrenfeld y Teterina, 2002), el cual muestra una baja eficiencia en la dirección de la traducción (Whetter y col., 1994). La selección de un IRES poco eficiente es una cuestión evolutiva para la que aún no se ha encontrado respuesta. Una posible explicación sería la necesidad de realizar dualmente las funciones de traducción y replicación en regiones adyacentes del extremo 5´NCR (Ehrenfeld y Teterina, 2002). En otros Picornavirus la proteína 2A posee actividad proteolítica, estando implicada en la inhibición de la producción de proteínas celulares, de modo que la maquinaria traduccional de la célula es utilizada casi en su totalidad para la producción de proteínas virales (Leong y col., 2002). El hecho de que HAV deba competir de manera ineficaz por la maquinaria traduccional celular nos lleva a otro hecho destacable que diferencia HAV del resto de miembros de la familia *Picornaviridae*: el elevado uso preferencial de codones en comparación

con otros Picornavirus, adaptándose al uso de codones raros (Sánchez y col., 2003a), complementarios a los de las células humanas. Este uso poco óptimo de la selección preferencial de codones se interpreta como un mecanismo para evitar la competencia con los RNA transferentes (tRNA) de la célula, dado que HAV no puede inhibir la traducción de proteínas celulares (Sánchez y col., 2003b).

Todas estas características contribuyen a una replicación lenta del virus y a un bajo rendimiento. Sin embargo, HAV evolucionó hacia una selección de codones poco óptima. Este hecho probablemente resulta una estrategia adaptativa, que queda patente si se compara la infectividad especifica de HAV, que es de 1 unidad infectiva por cada 60 unidades físicas, con la de poliovirus en los que artificialmente se induce el uso de codones poco frecuentes, que es de 1 unidad infectiva por cada 10^3-10^4 unidades físicas (Domingo y col., 2005)

1.4.2.4. Taxonomía

HAV es el único miembro del género Hepatovirus, dentro de la familia *Picornaviridae* (Minor, 1991). Esta familia engloba nueve géneros*:* Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Apthovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobovirus, y Teschovirus.

HAV se consideró durante mucho tiempo como un miembro del género Enterovirus (serotipo 72) en base a sus propiedades físicas, las cuales son similares a otros enterovirus, además de ser transmitidos vía fecal-oral. A pesar de estas similitudes físicas y epidemiológicas con los enterovirus, la composición estructural de HAV, su estabilidad, su replicación en células hepáticas y la distancia genética con miembros de otros géneros dentro de la familia *Picornaviridae* indicaban que HAV era

único dentro de dicha familia por lo que se sugirió su clasificación en un nuevo género (Palmenberg, 1989).

La secuenciación nucleotídica completa de la cepa HM-175 permitió el desarrollo de cebadores para la realizar la comparación a nivel nucleotídico entre cepas de HAV, así como entre HAV y otros Picornavirus. Para el estudio de la diversidad genética de HAV se seleccionaron regiones parciales del genoma que demostraron tener alta variabilidad. Estas regiones nucleotídicas son el extremo C terminal de VP3, el extremo N terminal de VP1 y la región de unión VP1-P2A (Jansen y col., 1990; Robertson y col., 1991; Robertson y col., 1992) (Fig 1.10).

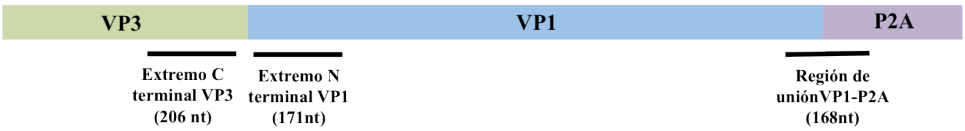


Figura 1.10: Diagrama esquemático del genoma de HAV en el que se muestran las tres regiones del genoma más variables secuenciadas para la caracterización genotípica de los diferentes aislados del virus (modificado de Costa-Mattioli y col., 2003).

Mediante el análisis de la región VP1-P2A, Robertson y col. (1992) realizaron el análisis genético de 152 cepas de HAV procedentes de diversos orígenes geográficos. Se establecieron 7 genotipos distintos para HAV (I-VII) (Fig 1.11). Se definió el genotipo como un grupo de virus con más del 85% de similitud en la secuencia nucleotídica (Robertson y col., 1992). Los virus de los genotipos I, II, III y VII fueron detectados en casos de hepatitis en humanos, mientras que los virus de los genotipos IV, V y VI fueron aislados en diversas especies de monos (Nainan y col., 1991; Tsarev y col., 1991). Los genotipos I y III se dividieron a su vez en

dos subgenotipos, definiendo el concepto de subgenotipo como virus cuya secuencia no difiere más de un 7,5% entre sí.

Este importante trabajo estableció las bases de las futuras investigaciones en este campo. Hoy en día, este tipo de estudios se siguen realizando mediante la secuenciación de la región VP1-P2A, aunque actualmente también se secuencia el extremo C terminal de VP3 y el extremo N terminal de VP1, como una única región VP3-VP1 de 186 pb.

A pesar de las diferencias existentes a nivel nucleotídico, los estudios de anticuerpos tras infecciones naturales o experimentales con HAV mostraron que no existen diferencias entre cepas (Lemon y Binn, 1983). El grado de conservación antigénico es tal, que hasta la fecha solamente se ha identificado un único serotipo entre todos los aislados de HAV analizados. Por este motivo, la infección con HAV parece conferir inmunidad ante posibles reinfecciones por este virus durante toda la vida del individuo.

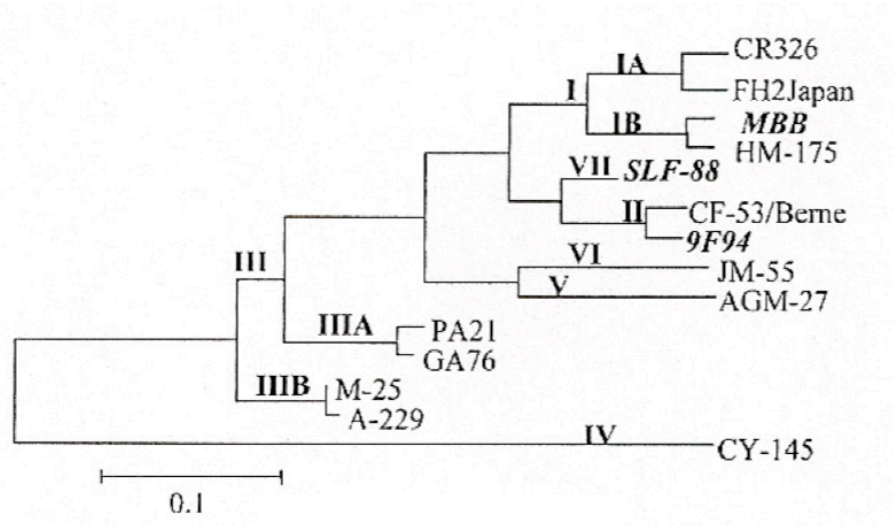


Figura 1.11: Análisis filogenético de HAV. El árbol filogenético está construido análizando la región VP1-P2A por el método de Neighbor-Joining. Se muestran los 7 genotipos y los subgenotipos establecidos para HAV (Robertson y col., 1992)

1.4.2.5. Infección en humanos

A. Vías de transmisión

HAV se transmite mediante la ruta fecal-oral, por el consumo de agua o alimentos contaminados con aguas residuales (Lees, 2000). La transmisión por contacto persona-persona es también muy común. El contacto con fómites contaminados, tales como papel higiénico, azulejos o guantes de látex, es también una forma de transmisión de la enfermedad, dado que HAV puede sobrevivir en ellos durante largos periodos de tiempo (Abad y col., 1994). En consecuencia, y dado que HAV es excretado en las heces en un elevado número de copias, la transmisión de HAV se ve facilitada por condiciones sanitarias deficientes. Los hombres homosexuales son un grupo de riesgo en la transmisión de este virus y numerosos brotes de HAV se han documentado en este colectivo durante los últimos años (Stene-Johansen y col., 2002, 2007; Tortajada y col., 2009). Ocasionalmente pueden darse casos de transmisión mediante ruta parenteral (Noble y col., 1984; Sheretz y col., 2005).

B. Características clínicas de la enfermedad

Tras la ingestión, los viriones alcanzan el hígado a través de la vena porta. Una vez en los hepatocitos, las partículas virales se replican, se ensamblan y son secretadas a la bilis. A través del conducto biliar, HAV alcanza el intestino y se excreta en las heces de los individuos afectados. El mecanismo exacto por el que el virus alcanza el torrente sanguíneo no es del todo conocido actualmente. Se cree que, al igual que ocurre con poliovirus, HAV puede alcanzar el torrente sanguíneo a través de las células M presentes en las placas de Peyer en el íleon distal (Ouzilou y col., 2002). Un posible segundo mecanismo es que las partículas virales recubiertas con IgA atraviesen las células del epitelio intestinal que contienen receptores apicales de inmunoglobulinas (Dotzauer y col.,

2005). El ciclo enterohepático del virus continua hasta que éste es neutralizado por los anticuerpos IgM anti-HAV, IgA anti-HAV e IgG anti-HAV (Martin y Lemon, 2006). La respuesta de las IgM anti-HAV dura un periodo corto de tiempo y suele utilizarse como un marcador de la fase aguda de la enfermedad. Las IgA anti-HAV también son inducidas durante poco tiempo, estando presentes en suero y heces. Por el contrario, las IgG anti-HAV suele durar toda la vida del individuo, confiriendo inmunidad ante posibles reinfecciones (Lemon y Binn, 1983; Hollinger y Emerson, 2007) (Figura 1.12).

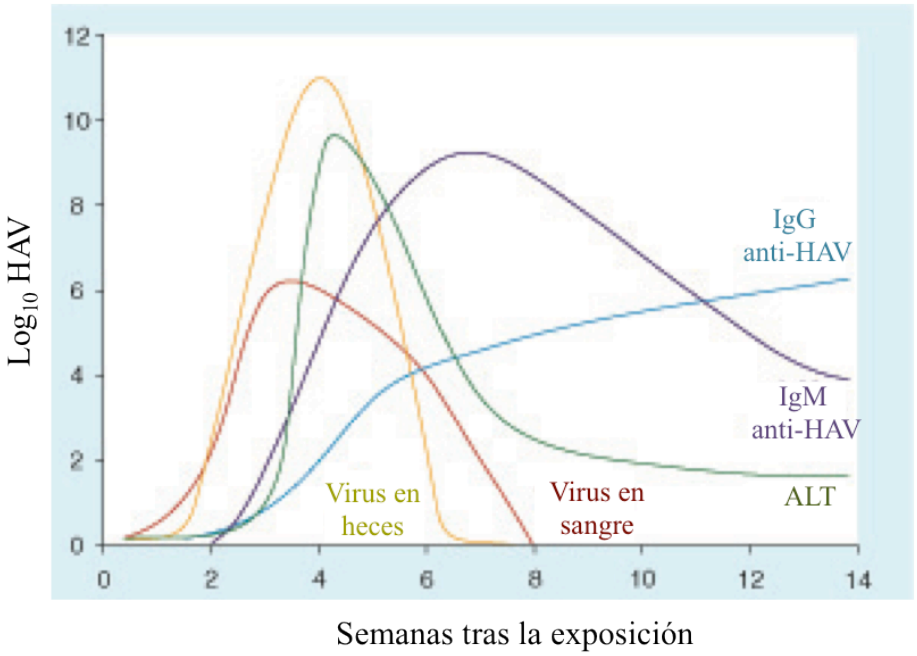


Figura 1.12: Evolución de los títulos virales y los signos clínicos durante la infección con HAV: respuesta inmunológica de IgM (violeta) y IgG (azul). Títulos de viremia en heces (amarillo) y en sangre (rojo). En verde se muestran los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) (Modificado de Pintó y col., 2012)

El espectro clínico de la infección de HAV varía desde asintomática a una hepatitis fulminante. Las manifestaciones clínicas de la hepatitis A dependen de la edad del paciente. En niños menores de 6 años, aproximadamente el 70% de las infecciones son asintomáticas. Por el contrario, la infección suele ser sintomática en el 70% de los adultos, provocando ictericia y un elevado número de aminotransferasas en suero (Cuthbert, 2001).

Tras un periodo de incubación de 7 a 10 semanas se desarrollan los signos y síntomas típicos, incluyendo fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal, orina oscura e ictericia. Menos frecuentemente se puede producir mialgia, prurito, diarrea, artralgia y erupciones cutáneas. No existen evidencias de enfermedad crónica del hígado o infección persistente tras una hepatitis A aguda. Sin embargo, algunos pacientes muestran una enfermedad más prolongada o reincidente que puede durar 6 meses, durante los cuales el virus sería excretado en las heces. Las pruebas de laboratorio muestran niveles altos en suero de bilirrubina total (7 mg/dl), fosfatasa alcalina (319 IU/l), aspartato aminotransferasa (1,754 IU/l) y alanina aminotransferasa (1,952 IU/l) en pacientes de hepatitis A hasta 2 meses después del comienzo de la enfermedad (Tong y col., 1995).

En ocasiones pueden producirse manifestaciones clínicas atípicas como la colestasis prolongada, daño hepático agudo o casos raros de hepatitis autoinmune. Otras complicaciones pueden ser la anemia aplásica, eritroblastemia y pancreatitis aguda, entre otras. La hepatitis fulminante es una complicación poco frecuente de la hepatitis A, con una incidencia del 0,015-0,5% de los casos, que se da sobre todo en adultos en los que el fallo hepático se debe más probablemente a una enfermedad crónica subyacente del hígado (Rezende y col., 2003).

C. Epidemiología

Se estima que cada año decenas de millones de personas son infectadas por HAV (Wasley y col., 2006). La tasa de incidencia de HAV está fuertemente relacionada con indicadores socioeconómicos y con el acceso a agua potable. A mayores ingresos y acceso a agua limpia, la incidencia de HAV decrece (Jacobsen y col. 2004, 2005). El nivel de endemicidad en una población viene definido por la proporción de individuos de cada grupo de edad que ha adquirido inmunidad a hepatitis, bien sea por infección o por inmunización y que, por tanto, muestran anticuerpos IgG anti-HAV en suero (OMS, 2000).

La carga de la infección por HAV en una comunidad está también relacionada con la edad promedio de infección. En países altamente endémicos, casi todos los niños resultan infectados a edades tempranas, cuando la infección suele resultar asintomática. En países con una endemicidad muy baja pocos individuos resultan infectados durante la infancia, por lo que la mayoría de los niños y de los adultos resultan susceptibles a la infección por HAV. Es decir, a medida que la incidencia decrece, la edad promedio de infección aumenta y por tanto aumenta también el riesgo de desarrollar una infección sintomática (Jacobsen y col., 2010).

Actualmente, la mayor seroprevalencia de HAV se encuentra en la región sub-sahariana de África e India. En América central y América del sur la tasa de incidencia es intermedia, al igual que en el norte de África y Oriente Medio. En Europa, la tasa de seroprevalencia aumenta de oeste a este. En Asia central y en el sudeste asiático la incidencia es intermedia, mientras que en Norteamérica y Australia es muy baja (Figura 1.14).

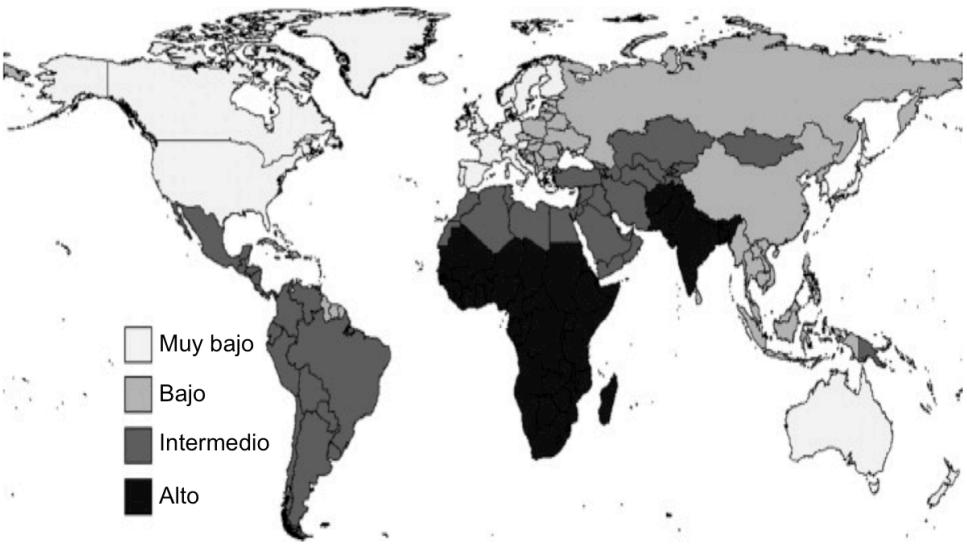


Figura 1.13: Prevalencia estimada de HAV a nivel mundial en el año 2005 (Jacobsen y col., 2010)

1.4.2.6. Hepatitis A y consumo de moluscos bivalvos

La hepatitis A es la infección viral más grave asociada al consumo de marisco, ya que puede ocasionar incluso la muerte de los afectados. El primer caso documentado de un brote de hepatitis asociado al consumo de bivalvos data de 1955 cuando 629 personas se vieron afectadas tras la ingestión de ostras crudas en Suecia (Roos, 1956). Desde esa fecha, se han relacionado muchos casos de infecciones por HAV con el consumo de moluscos bivalvos en todo el mundo (Richards, 1985; Jaykus y col., 1994; Rippey, 1994). De forma ocasional, los brotes adquieren una escala epidémica, siendo la ilustración más gráfica el brote de hepatitis A ocurrido en Shanghai (China) en 1988, donde alrededor de 300.000 casos pudieron relacionarse con el consumo de almejas obtenidas de un área contaminada con aguas residuales (Halliday y col., 1991; Tang y col.,

1991). Este es el mayor brote de enfermedad asociado a alimentos ocurrido hasta la fecha. En EEUU también se han descrito varios casos de brotes de hepatitis A asociados al consumo de bivalvos (Richards, 1985; Rippey, 1994). Así, entre 1961 y 1964 se registraron más de 1000 casos de hepatitis A relacionados con el consumo de ostras o almejas en diferentes estados americanos (Richards, 1985). En los años siguientes se produjeron numerosos brotes de la enfermedad asociados al consumo de moluscos. En 1973, tuvo lugar uno asociado a una partida de ostras de Louisiana (Glass y col., 1996). En 1988, ocurrió otro en Florida (Desenclos y col., 1991) y en 1996 tuvieron lugar dos brotes en Lousiana, todos ellos por consumo de ostras contaminadas (Berg y col., 2000). Más recientemente, en el año 2005, tuvo lugar otro causado por ostras contaminadas en Mississippi (Shieh y col., 2007). El brote de Louisiana se atribuyó a una contaminación por aguas residuales de las áreas de producción de bivalvos por una crecida del río Mississippi, mientras que en el caso del brote de Florida (que afectó a varios estados), las ostras provenían de recolecciones ilegales de áreas prohibidas. En el caso de Louisiana, las ostras cumplían todos los requisitos sanitarios de las autoridades americanas y se sospecha, por evidencias indirectas, que las ostras retuvieron el virus durante al menos 6 semanas tras la contaminación (Desenclos y col., 1991).

También existen descripciones de brotes de hepatitis A en Japón (Fujiyama y col., 1985), Australia (Conaty y col., 2000) y en diferentes países europeos como Gran Bretaña (Bostock y col., 1979) Italia (Mele y col., 1986; Malfait y col., 1996), Francia (Apairemarchais y col., 1995), España (Bosch y col., 2001; Pintó y col., 2009) y, en el caso de Shanghai, por aislamiento en primates (Li y col., 1992). La relación de estos brotes con el consumo de moluscos se realizó por datos epidemiológicos, aunque

en el caso de Florida el virus pudo detectarse en las áreas de recogida de las ostras por técnicas moleculares (Desenclos y col., 1991).

A pesar de los casos mencionados, los brotes de hepatitis A son menos frecuentes que los brotes de gastroenteritis, aunque hay que destacar el elevado número de individuos afectados. El largo periodo de incubación de la hepatitis A (4 semanas por término medio) hace muy difícil demostrar la implicación de un alimento concreto en la aparición de casos individuales o esporádicos. En la mayoría de los casos, el alimento no está disponible para su evaluación y el historial de consumo no es concluyente. Así, de modo general, los brotes de hepatitis A se clasifican en dos categorías: i) los grandes brotes en los que existe un vehículo de infección común y evidente, y ii) las infecciones esporádicas donde el alimento que actúa como vector sólo puede evidenciarse con una investigación epidemiológica seria y diligente. Esta investigación epidemiológica es más la excepción que la regla, por lo que la asociación de moluscos bivalvos con casos esporádicos de hepatitis A está probablemente subestimada (Rippey, 1994).

A pesar de que actualmente las infecciones con el virus de la hepatitis A asociadas al consumo de bivalvos pueden ser poco frecuentes en algunos países desarrollados, la vigilancia continua es importante. En los últimos años se han producido en España varios brotes de la enfermedad. En los años 1999 y 2008 se produjeron dos brotes asociados al consumo de coquinas procedentes de Perú. El primero de ellos duró tres meses y afectó a 189 personas y el segundo duró 7 meses y afectó a 100 personas (Bosch y col., 2001; Pintó y col., 2009).

Estudios realizados por Romalde y col. (2001) y Polo y col. (2010) demostraron que las importaciones de moluscos, aunque cumplan los estándares sanitarios bacterianos exigidos por la legislación actual, pueden

actuar como un vehículo importante de reintroducción del virus de la hepatitis A en áreas no endémicas, especialmente si dichas importaciones proceden de países en desarrollo endémicos para la hepatitis A.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

NoV y HAV son los virus entéricos más importantes en términos epidemiológicos y en cuanto a gravedad de la enfermedad, respectivamente. Es frecuente que se detecten brotes de gastroenteritis causada por NoV y brotes de hepatitis A asociados al consumo de moluscos bivalvos que cumplen con los estándares legales para su comercialización. NoV es el principal agente etiológico causante de brotes de gastroenteritis en todo el mundo, sin embargo, la falta de diagnóstico rutinario hace que su incidencia como causa de casos esporádicos de gastroenteritis se encuentre infraestimada. El genogrupo GII, y dentro de este, las cepas pertenecientes al genotipo GII.4, son las más frecuentemente asociadas a brotes de la enfermedad a nivel mundial. La elevada incidencia de NoV parece estar relacionada con la aparición secuencial y la rápida expansión de nuevas variantes que evolucionan por deriva génica del gen de la cápside o por eventos de recombinación, no obstante, es poco lo que se conoce actualmente sobre a tasa evolutiva y la dinámica poblacional de NoV.

Con estas premisas, los objetivos que nos planteamos en este trabajo son:

1. Evaluar la correlación existente entre el número de muestras de moluscos positivas para NoV y HAV procedentes de distintas zonas de la Ría do Burgo y la actual clasificación de las áreas de crecimientos de moluscos.

2. Evaluar el papel de NoV como agente etiológico de casos esporádicos de gastroenteritis en el área sanitaria de A Coruña.

3. Determinar la epidemiología molecular de NoV en área geográfica de estudio.

4. Determinar la tasa evolutiva y la dinámica poblacional de diferentes genotipos de NoV mediante la aproximación de colaescencia bayesiana, así como inferir el tiempo transcurrido hasta el ancestro común más reciente de las cepas detectadas en Galicia.

5. Establecer la posible relación epidemiológica existente entre los casos de hepatitis A y gastroenteritis causada por NoV y el consumo de moluscos bivalvos mediante el análisis filogenético de las cepas detectadas en ambos tipos de muestras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Toma de muestras

3.1.1. Moluscos bivalvos procedentes de la ría de Vigo

Como parte de un proyecto anterior (Vilariño, 2009), se realizaron muestreos mensuales de moluscos bivalvos procedentes de la ría de Vigo entre marzo de 2004 y diciembre de 2006 (Figura 3.1).



Figura 3.1: Ría de Vigo. En amarillo se muestran los puntos de muestreo clasificados como zona B. En rojo, los clasificados como C.

Cada muestreo incluyó 3 muestras de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), 1 de almeja (*Venerupis decussata*) y 1 de berberecho (*Cerastoderma edule*). Dos de las muestras de mejillón provenían de puntos de muestreo correspondientes a zonas de cultivo en bateas,

clasificados como zona B (230-4600 *E.coli*/100 g molusco). La tercera muestra de mejillón, así como la de almeja y la de berberecho, provenían de puntos de muestreo situados en una zona de costa clasificada como C (>4600 *E.coli*/100 g molusco). En total se recogieron y analizaron 160 muestras, de las cuales 99 fueron de mejillón (68 muestras de cultivo y 31 muestras salvajes), 30 fueron de almeja y 31 de berberecho.

3.1.2. Moluscos bivalvos procedentes de la ría do Burgo

Se realizaron muestreos mensuales de mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) precedentes de la ría do Burgo durante el periodo comprendido entre octubre de 2010 y marzo de 2012. Cada muestreo incluyó muestras de mejillón procedentes de distintos puntos de recolección, todos ellos situados en la costa. Cinco de estos puntos están clasificados como zona B y dos como zona C (Figura 3.2).

En total se analizaron 81 muestras de mejillón, de las cuales 53 pertenecían a zona B y 28 a zona C. En la Tabla 3.1 se indica el número total de muestras recogidas en cada punto de muestreo. Los moluscos se transportaron a una temperatura de 4ºC, llegando al laboratorio el mismo día de la recolección.

3.1.3. Muestras clínicas

Las muestras de heces analizadas en este trabajo proceden del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña (CHUAC), donde se presta servicio a aproximadamente 550000 personas en un área de 2750 Km^2 (Figura 3.3). En total se analizaron 2643 muestras de pacientes de todas las edades afectados de gastroenteritis durante un periodo de un año (Julio 2010-Junio 2011). Aproximadamente el 90% de las muestras pertenecían a pacientes externos y el 10% a pacientes internos del hospital.

En la Tabla 3.2 se resume el número de muestras pertenecientes a cada grupo de edad establecido.

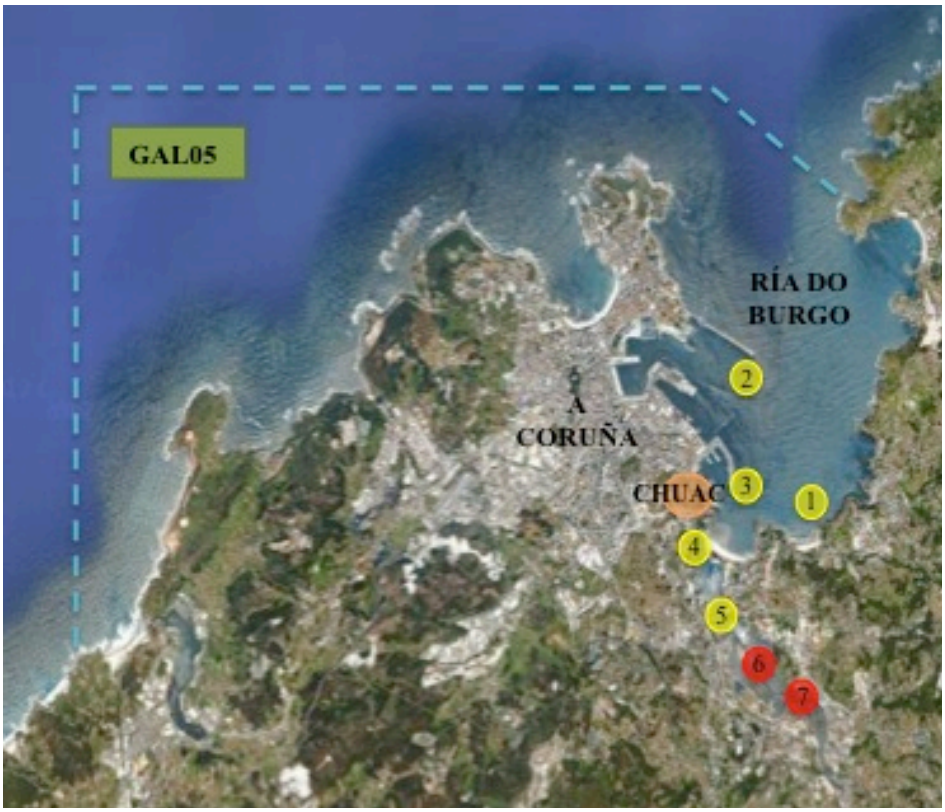


Figura 3.2: Ría do Burgo. En amarillo se muestran los puntos de muestreo clasificados como zona B. En rojo, los clasificados como C. Se muestra también la localización del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

Tabla 3.1: Número total de muestras recogidas en cada punto de muestreo de la ría do Burgo**.**

PUNTO	ZONA	COORDENADAS	LOCALIDAD	Nº MUESTRAS
1	B	43 20 38.8N/ 8 21 31.59E	Perillo, Areal Bastiagueiro	8
2	B	43 22 2.20N/ 8 23 20.27E	O Parrote	1
3	B	43 20 42.59N/ 8 22 51.76E	Punta de Oza, Valiña	14
4	B	43 20 25.31 N/ 8 23 20.99	As Xubias, Parque Abella	17
5	B	43 20 4.9N/ 8 22 52.9W	Pasaxe, Conxeladora	13
6	C	43 19 54.5N/ 8 22 40.28	Pasaxe, Banco do Carniceiro	16
7	C	43 19 47.80N/ 8 22 20.70E	Perillo, Pedra do Chino	12

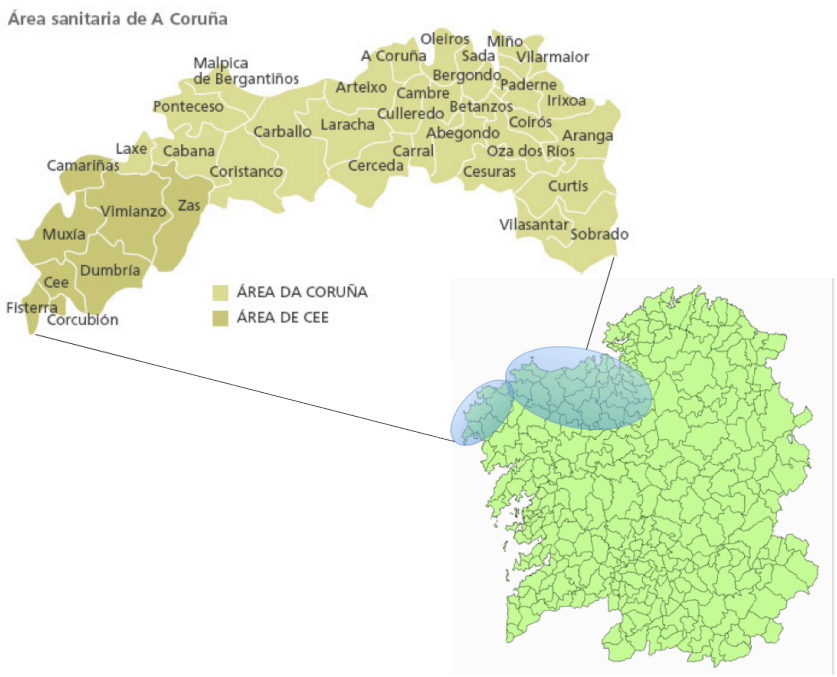


Figura 3.3: Área sanitaria de A Coruña.

Tabla 3.2: Número de muestras de heces analizadas por cada grupo de edad establecido.

GRUPOS DE EDAD	NÚMERO DE MUESTRAS
0-2 años	895
3-5 años	198
6-12 años	243
13-18 años	70
19-59 años	637
> 60 años	593
desconocida	7
TOTAL	2.643

De manera rutinaria, y siguiendo procedimientos estándar de microbiología clínica (Murray y col., 2007), cada muestra fue analizada en el hospital para determinar la presencia de diversas bacterias: *Salmonella* spp*., Shigell*a spp., *Campylobacter* spp., *Arcobacter* spp., *Yersinia enterocolitica, Escherichia coli* 0157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas* spp. En el caso de pacientes inmunodeprimidos (8 casos), se llevó a cabo la detección de *Cryptosporidium* spp.

En 125 muestras procedentes de pacientes menores de dos años, la Unidad Pediátrica solicitó el análisis de RV y AdV. RV es el principal patógeno no-bacteriano causante de casos de gastroenteritis severa en niños en todo el mundo (Parashar y col., 2003a; Santos y Hoshino, 2005). Los Adenovirus son también una causa frecuente de gastroenteritis pediátrica (Roman y col., 2003), causando una enfermedad menos severa que RV aunque más prolongada. La detección de ambos virus se llevó a cabo utilizando el kit comercial CerTest (CerTest Biotech, España), basado en un ensayo inmunocromatográfico cualitativo.

Tras los análisis llevados a cabo en el hospital de manera rutinaria en casos de gastroenteritis, las muestras eran conservadas a 4ºC y enviadas semanalmente al laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

3.2. Procesamiento de las muestras y extracción del RNA

3.2.1. Muestras de moluscos bivalvos

De cada muestra recibida en el laboratorio se tomaron 10 mejillones o 20 almejas o berberechos. Tras limpiar los moluscos con agua potable se procedió a la apertura y disección de los individuos. Los hepatopáncreas se

diseccionaron en condiciones de esterilidad y se homogenizaron con agua de peptona 0,1% (pH7,2) (1:1 p/v) utilizando un *blender* a velocidad máxima durante tres series de 60 s cada una. El homogenado se dejó en agitación fuerte durante una hora a 4ºC y se centrifugó a 1000 xg durante 5 min. Posteriormente se recogió el sobrenadante, a partir del cual se realizó la extracción del RNA.

3.2.2. Muestras clínicas

Una vez en el laboratorio, las muestras de heces se procesaron para la posterior extracción de RNA. Cada muestra se diluyó en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) estéril suplementado con 2M de $NaNO_3$, 1% de BSA y 0,1% de Triton X-100 (1:10 v/v). La suspensión se sometió a agitación fuerte durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 1000 xg durante 5 min para recuperar el sobrenadante.

3.2.3. Extracción del RNA

En el caso de las muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo, la extracción del RNA se llevó a cabo empleando el kit *Total Quick RNA Cells and Tissues mini preparations* (Talent, Italy). El RNA se extrajo a partir de 100 µl de homogenado siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de las muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo y de las muestras clínicas se utilizó el kit *NucleoSpin RNA Virus* (Macherey-Nagel, Alemania). Este kit permite realizar la extracción a partir de 150 µl de homogenado de molusco o de suspensión de muestras clínicas. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ambos kits se basan en la unión selectiva de RNA de más de 200 bases a una membrana de sílice. La cápside de los virus presentes en las muestras se lisa mediante la adición de un tampón con una alta

concentración de isotiocianato de guanidina (GITC, del inglés *guanidin isothiocyanate*), un compuesto químico que desnaturaliza proteínas. Tras la lisis se añade etanol a la muestra que, junto con las sales presentes en el tampón, proporciona las condiciones apropiadas para la unión del RNA a la membrana de sílice de la columna. Para eliminar restos de sales, metabolitos y compuestos celulares macromoleculares se realizan sucesivos pasos de lavado con tampones que contienen etanol. Por último, para la recuperación del RNA se realizó un último lavado con agua o con un tampón con bajo contenido en sales.

3.3. Detección y cuantificación de Norovirus y virus de la hepatitis A

3.3.1. Detección viral

La detección del virus HAV y NoV GI y GII se llevó a cabo mediante la técnica de RT-qPCR con sonda TaqMan. En el caso de HAV, se realizó la amplificación de un fragmento del extremo 5' no codificante del genoma (Costafreda y col., 2006). Esta región es, debido a su importante función tanto en la traducción como en la replicación viral, la más conservada del genoma de HAV y otros Picornavirus. En el caso de NoV, se amplificó el dominio N-terminal de la cápside, en la región de unión del ORF1 y ORF2 (da Silva y col., 2007). Los cebadores y las sondas utilizadas se muestran en la Tabla 3.3.

Para la detección de ambos virus, la reacción se llevó a cabo en un solo paso utilizando el kit comercial *Platinum quantitative RT-PCR Thermoscript One-step System* (Invitrogen, Francia). Cada RNA se evaluó de forma directa y en una dilución 1/10, para evitar el efecto de la posible presencia de inhibidores de la RT-qPCR que pudiese contener la muestra.

La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, utilizando una concentración final 1X de tampón *Thermoscript reaction buffer* (Invitrogen, Francia), 0,9 µM del cebador reverso, 0,5 µM del cebador directo, 0,45 µM de la sonda, 10 U de inhibidor de ribonucleasas (*Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor*, Promega), 0,5 µl de la mezcla de enzimas *Thermoscript Plus/Platinum Taq enzyme mix* y 5 µl de RNA (o su dilución 1/10). Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un termociclador Mx3000P QPCR System (Stratagene, Alemania). El programa de RT-qPCR fue el mismo en ambos casos y consistió en un paso de retrotranscripción de 55ºC durante 1 h, seguido de un paso de desnaturalización de 95ºC durante 5 min. A continuación se realizaron 45 ciclos de 95ºC 15 s, 60ºC 1 min y 65ºC 1 min.

Se define como línea de *threshold* al nivel de detección en el cual la reacción de PCR alcanza una intensidad de fluorescencia superior a la fluorescencia de fondo. El Ciclo-*threshold* (Ct) se define como el ciclo en el cual las muestras alcanzan ese valor (da Silva y col., 2007; Le Guyader y col., 2008). Las muestras que mostraron un valor de Ct igual o inferior a 41, sin evidencias de amplificación en los controles negativos (sin superar el *threshold* después de los 45 ciclos de amplificación) se consideraron positivas.

3.3.2. Cuantificación viral

La cuantificación del número de copias de RNA de HAV y de ambos genogrupos de NoV presentes en las muestras positivas se estimó mediante la utilización de rectas estándar realizadas para cada virus. En el caso de HAV la recta estándar se construyó a partir del RNA extraído del virus puro (Costafreda y col., 2006) y en el caso de NoV, a partir de transcriptos de RNA (da Silva y col., 2007; Le Guyader y col., 2008).

Tabla 3. 3: Cebadores y sondas utilizados para la detección de NoV y HAV

VIRUS	DIANA	CEBADOR	SONDA	POLARIDAD	SECUENCIA 5-3'	POSICICIÓN	TAMAÑO AMPLÍMERO
HAV	5'NCR	HAV68		+	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68-85[a]	173 pb
	5'NCR	HAV240		-	GGAGAGCCCTGGAAGAAAGC	241-222[a]	
	5'NCR		HAV150	-	6-FAM-CCTGAACCTGCAGGAATTAA-MGB[1]	169-150[a]	
NoV GI	dominio N/S *	QNIF4		+	CGCTGGATGCGNTTCCAT	5299-5316[b]	77 pb
	dominio N/S *	NV1LCR		-	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	5376-5354[b]	
	dominio N/S *		NV1Lpr	+	6-FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-6-TAMRA[2]	5321–5340[b]	
NoV GII	dominio N/S *	QNIF2d		+	ATGTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	5012–5037[c]	88 pb
	dominio N/S *	COG2R		-	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5100-5080[c]	
	dominio N/S *		QNIFS	+	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA[2]	5042–5061[c]	

[1]Sonda marcada con 6-carboxifluoresceína en el extremo 5'. En el extremo 3' se encuentra el *quencher minor-groove binder*
[2]Sonda marcada con 6-carboxifluoresceína en el extremo 5'. En el extremo 3' se encuentra el *quencher* carboxitetrametilrodamina
*Dominio N/S (extremo N-terminal de la cápside)
[a]Posición nucleotídica del primer en la secuencia de la cepa HM-175 (M14707)
[b]posición nucleotídica del primer en la secuencia del virus Norwalk (M87661)
[c]posición nucleotídica del primer en la secuencia del virus Lorsdale (X86557)

Para la construcción de la recta estándar de HAV se utilizó un stock viral de la cepa HAV-175. La preparación de dicho stock se explica en el apartado 3.3.3.3. Se realizaron diluciones seriadas del stock viral de la cepa HAV HM-175 en agua bidestilada libre de RNasas, de las cuales se extrajo el RNA mediante un choque térmico de 99ºC durante 5 min. La recta estándar se generó mediante RT-qPCR usando desde 3 hasta $3x10^5$ copias del RNA extraído. La concentración de estas partículas se calculó mediante ensayos de infectividad, determinando la dosis infectiva 50% en cultivo celular ($TCID_{50}$, del inglés 50% *tissue culture infective dose*) aplicando un factor x60 al título infectivo para obtener el número real de partículas físicas (Jansen y col., 1988; Deng y col., 1994; Costafreda y col., 2006). El número de copias de genoma presentes en cada una de las muestras positivas se estimó mediante interpolación de los valores de Ct obtenidos en la recta estándar, expresándose los resultados como el número de copias de RNA por gramo de tejido digestivo analizado.

La recta estándar de NoV GI se realizó mediante clonación de las ORF 1 y 2, que se corresponden con la secuencia nucleotídica desde la posicion 146 hasta la 6.935 del virus de Norwalk (Genbank, M87661) (la cepa tipo de NoV GI.1) en el vector pCRII TOPO (Invitrogen, Francia). Para la realización de la recta para la cuantificación de NoV GII, se clonó del mismo modo la secuencia correspondiente al fragmento delimitado por las posiciones 4.191 y 5.863 de la cepa tipo Houston (GII.4) (Genbank, EU310927) (da Silva y col., 2007). Ambos vectores se usaron para transformar *E. coli* y se seleccionaron, mediante α-complementación, aquellos clones que habían incorporado el plásmido con el inserto. Los plásmidos se extrajeron y linearizaron para llevar a cabo una transcripción *in vitro* mediante el kit comercial *Promega riboprobe system* (Promega, EEUU). Tras un tratamiento con DNAsas, el RNA se purificó y cuantificó

mediante densidad óptica a 260 nm ($OD_{260,}$ del inglés *optical density*) (El Senousi y col., 2007). Se generaron las rectas estándar usando desde 5,3 hasta $5{,}3x10^5$ copias y desde 7,5 hasta $7{,}5x10^5$ copias de los transcriptos para NoV GI y GII, respectivamente. Al igual que con HAV, se estimaron las copias de genoma presentes en cada una de las muestras que resultaron positivas para alguno de los genogrupos de NoV mediante interpolación de los valores de Ct determinados en cada una de las rectas estándar.

3.3.3. Controles utilizados en la RT-qPCR

Para prevenir resultados falsos positivos o falsos negativos se tomaron determinadas precauciones en el trabajo de laboratorio, tales como la separación en distintas salas de los procesos de detección viral y la utilización de puntas con filtro en todos los pasos del proceso. Se realizó también un control negativo, en el que no se incluyó ácido nucleico, y un control positivo, que consistió en RNA específico de cada uno de los distintos tipos virales (10^3 copias de genoma viral en el caso de HAV y 200 copias del transcripto de RNA de GI o GII). Además, se utilizaron controles para evaluar la eficiencia en los procesos de extracción y RT-qPCR.

3.3.3.1. Eficiencia de extracción

La eficiencia del proceso de extracción se evaluó mediante la adición de una cantidad conocida de virus Mengo a cada una de las muestras antes de realizar la extracción del RNA para la detección de HAV y NoV mediante RT-qPCR.

El virus Mengo es un patógeno natural de ratones que pertenece al género Cardiovirus, dentro de la familia *Picornaviridae*. Su genoma consiste en una cadena de RNA de sentido positivo de aproximadamente

unas 8 kb (Hato y col., 2007). El virión consiste en 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) rodeando al genoma (Kobasa y col., 1995). El potencial patogénico de este virus viene determinado por una cola de poli(C) en la región 5´ no codificante de su genoma, de tal modo que la delección de esta parte conlleva la pérdida del potencial patogénico del virus (Duke y col., 1990; Altmeyer y col., 1995).

El virus Mengo utilizado en este estudio (donado por el Dr. Albert Bosch, Universidad de Barcelona) se obtuvo tras la transfección del clon de DNA complementario llamado pMC_0 en células HeLa (cáncer cérvico–uterino humano) (Martin y col. 1996). Este clon carece de la cola de poli(C) originando una cepa viral mutante denominada vMC_0. Las propiedades de crecimiento de la cepa vMC_0 con respecto a las cepas salvajes se mantienen idénticas, pero presenta un fenotipo avirulento (Martin y col., 1996). El stock viral de vMC_0 se obtuvo también empleando células HeLa, como se explica en el apartado 3.3.3.3. Este clon constituye un buen candidato para el control del proceso de extracción del ácido nucleico de virus entéricos (Costafreda y col., 2006), debido a que el virus Mengo pertenece a la familia *Picornaviridae*, por lo que comparte características estructurales y genómicas con otros virus pertenecientes a la misma familia, como el virus de la hepatitis A. Costafreda y col. (2006) desarrollaron un protocolo de amplificación específico para este virus mediante la técnica de RT-qPCR con sondas TaqMan usando como diana de amplificación la región 5' no codificante del RNA genómico. Esta región que, como ya se ha mencionado, también se utiliza en la amplificación de HAV, se encuentra muy conservada en todos los Picornavirus y en otros virus entéricos (como NoV) debido a su importante función tanto en la traducción como en la replicación viral. Teniendo en cuenta que la amplificación del extremo 5' no codificante del virus Mengo

tras el proceso de extracción se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones de RT-qPCR y el mismo programa de amplificación que en el caso de HAV y NoV, la cuantificación del virus permite evaluar la eficiencia de extracción.

La eficiencia de extracción se evaluó en todas las muestras, tanto en el RNA extraído como en la dilución 1/10 del mismo, mediante la amplificación en todas ellas del virus Mengo, así como la amplificación de un control positivo que consistió en 5 µl del stock viral tras un choque térmico de 99ºC durante 5 min. La comparación del valor del Ct obtenido a partir de la amplificación del control positivo de virus Mengo con el valor Ct que se obtuvo para la amplificación de este virus en cada muestra permite evaluar la eficiencia de extracción. Los valores conseguidos se clasifican dentro de tres categorías: pobre (si la eficiencia de extracción es menor al 1%), aceptable (si presenta valores entre el 1 y el 10%) o buena (si este porcentaje es superior al 10%) (da Silva y col., 2007).

3.3.3.2. Eficiencia de la RT-qPCR

Como se ha mencionado anteriormente, la eficiencia de la RT-qPCR puede verse afectada por la presencia de inhibidores en la muestra analizada. Aunque se realizó la amplificación del RNA obtenido de cada muestra y de su dilución 1/10 con el fin de disminuir la cantidad de posibles inhibidores, se evaluó la eficiencia de la RT-qPCR mediante la utilización de controles de amplificación. Estos controles consistían en una réplica de la amplificación de cada muestra en la que se utilizaron 2,5 µl de RNA o de su correspondiente dilución junto con 2,5 µl del RNA viral. En el caso de NoV se añadieron 10^6 copias del transcripto de RNA de GI o GII (Le Guyader y col., 2008) y en el caso de HAV, 10^7 copias de genoma viral. Se utilizan títulos tan elevados para evitar la competencia entre el

RNA viral añadido como control y el existente en posibles muestras positivas. Se realizó también la amplificación de 2,5 µl del RNA viral con 2,5 µl de agua bidestilada libre de RNAsas. La comparación del valor de Ct de cada réplica de la amplificación se compara con el valor del Ct del RNA viral mezclado sólo con agua, clasificándose después en las mismas tres categorías en las que se había dividido también la eficiencia de extracción (pobre, aceptable o buena) (da Silva y col., 2007).

3.3.3.3. Stocks y títulos virales

Para realizar el stock del virus de HAV se utilizó el clon 18f de la cepa HM-175 (Lemon y col., 1991), que se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés *American Type Cell Cultures*). Este clon está adaptado a cultivo celular, provocando efecto citopático en células FRhK-4 (línea celular derivada de hígado fetal de mono *Rhesus*, del inglés *fetal Rhesus monkey cells*) (Cromeans y col., 1987) tras su infección. El clon del virus Mengo vMC_0 se cultivó en células HeLa, en las que también se observa efecto citopático tras la infección (Martin y col. 1996). Las células FRhK-4 y HeLa se cultivaron hasta su confluencia en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEN, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L–Glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomicina). Para la obtención del stock viral las células se infectaron con el virus del cual se pretende conseguir el stock. Tras observar las placas de lisis producidas en las células por la infección del virus, las células infectadas se lisaron mediante congelación-descongelación y los restos celulares se eliminaron mediante una centrifugación de 5 min a 1000 xg.

Los stocks virales de HAV y de virus Mengo se titularon mediante ensayos en placa de 96 pocillos. Una vez que las células FRhK-4 o HeLa crecieron de manera confluente en las placas, se vació el medio y se lavaron los pocillos con PBS. Posteriormente se realizaron diluciones decimales del virus que se quiere titular (hasta la dilución -7) en PBS o en el medio de mantenimiento (el mismo medio que se usa para el crecimiento de las células pero suplementado con 2% de SFB). En cada una de las columnas de la placa (8 pocillos) se inocularon 20 µl de cada una de las diluciones del virus, así como del virus sin diluir. Las dos primeras columnas y las dos últimas se utilizaron como controles negativos, en las que se inocularon 20 µl de PBS en cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 1h a 37ºC, con agitación lenta para favorecer la adsorción viral. Tras la incubación se añadió a cada pocillo medio de mantenimiento precalentado a 37ºC. Tras el periodo mínimo de infección de cada virus se realizó la titulación viral mediante el cálculo de la $TCID_{50}$. Para ello, se observó el CPE de las distintas diluciones del virus sobre las células. Se consideraron como pocillos positivos aquellos en los que se observa CPE y negativos los pocillos control y aquellos en los que no se observó ningún efecto. A continuación, se calculó el número de pocillos positivos de cada columna o dilución con respecto al número total de pocillos de cada columna. Se determinó el número de positivos acumulados de cada columna o dilución empezando en la menos concentrada o valor A. Se calculó del mismo modo el número de negativos acumulados, o valor B. Posteriormente se realizó el cálculo A/A+B, que multiplicado por cien proporciona el porcentaje de positividad. Se establece entre qué dos valores se encuentra el 50% de positividad y se realiza el cálculo de la distancia mediante la fórmula:

$$Distancia = \frac{valor\ por\ encima\ del\ 50\%\ de\ positividad - 50}{valor\ por\ encima\ del\ 50\%\ de\ positividad - valor\ por\ debajo\ del\ 50\%\ de\ positividad}$$

La $TCID_{50}$ se calculó mediante la fórmula:

$$TCID_{50} = \frac{10^{dilución\ por\ encima\ del\ 50\% + distancia}}{Volumen\ que\ se\ inoculó\ por\ pocillo\ (ml)}$$

3.4. Análisis estadístico

La correlación existente entre el número de muestras positivas y negativas para HAV y la clasificación de las zonas de crecimiento de moluscos en zonas B y C se determinó mediante tablas de contingencia dos a dos, empleando el estadístico Chi-cuadrado (χ^2) (software Chidos para Windows) (Rossi, 2002). Se empleó un nivel de significancia (α) de 0,05 y un grado de libertad. Del mismo modo, se determinó la correlación entre la detección de NoV y la clasificación de las zonas de crecimiento de moluscos.

3.5. Análisis filogenético de las cepas de Norovirus y virus de la Hepatitis A detectadas en muestras clínicas y de moluscos

3.5.1 Genotipado de las cepas de Norovirus

El genotipado de las cepas de NoV detectadas mediante RT-qPCR se llevó a cabo mediante la secuenciación del dominio N-terminal de la cápside (*N-terminal/Shell domains*), en la región de unión del ORF1 y ORF2 (Figura 3.4). La amplificación de esta región se llevó a cabo mediante *seminested* RT-PCR, utilizando cebadores específicos para GI y GII (Tabla 3.4) (Kojima y col., 2002; Kageyama y col., 2003).

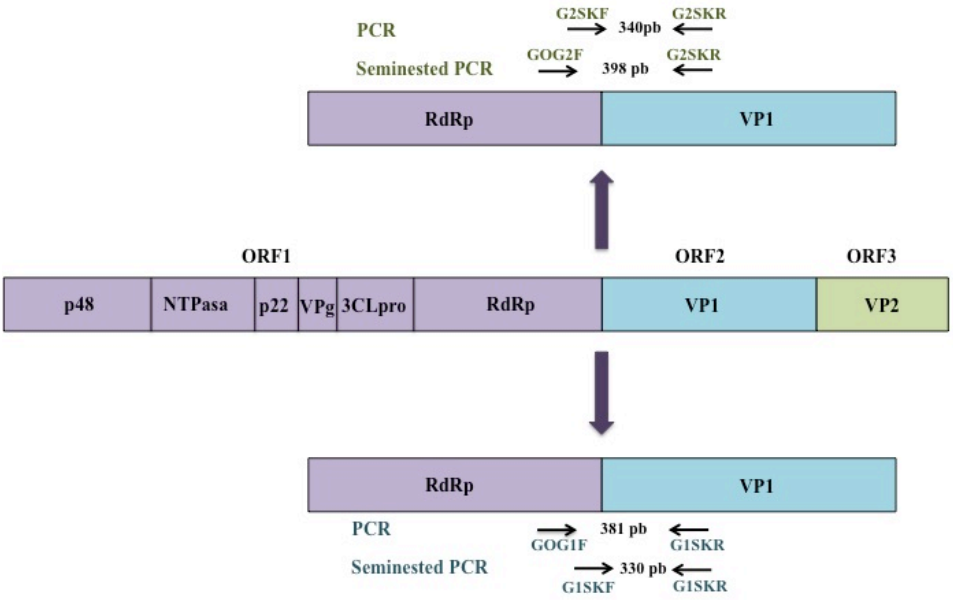


Figura 3.4: Esquema de la posición genómica de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de la región N-terminal de la cápside de NoV GI y GII

El paso de RT se llevó a cabo utilizando la retrotranscriptasa *Expand Reverse Transcriptase* (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, utilizando la siguientes concentraciones finales de los distintos componentes: 1X de tampón *Expand Reverse Transcriptase*, 100 µM de *random hexamer*, 1 mM de dNTPs, 10 mM de Dithiothreitol (DTT) (cuya función es estabilizar enzimas y otras proteínas que poseen grupos sulfidrilos, además de restablecer la actividad perdida por la oxidación de estos grupos in vitro), 50 U de *Expand Reverse transcriptase* y 5 µl de RNA. Las condiciones utilizadas para la retrotrascripción fueron de un primer paso de 30ºC durante 10 min, un segundo paso de 42ºC durante 45 min y un paso de inactivación de la enzima de 95ºC durante 5 min.

La PCR se realizó utilizando el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación de la región parcial de la cápside en cepas de ambos genogrupos, la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, utilizando la siguientes concentraciones finales de los distintos componentes: 1X de tampón *Expand High Fidelity*, 200 µM de dNTPs, 0,3 µM de cebador directo, 0,3 µM de cebador reverso (GOG1F/G1SKR para GI y GOG2F/G2SKR para GII) y 10 µl del cDNA obtenido en la RT. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las mismas para GI y GII y consistieron en una desnaturalización inicial de 94ºC durante 5 min seguido de 40 ciclos de 94ºC durante 15 s, 50ºC durante 30 s y 72ºC durante 45 s. Se realizó un paso de elongación final de 72ºC durante 7 min.

La *seminested* PCR se realizó utilizando el mismo kit y las mismas concentraciones finales de todos los componentes de la reacción, añadiendo 2 µl de producto de PCR como molde para la amplificación. Los cebadores utilizados fueron G1SKF y G1SKR para NoV GI y G2SKF y G2SKR para GII. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las mismas para ambos genogrupos y consistieron en una desnaturalización inicial de 94ºC durante 5 min seguido de 35 ciclos de 94ºC durante 15 s, 50ºC durante 30 s y 72ºC durante 45 s. Se realizó un paso de elongación final de 72ºC durante 7 min.

Tabla 3.4: Cebadores utilizados para la secuenciación de una región parcial de la cápside de NoV GI y GII

USO	VIRUS	DIANA	CEBADOR	POLARIDAD	SECUENCIA 5'-3'	POSICION NUCLEOTÍDICA	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
PCR	NoV GI	dominio N/S *	GOG1F	+	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5310[a]	381 pb
	NoV GI	dominio N/S *	G1SKR	-	CCAACCCARCCATTRTACA	5672-5653[a]	
	NoV GII	dominio N/S *	GOG2F	+	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003–5028[b]	398 pb
	NoV GII	dominio N/S *	G2SKR	-	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5401-5378[b]	
SEMINESTED PCR	NoV GI	dominio N/S *	G1SKF	+	CCAACCCARCCATTRTACA	5342-5369[a]	330 pb
	NoV GI	dominio N/S *	G1SKR	-	CCAACCCARCCATTRTACA	5672-5653[a]	
	NoV GII	dominio N/S *	G2SKF	+	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5057-5075[b]	340 pb
	NoV GII	dominio N/S *	G2SKR	-	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5401-5378[b]	

* Dominio N/S (extremo N-terminal de la cápside)
[a] posición nucleotídica del primer en la secuencia del virus Norwalk (M87661)
[b] posición nucleotídica del primer en la secuencia del virus Lorsdale (X86557)

El tamaño de los productos resultantes de la *seminested* RT-PCR fue de 330 pb en el caso de NoV GI y de 340 pb en el caso de NoV GII. Dado que todo el DNA obtenido era necesario para su posterior secuenciación, los 25 µl de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Para eliminar posibles amplificaciones inespecíficas que pudiesen interferir en el genotipado, los amplímeros se purificaron a partir de gel utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las PCRs de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación *Stabvida DNA Lab* (Portugal), utilizando los mismos cebadores empleados en la *seminested* PCR.

3.5.2 Genotipado de las cepas del virus de la Hepatitis A

Para realizar el genotipado de las cepas de HAV detectadas mediante RT-qPCR, se secuenciaron las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1 del genoma viral (Bower y col., 2000; Robertson y col., 1991) (Figura 3.5). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.5 (Yun y col., 2008). Tras la extracción del RNA se llevó a cabo la RT utilizando la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, France). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl utilizando la siguientes concentraciones finales de los distintos componentes: 1X de tampón *First-strand*, 1,25 mM de dNTP, 0,25 µM de cebador reverso (BR9 para VP1-P2A y HAV2 para VP3-VP1), 2 mM de $MgCl_2$, 100 U de enzima y 5 µl de RNA para VP1-P2A o 10 µl para VP3-VP1. Las condiciones de amplificación fueron: 48ºC durante 45 min, seguido de un paso de desnaturalización de 95ºC durante 5 min para inactivar la enzima. Para amplificar la región VP3-VP1 se realizó una PCR seguida de una *seminested* PCR, ambas con la enzima *Immolase DNA polymerase* (Bioline, Alemania).

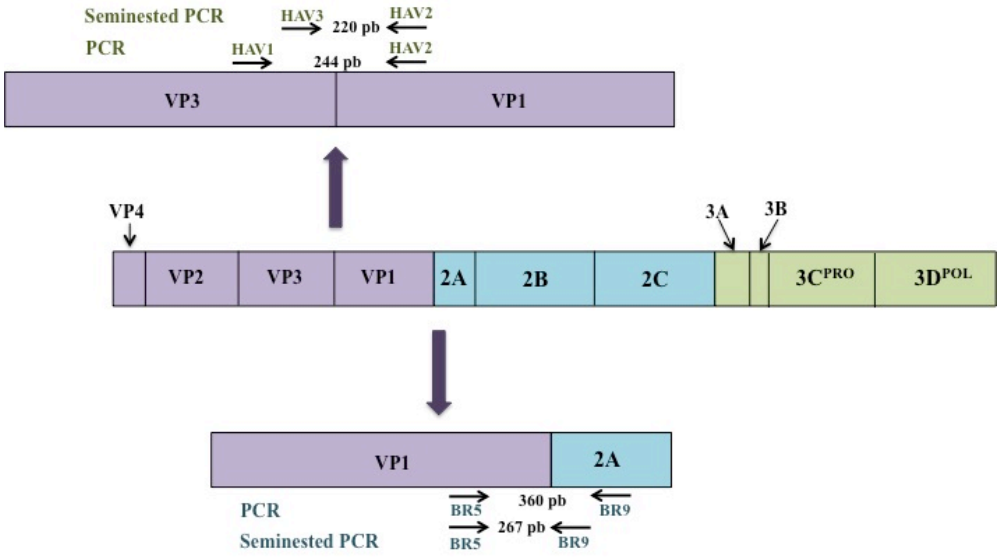


Figura 3.5: Esquema de la posición genómica de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1

La primera PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, en los que se añadieron los 20 µl del cDNA sintetizado en la reacción de RT anterior, el cebador directo BR5 a una concentración final de 0,5 µM, 1X del tampón *Immobuffer* y 2,5 U de enzima. La condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 95ºC durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 95ºC durante 2 min, 55ºC durante 1 min y 72ºC durante 1 min. Se realizó un último paso de elongación final a 72ºC durante 10 min.

Para realizar la *seminested* PCR de la región VP1-P2A se utilizaron 5 µl de una dilución 1:100 del producto de PCR previo. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl utilizando una concentración final de 1X de tampón *Immobuffer*, 0,1 µM de cebador directo BR5, 0,2 µM de cebador reverso BR6, 1 mM de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$ y 2,5 U de

enzima. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en el paso previo de PCR.

En el caso de la PCR para la región VP3-VP1 se usaron los mismos reactivos y a las mismas concentraciones que para la PCR de la región VP1-P2A, utilizando la pareja de cebadores HAV1 y HAV2. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 95ºC durante 5 min, 40 ciclos de 95ºC durante 45 s, 57ºC durante 1 min y 72ºC durante 1 min, seguido de un paso de elongación final de 72ºC durante 10 min.

La *seminested* PCR se realizó del mismo modo que en el caso de VP1-P2A, exceptuando la concentración de cebadores, que en este caso fue de 0,1 µM para el cebador directo HAV3 y 0,06 µM para el cebador reverso HAV2. Las condiciones de amplificación empleadas fueron una desnaturalización inicial de 95ºC durante 5 min, 40 ciclos de 95ºC durante 45 s, 55ºC durante 1 min y 72ºC durante 1 min, seguido de un paso de elongación final de 72ºC durante 10 min. El tamaño de los amplímeros obtenidos fue de 267 pb en el caso de VP1-P2A y de 220 pb en el caso de VP·-VP1. Al igual que ocurría con NoV, dado que todo el DNA obtenido era necesario para su posterior secuenciación, los 25 µl de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Para eliminar posibles amplificaciones inespecíficas que pudiesen interferir en el genotipado, los amplímeros fueron purificados a partir de gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Tabla 3.5: Cebadores utilizados para la secuenciación de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de HAV

USO	VIRUS	DIANA	CEBADOR	POLARIDAD	SECUENCIA 5'-3'	POSICION NUCLEOTÍDICA	TAMAÑO DEL AMPLICÓN
PCR	HAV	VP1-P2A	BR5	+	TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA G	2950-2972	360 pb
	HAV	VP1-P2A	BR9	-	AGT CAC ACCTCT CAA GGA AAA ACT TT	3310-3286	
	HAV	VP3-VP1	HAV1	+	GCT CCT CTT TAT CAT GCT ATG GAT	2172-2196	244 pb
	HAV	VP3-VP1	HAV2	-	CAG GAA ATG TCT CAG GTA CTT TCT	2415-2391	
SEMINESTED PCR	HAV	VP1-P2A	BR5	+	TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA G	2950-2972	267 pb
	HAV	VP1-P2A	BR6	-	AGG AGG TGG AAG CAC TTC ATT TGA	3217-3193	
	HAV	VP3-VP1	HAV3	+	ATG TTA CTA CAC AAG TTG GAG AT	2195-2218	220 pb
	HAV	VP3-VP1	HAV2	-	CAG GAA ATG TCT CAG GTA CTT TCT	2415-2391	

* Posición nucleotídica del primer en la secuencia de la cepa HM-175 (M14707)

Las PCR de secuenciación de las cepas de HAV detectadas en muestras de moluscos de la ría do Burgo y en muestras clínicas se realizaron en el servicio de secuenciación *Stabvida DNA Lab* (Portugal), utilizando los mismos cebadores empleados en las respectivas *seminested* PCR. En el caso de las cepas detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo, las PCR de secuenciación se realizaron en el laboratorio utilizando nucleótidos marcados con diferentes fluoróforos empleando la mezcla comercial *GenomeLab DTCX–Quick Start Kit* (Beckman Coulter, España). Estas amplificaciones se realizaron con los mismos cebadores utilizados en la *seminested* PCR, pero con una concentración de 0,16 µM en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos de 96ºC durante 20 s, 50ºC durante 20 s y 60ºC durante 4 min. Los productos de PCR se precipitaron mediante tratamiento con alcohol en concentración decreciente y se resuspendieron en la solución de carga incluida en el kit. Las secuenciaciones se realizaron en un secuenciador Beckman Coulter CEQ 8000.

3.5.3. Análisis de secuencias

Para cada fragmento de DNA se obtuvieron dos secuencias, utilizando los cebadores directo y reverso. Los electroferogramas obtenidos para cada gen se ensamblaron utilizando el programa SeqMan del paquete informático *Lasergene* (DNA Star Ltd) y se corrigieron manualmente. En el caso de NoV, las secuencias nucleotídicas ya corregidas se analizaron en la base de datos pública de la Noronet, utilizando la herramienta de genotipado Norovirus *Genotyping Tool Version 1.0* (Kroneman y col., 2011) para determinar el genotipo de las distintas cepas de NoV detectadas. Los porcentajes de similitud de los fragmentos del genoma viral analizado

tanto en el caso de NoV como de HAV se obtuvieron mediante el programa *Megalign* (Lasergene, DNA Star Ltd).

3.5.3.1. Análisis filogenético

El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el programa MEGA5 (Tamura y col., 2011). Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron visualmente para identificar los nucleótidos con posiciones inciertas (principalmente en los extremos de las secuencias) y así poder corregirlo u omitirlo. Por defecto, se utilizaron los parámetros de alineamiento aplicados en MEGA5.

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ). Este método utiliza el alineamiento de secuencias como una matriz de distancias, de acuerdo a un modelo de evolución entre taxones. Posteriormente, a partir de dichas distancias, representa las relaciones en un árbol. Las distancias génicas son expresadas como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un alineamiento múltiple. Cuanto más distantes evolutivamente estén dos taxones, más diferencias nucleotídicas cabe esperar y por consiguiente, mayor distancia génica. El método de NJ aplica un algoritmo de agrupamiento "de abajo a arriba", es decir, en cada paso se van uniendo los grupos más cercanos y se van recalculando las distancias. Las distancias entre dos grupos se definen como la media sin ponderar de las distancias que existen entre los miembros de cada grupo.

Los árboles obtenidos mediante el método de NJ son árboles sin raíz en los que no se asume la hipótesis del reloj molecular. Esta hipótesis afirma que, para una determinada molécula (gen o proteína), el ritmo de cambio ha sido constante a lo largo de la historia y en los distintos organismos, de forma que existe una relación directa entre tiempo y

cantidad de cambios. En el caso de NJ, se asume el principio de mínima evolución, donde tras establecer la matriz de distancias, el mejor árbol es aquel que menor longitud presenta (suma de las longitudes de todas las ramas). Puesto que NJ genera árboles no enraizados, una manera para enraizar el árbol es incluir en el análisis un *outgroup* o grupo externo. Los análisis con NJ se realizaron utilizando el programa MEGA5 aplicando el modelo evolutivo Kimura-2-parámetros (Kimura, 1980). Finalmente, para todos los árboles se obtuvieron los valores de bootstrap (método no paramétrico de remuestreo) implementando 1000 pseudo-réplicas.

3.6. Estudio de coalescencia mediante inferencia bayesiana de las poblaciones de Norovirus

Según la teoría neutra de la evolución molecular, la mayor parte de la variación a nivel molecular no se mantiene por la selección tipo darwiniano (adaptativa o positiva), sino que es resultado de un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras o casi neutras (Kimura, 1983; Nei y Kumar, 2000; Ohta y Basten, 1992). Esto implica que la mayor parte de la variación a nivel molecular ocurre de manera aleatoria y no tiene función adaptativa. Bajo neutralidad, en una población de tamaño constante y a lo largo de las generaciones, surgen de forma permanente nuevos alelos por mutación y se pierden otros por deriva génica, de modo que todos los alelos de un gen en una generación derivan de (o coalescen hacia) un único alelo ancestral. Si se aplica la teoría de la coalescencia (Kingman, 1982) a las secuencias de múltiples alelos de un *locus* particular, se pueden describir las historias evolutivas de estos alelos al rastrear hacia atrás el punto en el cual coalescen (se unen), pudiendo así identificar el ancestro

común más reciente (TMRCA, del inglés *Time to More Recent Common Ancestry*).

Para llevar a cabo el estudio de coalescencia mediante inferencia bayesiana de las poblaciones de Norovirus y poder estimar las tasas de sustitución nucleotídica y el tiempo hasta TMRCA para los diferentes genotipos se incluyeron, además de las secuencias procedentes de muestras clínicas y de muestras de moluscos, secuencias con año de aislamiento conocido obtenidas de las bases de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y Noronet (www.noronet.nl).

Para realizar este análisis se empleó el programa BEAST v1.7.4 (Drummond y col., 2012). Este programa, además de la reconstrucción de filogenias, permite probar distintas hipótesis evolutivas sin la condición de un árbol con una topología preestablecida, utilizando para ello la inferencia bayesiana mediante método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC, *Markov chain Monte Carlo*). Los Métodos Bayesianos (MB) determinan para cada árbol la probabilidad de que sea la hipótesis correcta en función de los datos. A la probabilidad de cada árbol en base a unos datos se denomina "probabilidad posterior" porque calcula la probabilidad de una hipótesis a partir de los resultados que produciría dicha hipótesis. Aunque no existe una solución analítica al sistema de Bayes en el problema de inferencia filogenética, existe una aproximación para estimar la distribución de probabilidad posterior: el método MCMC. Se inicializan al azar los parámetros que se quieren inferir, como la topología o longitud de las ramas, y los parámetros del modelo evolutivo. Seguidamente se hace un pequeño movimiento aleatorio (modificación de los parámetros) y se evalúa la función de probabilidad. Si los valores mejoran, entonces se acepta el movimiento y se repite el proceso. Si no mejoran, el nuevo estado se acepta con una probabilidad proporcional al empeoramiento producido.

La idea es que si se repite este proceso muchas veces se obtiene una estimación de la probabilidad asociada a cada estado (a cada árbol). La gran ventaja de los MB es que muestran la probabilidad de cada árbol y de ese modo se puede ver si aparte del árbol más probable existen otros con probabilidad similar, es decir, otras hipótesis alternativas plausibles.

Los análisis se realizaron bajo diferentes condiciones establecidas *a priori* para la serie de datos. El modelo de sustitución utilizado fue el GTR (del inglés *General Time Reversible*) con una tasa de variación entre sitios siguiendo una distribución gamma. El modelo GTR es un proceso estacionario de Markov, en el que las probabilidades de sustitución entre nucleótidos se expresan en forma de matriz, asumiendo diferencias en las frecuencias nucleotídicas y 6 tasas de sustitución diferentes (Tavare, 1986).

Los métodos de coalescencia para inferir la historia demográfica de una población requieren un modelo demográfico, es decir, una función matemática utilizada para inferir los cambios en el tamaño efectivo de la población a lo largo del tiempo. El tamaño efectivo de una población real es el número de individuos de una población ideal teórica en la que la tasa de cambio por deriva (medida en función de la tasa de pérdida de heterocigosidad) fuera la misma que la observada en la población real. Cada modelo demográfico consta de uno o más "parámetros demográficos". Los modelos más comúnmente utilizados son el *constant size* (tamaño constante; un parámetro), *exponential growth* (tasa de crecimiento constante a lo largo del tiempo; dos parámetros), *logistic growth* (tasa de crecimiento decreciente a lo largo del tiempo; tres parámetros) y *expansión growth* (tasa de crecimiento creciente a lo largo del tiempo; tres parámetros) (Drummond y col., 2005). Además, la combinación de los modelos anteriores permite la construcción de otros modelos más complejos, de los cuales el de gráficas de líneas de cielo

(BSP, del inglés *Bayesian Skyline Plot)* es el que, como se ha demostrado, se ajusta mejor a cualquier serie de datos dada (Pybus y Rambaut, 2002). El modelo BSP es un modelo constante por tramos de tamaño de la población, que puede probar un amplio rango de escenarios demográficos. Teniendo en cuenta que no existe ningún modelo demográfico para organismos que muestran un comportamiento cíclico anual/estacional, se utilizó este modelo para el análisis.

Otro parámetro que es necesario definir a la hora de realizar un análisis de coalescencia es el reloj molecular empleado. Un problema que todavía persiste a la hora de inferir filogenias es la variación en la tasa de sustitución entre diferentes linajes. A la hora de inferir fechas de divergencia es conveniente asumir una tasa constante de evolución en todo el árbol (Zuckerkandl y Pauling, 1962; 1965), aunque esto no siempre se ajusta a la realidad de los datos, produciéndose un error no sólo en la estimación de la fecha de divergencia, sino en la inferencia de la filogenia. Por este motivo, la tendencia es el abandono de la hipótesis del reloj molecular a favor de modelos que asumen una tasa independiente de evolución molecular en cada rama del árbol filogenético. Bajo estos modelos, es posible inferir filogenias, pero no determinar tasas de evolución o divergencia debido a que la contribución individual de estas tasas no se puede separar. Para solventar este problema se han desarrollado diversos métodos para relajar la hipótesis del reloj molecular y permitir variaciones a lo largo del árbol. Los MB de relojes-relajados (*lognormal relaxed clock* y *exponential relaxed clock*) permiten la variación de la tasa de evolución entre linajes de una manera autocorrelacionada; la tasa en cada rama es elaborada (*a priori*) a partir de una distribución paramétrica cuya media es una función de la tasa en una rama dada (Drummond y col., 2006). Una distribución *lognormal* se aplicaría en el caso de una varianza

relativa a la longitud de las ramas en unidades de tiempo, implicando que la tasa de evolución varía de manera constante en cada rama. En el caso de una distribución exponencial, implicaría cambios que ocurren en los nodos, independientemente de la longitud de la rama (Drummond y col., 2006). En el caso de las poblaciones de NoV, los análisis se realizaron tanto bajo la hipótesis del reloj molecular, como de un reloj molecular relajado (*lognormal relaxed clock*), con el fin de determinar cual se ajusta mejor a la población dada.

En todos los análisis realizados para las diferentes poblaciones de NoV el número de MCMC empleado fue el necesario para alcanzar la convergencia. La convergencia se evaluó utilizando el programa Tracer (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/) mediante el valor del tamaño efectivo de población, que en todos los casos fue superior a 200 y descartando el 10% de los muestreos como funcinamiento inicial (en inglés *burn-in*). La incertidumbre en los parámetros estimados fue evaluada en el intervalo 95% densidad posterior máxima (95% HPD, del inglés 95% *Highest Posterior Density*). Para seleccionar el modelo que mejor se ajusta a los datos se empleó el Factor Bayes (BF, del inglés *Bayes Factor*), que es la ratio de las probabilidades marginales (marginales con respecto a "probabilidad *a priori*", determinada por los parámetros establecidos antes de comenzar el análisis con BEAST) (Kass y Raftery, 1995; Suchard y col., 2001). El árbol de máxima credibilidad de clados (MCCT, del inglés *Maximun Clade Credibility Tree*) se construyó con el programa TreeAnnotator v1.7.4 (Parte del paquete BEAST) tras descartar el 10% de los muestreos, y se visualizó con el programa Fig-Tree v1.3.1 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). El MCCT se define como el árbol que posee la suma máxima de probabilidades posteriores por nodo.

4. DETECCIÓN Y GENOTIPADO DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS DE MOLUSCOS

4. DETECCIÓN Y GENOTIPADO DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS DE MOLUSCOS

La contaminación de los moluscos bivalvos con NoV y HAV representa uno de los mayores riesgos para la salud pública. Frecuentemente, se producen brotes de gastroenteritis y hepatitis A relacionados con el consumo de moluscos que cumplen con los requerimientos establecidos por la legislación actual para su comercialización. Este hecho evidencia la necesidad de desarrollar métodos para la detección directa de los virus presentes en este tipo de alimentos (Romalde, 1996; Lees, 2000).

Durante las últimas décadas se han realizado avances considerables en este campo, especialmente en la detección de NoV y HAV (Jothikumar y col., 2005; Loisy y col., 2005; Costafreda y col., 2006). Los protocolos de detección de NoV se han desarrollado principalmente para los genogrupos GI y GII, dado que la mayoría de las cepas que afectan a humanos y que frecuentemente se encuentran en moluscos contaminados con aguas residuales pertenecen a estos genogrupos. En áreas no endémicas de HAV, la contaminación de los moluscos con este virus es relativamente poco frecuente, debido a la baja tasa de incidencia en la población. Sin embargo, la enfermedad es más severa que la producida por NoV y las consecuencias de un brote pueden ser más graves (Conaty y col., 2000; Bosch y col., 2001; Shieh y col., 2007).

En comparación con las muestras clínicas, el número de partículas víricas presente en muestras de moluscos es muy bajo. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de bacterias que producen intoxicaciones alimentarias, los virus entéricos tienen una dosis infectiva muy baja, suponiendo un importante riesgo para el consumidor (Bosch y col., 1994;

Sánchez y col., 2002; Le Guyader y col., 2003, 2006b). La gran mayoría de los protocolos publicados para la detección de virus en muestras de moluscos y otros alimentos se basan en el uso de la PCR ya que, debido a la elevada sensibilidad de la técnica, permite detectar un número de partículas víricas muy bajo (Romalde, 1996; Lees, 2000). No obstante, la PCR tiene la limitación de ser sensible a los inhibidores presentes en la matriz de los alimentos, pudiendo originar falsos negativos. El proceso de extracción de la matriz resulta por tanto crítico, ya que debe permitir la recuperación de los virus presentes en la muestra y la eliminación de la mayor parte de los inhibidores. La mayoría de los protocolos empleados para la detección de virus en moluscos bivalvos se centran en la disección de la glándula digestiva. El tejido digestivo representa el 10% de la masa total del molusco y se ha demostrado que es en este órgano donde se concentra la mayor parte de la contaminación viral (Metcalf y col., 1980; Romalde y col., 1994), posiblemente debido a la presencia de receptores específicos (Le Guyader y col., 2006a). De este modo, se evita procesar el resto de los órganos del molusco que contienen una cantidad de virus muy baja pero, potencialmente, una gran cantidad de inhibidores.

Aunque en muchos de los protocolos empleados para la detección de NoV y HAV se han obtenido resultados cualitativos empleando la RT-PCR convencional (Atmar y col., 1995; Green y col., 1998; Le Guyader y col., 2000; Formiga-Cruz y col., 2002), los protocolos utilizados actualmente se centran en la detección mediante RT-qPCR debido a las múltiples ventajas de esta técnica: i) el riesgo de contaminaciones cruzadas es menor, dado que los tubos no han de abrirse tras la RT; ii) al emplearse una sonda marcada durante la amplificación, se evita la posterior confirmación mediante secuenciación; iii) es una técnica cuantitativa, susceptible de ser

estandarizada (Jothikumar y col., 2005; Loisy y col., 2005; Costafreda y col., 2006).

El Grupo de Asesoramiento Técnico (TAG, del inglés *Technical Advisory Group*) del Comité Europeo para la Estandarización (CEN, del francés *Comité Européen de Normalisation*) ha propuesto un protocolo para la estandarización de la extracción de RNA y detección de HAV y NoV GI y GII mediante RT-qPCR en muestras de moluscos (Lees, 2010). Este métodod ha sido adoptado y publicado por la Organización Internacional para Estandarización (ISO, del inglés *International Organization for Standardization*) como método de referencia para la detección de NoV y HAV en muestras de alimentos (ISO/TS 15216), y permitirá incluir los controles virológicos en la legislación, una vez que se hayan establecidos los límites de cuantificación viral que se considerarán aceptables para que el producto sea apto para el consumo.

Como parte de un proyecto anterior (Vilariño, 2009), se llevó a cabo la detección de NoV y HAV en moluscos procedentes de distintas zonas de muestreo de la ría de Vigo. El principal objetivo del trabajo era establecer la correlación existente entre la presencia de virus en muestras de moluscos y la actual clasificación de las zonas de crecimiento de los mismos en base a estándares bacterianos.

La presencia de NoV fue detectada en 39 (24,4%) de las 160 muestras analizadas. En 18 (46,2%) de ellas, NoV se detectó con la pareja de cebadores diseñada para GI. En las otras 21 muestras (53,8%), la presencia de NoV se detectó con la pareja de cebadores diseñada para GII (Tabla 4.1). La presencia de HAV fue detectada en 71 (44,4%) de las 160 muestras de moluscos bivalvos recogidas en la ría de Vigo entre marzo de 2004 y diciembre de 2006. En la tabla 4.1 se resume el número de muestras positivas obtenidas para estos virus en cada tipo de muestra.

Tabla 4.1: Resultados obtenidos del análisis de detección de HAV en las muestras de moluscos analizadas procedentes de la ría de Vigo (modificado de Vilariño, 2009).

Virus	Nº total muestras	Zona	Especie	Nº muestras especie	Nº positivos
NoV GI	68	B	mejillón	68	7 (10,3%)
	92	C	almeja	31	4 (12,9%)
			berberecho	31	6 (19,3%)
			mejillón	30	1 (3,3%)
NoV GII	68	B	mejillón	68	12 (17,6%)
	92	C	almeja	31	2 (6,4%)
			berberecho	31	2 (6,4%)
			mejillón	30	5 (16,7%)
HAV	68	B	mejillón	68	30 (44,11%)
	92	C	almeja	31	13 (41,9%)
			berberecho	31	11 (35,4%)
			mejillón	30	17 (56,6%)

4.1. Resultados

4.1.1. Análisis filogenético de las cepas de NoV y HAV detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo

Para realizar el análisis filogenético de las 71 cepas de HAV detectadas se secuenciaron las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1. El árbol filogenético obtenido mediante el método de NJ para las secuencias correspondientes a la región VP1-P2A reveló que todas las cepas de HAV detectadas pertenecían al subgenotipo IB (Figura 4.1), constituyendo un grupo monofilético junto con la cepa IB tipo (HM-175), con un valor de bootstrap del 99%. Las cepas de referencia incluidas en el análisis pertenecientes a los distintos genotipos y subgenotipos de HAV constituyeron a su vez ramas independientes bien definidas con valores de bootstrap superiores al 75% (Figura 4.1).

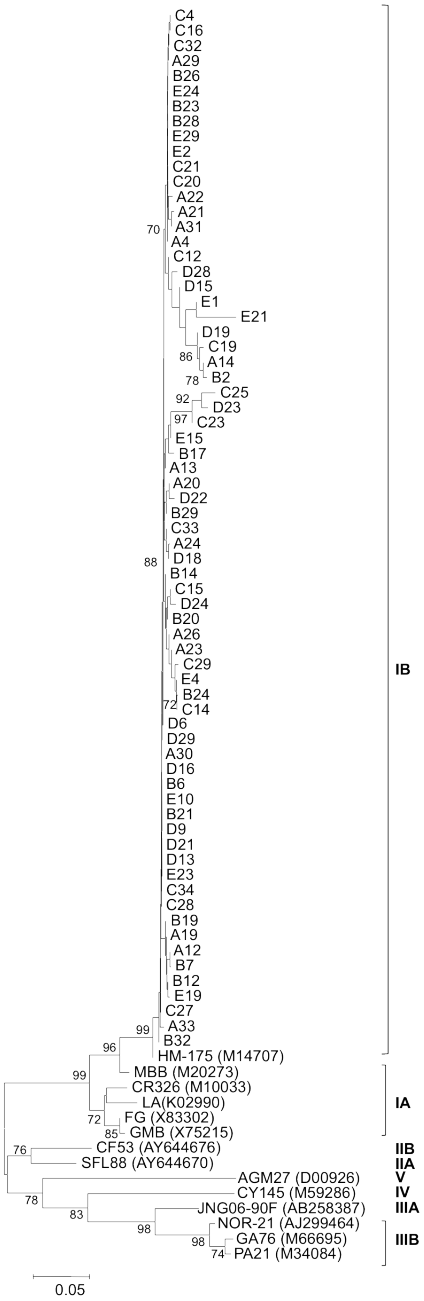


Figura 4.1: Árbol filogenético de la región VP1-P2A de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

Aunque las cepas analizadas pertenecían al mismo subgenotipo, se observaron diferencias nucleotídicas entre ellas. Los porcentajes de similitud entre las distintas secuencias VP1-P2A variaron entre el 85,9% y el 100%. Estas diferencias nucleotídicas quedan reflejadas en el árbol filogenético, aunque los valores de bootstrap obtenidos para cada una de las ramas en las que se agruparon las distintas cepas son muy bajos. El porcentaje de similitud entre las cepas analizadas y la cepa de referencia HM-175 varia entre el 89,3% y el 99,6%.

En el caso de las secuencias de la región VP3-VP1, el árbol filogenético obtenido mediante el método de NJ confirmó que todas las cepas de HAV analizadas pertenecían al genotipo IB (Figura 4.2). El árbol obtenido para esta región del genoma viral muestra los diferentes genotipos y subgenotipos situados en ramas independientes, pero con valores de bootstrap menores que los obtenidos al analizar la región VP1-P2A. Las cepas de la ría de Vigo analizadas constituyeron un grupo monofilético junto con la cepa HM-175, con un valor de bootstrap del 93%.

Los valores de similitud entre las secuencias de la región VP3-VP1 de las cepas analizadas varía entre el 87,5 % y el 100%. Aunque estos valores son muy similares a los obtenidos para la región VP1-P2A, el análisis filogenético de esta región parece reflejar mejor las diferencias entre las cepas analizadas, dado que los valores de bootstrap que definen cada una de las ramas en las que se agrupan las diferentes cepas analizadas son más elevados. Los porcentajes de similitud entre las cepas analizadas y la cepa de referencia HM-175 varían entre el 87,8% y el 99,2%.

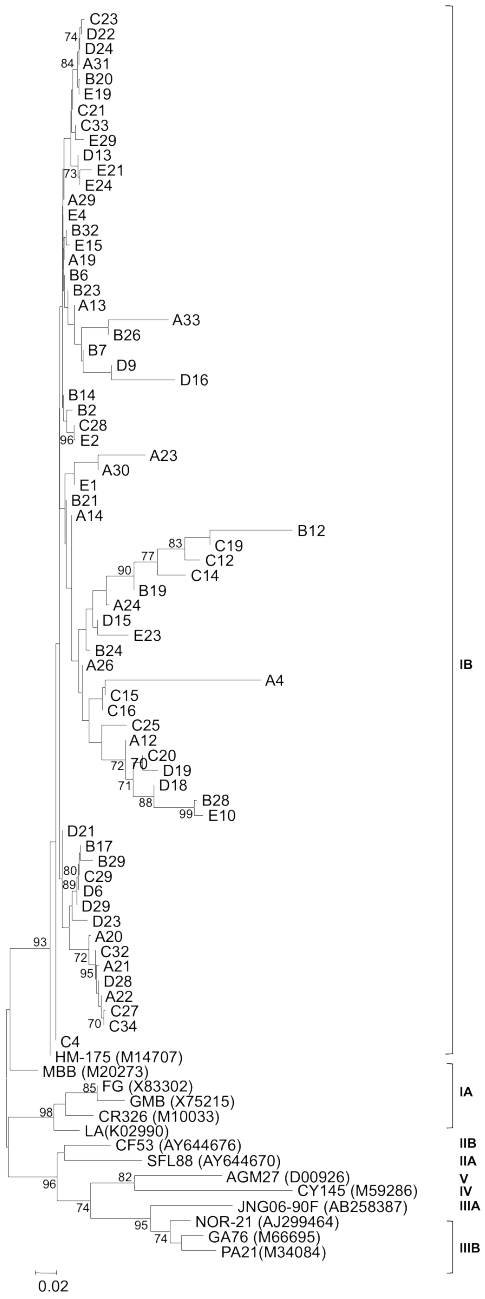


Figura 4.2: Árbol filogenético de la región VP3-VP1 de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

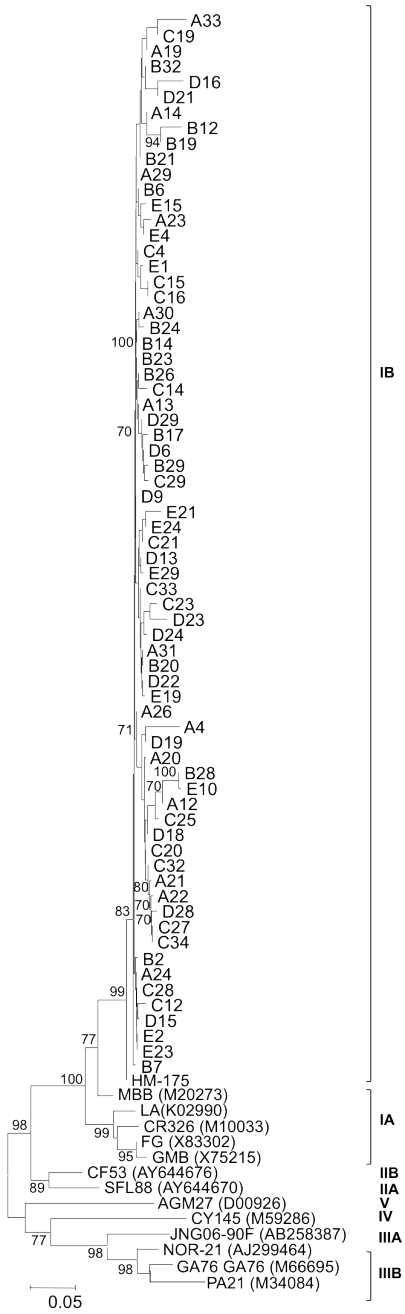


Figura 4.3: Árbol filogenético del concatenado de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de las 71 cepas de HAV construido por el método de NJ. Los códigos de la muestras son: A y B, muestras pertenecientes a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C, muestras pertenecientes a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

Los porcentajes de similitud obtenidos para las secuencias concatenadas de ambas regiones de las 71 cepas de HAV analizadas variaron entre el 87,5 % y el 100%. Aunque este resultado es similar al obtenido para las secuencias de la región VP3-VP1, los valores de bootstrap para cada una de las ramas en las que se agrupan las cepas analizadas son algo menores, aunque superiores a los observados en el caso del árbol obtenido a partir de las secuencias de la región VP1-P2A (Figura 4.3). Los porcentajes de similitud observados entre las cepas analizadas y la cepa de referencia HM-175 varían entre el 93,6% y el 99,7%.

Para realizar el análisis filogenético de las cepas de NoV detectadas se llevó a cabo la secuenciación de la región de unión de la ORF1 y ORF2. Únicamente en el caso de 4 de las 39 (10,2%) cepas de NoV detectadas se obtuvo una secuencia apropiada para la caracterización de las cepas. Dos de las cepas fueron detectadas con la pareja de cebadores diseñada para GI y las otras 2 cepas con los diseñados para GII. Sin embargo, en el caso de las 4 cepas, la amplificación de la región parcial de la cápside se obtuvo utilizando la pareja de cebadores diseñada para GII. El análisis filogenético de las cepas, realizado mediante el método de NJ, reveló que todas pertenecían al genogrupo GII (Figura 4.4). Tres de ellas (una detectada en mejillón cultivado y dos detectadas en berberecho) fueron caracterizadas como GII.4 variante 2010. La cepa restante (detectada en mejillón de roca), fue caracterizada como GII.3. Además, las secuencias se analizaron en la base de datos de la Noronet, utilizando la herramienta de genotipado Norovirus *Genotyping Tool Version 1.0*. En todos los casos, el resultado obtenido para la caracterización de las cepas fue el mismo que el obtenido mediante el análisis filogenético por NJ.

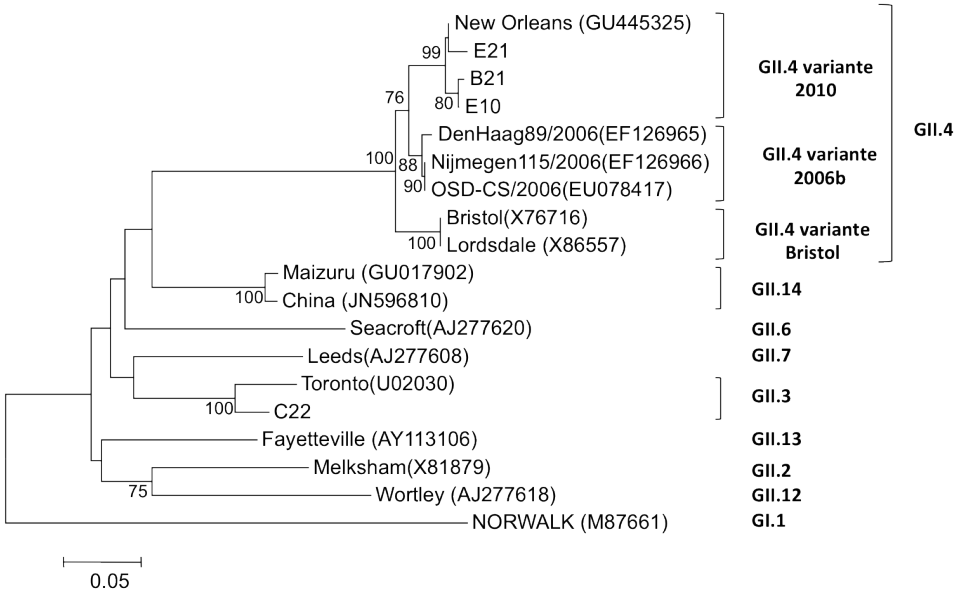


Figura 4.4: Reconstrucción filogenética basada en secuencias parciales de la cápside de 4 cepas de NoV y cepas de referencia de cada genotipo construido por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos) (Códigos de la muestras: B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, E a berberecho).

4.1.2. Detección de NoV y HAV en moluscos procedentes de la ría do Burgo

De las 81 muestras de mejillón recogidas en la ría do Burgo, 15 (18,5%) fueron positivas para la presencia de HAV y 41 (49,4%) fueron positivas para la presencia de NoV. En 7 muestras (8,6%), NoV se detectó con la pareja de cebadores diseñada para GI, en 25 muestras (30,8%) con la pareja de cebadores diseñada para GII y en 9 muestras (11,1%) la presencia de NoV se detectó con ambas parejas de cebadores.

Cincuenta y tres de las muestras de mejillón procedían de 5 zonas de cultivo clasificadas como B. Diez de ellas (18,8%) resultaron positivas para la detección de HAV. La presencia de NoV se detectó en 25 de las muestras (47,1%), de las cuales 4 (7,5%) se detectaron empleando la pareja de cebadores para GI, 15 (28,3%) para GII y 6 (11,3%) con ambas parejas de cebadores.

Tabla 4.2: Número de muestras recogidas en cada zona de muestreo y porcentaje de muestras en las que se detecto NoV y HAV.

Zona de muestreo	Clasifi-cación	Nº de muestras	% HAV	% NoV GI	% NoV GII	% NoV GI /GII*
1	B	8	12,5	12,5	37,5	23
2	B	1	100	0	0	100
3	B	14	28,6	2	14,3	14,3
4	B	17	17,6	0	41,2	5,9
5	B	13	7,7	7,7	23,1	0
6	C	16	18,8	6,2	37,5	6,2
7	C	12	16,7	16,7	33,2	16,7

* % de NoV GI y GII detectados en la misma muestras

Las otras 28 muestras de mejillón analizadas habían sido recolectadas en dos zonas clasificadas como C. En estas muestras HAV se detectó en 5 de ellas (17,8%) y NoV en 16 (57,1%): 3 de las cepas (10,7%) se detectaron con los cebadores para GI, 10 (35,7%) con los cebadores para GII y 3 (10,7%) con ambas parejas de cebadores. En la Tabla 4.2 se resume el número de muestras analizadas procedentes de las distintas zonas de muestreo y el porcentaje de muestras en las que se detectó NoV y HAV.

En todas las muestras positivas se obtuvo una eficiencia de extracción elevada (>10%), excepto en una muestra positiva para HAV, 2 para NoV GI y 6 para NoV GII, en las que se obtuvieron valores de eficiencia de extracción aceptables (1-10%). En cuanto a la eficiencia de RT-qPCR, en todas la muestras positivas se obtuvieron valores elevados (>10%), excepto en 6 muestras positivas para NoV, en las que los valores de eficiencia de RT-qPCR fueron aceptables (1-10%).

Los niveles de contaminación se calcularon comparando las Ct obtenidas para cada muestra con la recta estándar del virus. La concentración final se ajustó a la dilución del ácido nucleico empleada y se aplicaron los factores de corrección derivados de la eficiencia de extracción y de PCR. Los niveles de contaminación observados para HAV varían entre 8 x 10^1 y 4,1 x 10^6 copias de RNA/g tejido digestivo; para NoV GI, entre 5,9 x 10^3 y 1,6 x 10^9 RNA copias de RNA/g tejido digestivo; y para NoV GII entre 6,4 x 10^3 y 4,1 x 10^6 RNA copias de RNA/g tejido digestivo.

Para cada virus, se determinaron también los niveles de contaminación sin aplicar los factores de corrección derivados de la eficiencia de extracción y de PCR (Lees, 2010; Lowther y col., 2012). En el caso de HAV, los niveles de contaminación varían entre 2,2 x 10^1 y 5,4 x 10^4 copias de RNA/g tejido digestivo; en el caso de NoV GI entre 4,8 x 10^2 y 4,5 x 10^8 copias de RNA/g tejido digestivo; y en el caso de NoV GII entre 1,2 x 10^2 y 7,1 x 10^4 copias de RNA/g tejido digestivo. En las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5 se resumen los niveles de contaminación de los distintos virus observados en las muestras de mejillón procedentes de las diferentes zonas de muestreo.

Tabla 4.3: Resultados de los niveles de contaminación de HAV en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo.

Zona de muestreo	Clasifi-cación	Nº positivos HAV	HAV QR* (corregido)	HAV QR* (sin corregir)
1	B	1	$1,2x10^4$	$2,5x10^3$
2	B	1	$2,3x10^2$	$2,2x10^1$
3	B	4	$1,1x10^2$–$4,1x10^6$	$1,5x10^2$-$1,7x10^4$
4	B	3	$3,4x10^2$–$4,9x10^4$	$7,82x10^1$-$2,7x10^4$
5	B	1	$8,6x10^4$	$5,4x10^4$
6	C	3	$7,5x10^2$–$2,3x10^3$	$2,29x10^1$-$6,7x10^2$
7	C	2	$1,5x10^2$/$3x10^5$	$1,12x10^2$/$3,9x10^2$

*QR, rango de cuantificación (copias de RNA/g tejido digestivo).

Tabla 4.4: Resultados de los niveles de contaminación de NoV GI en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo.

Zona de muestreo	Clasifi-cación	Nº positivos NoV GI	NoV GI QR* (corregido)	NoV GI QR* (sin corregir)
1	B	3	$7x10^3$- $3,3x10^6$	$2,5x10^3$-$9,1x10^3$
2	B	1	$3,2x10^4$	$3,4x10^4$
3	B	4	$5,9x10^3$- $1,6x10^9$	$1,3x10^3$-$4,5x10^8$
4	B	1	$1,1x10^8$	$6,1x10^5$
5	B	1	$4,8x10^4$	$4,8x10^2$
6	C	2	$1,1x10^5$-$9,1x10^7$	$7,5x10^3$/$1,7x10^6$
7	C	4	$8,5x10^3$-$8,4x10^7$	$4x10^3$-$2,1x10^5$

*QR, rango de cuantificación (copias de RNA/g tejido digestivo).

Tabla 4.5: Resultados de los niveles de contaminación de NoV GII en las muestras procedentes de las diferentes zonas de muestreo.

Zona de muestreo	Clasifi-cación	Nº positivos NoV GII	NoV GII QR* (corregido)	NoV GII QR* (sin corregir)
1	B	5	$1,4x10^4$- $2,7x10^6$	$2,3x10^2$-$2,4x10^4$
2	B	1	$2,6x10^4$	$7,8x10^2$
3	B	4	$7,6x10^4$- $4,1x10^6$	$9,5x10^2$-$3,6x10^4$
4	B	8	$2,3x10^4$- $1,8x10^6$	$5,2x10^2$-$4,3x10^4$
5	B	3	$2,8x10^5$- $5,4x10^6$	$6,9x10^2$-$7,1x10^4$
6	C	7	$6,4x10^3$- $5x10^5$	$1,2x10^2$-$3x10^3$
7	C	6	$6x10^3$-$2,4x10^6$	$1,9x10^2$-$5,8x10^4$

*QR, rango de cuantificación (copias de RNA/g tejido digestivo).

El porcentaje de muestras positivas detectadas para HAV fue mayor durante los meses fríos. En el periodo comprendido entre octubre 2010-marzo 2011, el 12,5% de las muestras analizadas fueron positivas para HAV. Durante el periodo comprendido entre octubre 2011-marzo 2012, el virus se detectó en un 29,4% de las muestras. Durante los meses cálidos (abril 2011-septiembre 2011), la presencia de HAV se detectó en el 8,3% de las muestras. En el caso de NoV, también se observaron diferencias entre las tasas de detección de los meses fríos y cálidos. Durante los meses comprendidos entre octubre 2010-marzo 2011 y octubre 2011-marzo 2012, NoV se detectó en un 54,1% y un 52,9% de las muestras, respectivamente. Durante los meses de abril 2011-septiembre 2011, el virus se detectó en un 33,3% de las muestras (Tabla 4.6).

El mayor porcentaje de muestras positivas para HAV se detectó en una zona catalogada como B (Tabla 4.2). En el caso de NoV, la tasa de detección para GI fue mayor en una zona catalogada como C, mientras que las mayores tasas de detección para GII y para las coinfecciones por ambos

genogrupos (GI/GII) fueron en zonas catalogadas como B (Tabla 4.2). Para determinar la correlación existente entre el número de muestras positivas para HAV y NoV detectadas y la clasificación de las zonas de crecimiento de moluscos en base a estándares bacterianos, se realizo un test estadístico Chi-cuadrado (χ^2) mediante tablas de contingencia dos a dos. El test χ^2 no mostró correlación estadística entre la contaminación por HAV y la clasificación de la las zonas de crecimiento de moluscos (Tabla 4.7). En el caso de contaminación por NoV (Tabla 4.8), tampoco se observó una correlación estadísticamente significativa.

Tabla 4.6: Porcentaje de muestras positivas para NoV y HAV durante los meses fríos y los meses cálidos

	Octubre 2010-Marzo 2011	Abril 2011-Septiembre 2011	Octubre 201-Marzo 2012
Total de Muestras	24	24	33
% Positivos HAV	12,5	8,3	29,4
% Positivos NoV	54,1	33,3	52,9

Tabla 4.7: Tabla de contingencia dos a dos en la que se analiza la correlación existente el número de muestras positivas para HAV y el número de muestras en las que HAV no se detectó y la procedencia de zona B o C de dichas muestras.

	Zona B	Zona C
Positivo HAV	10	5
Negativo HAV	43	23

Hipótesis nula H0: las variables son independientes
Nivel de significancia (α)= 0,05
Grados de libertad (n)= 1
Valor crítico χ^2= 3,8
χ^2= 0,38 (valor < 3,84 por lo que se acepta la hipótesis nula)

Tabla 4.8: Tabla de contingencia dos a dos en la que se analiza la correlación existente el número de muestras positivas para NoV y el número de muestras en las que HAV no se detecto y la procedencia de zona B o C de dichas muestras.

	Zona B	Zona C
Positivo NoV	25	16
Negativo NoV	28	12

Hipótesis nula H0: las variables son independientes
Nivel de significancia (α)= 0,05
Grados de libertad (n)= 1
Valor crítico χ^2= 3,8
χ^2= 0,036 (valor < 3,84 por lo que se acepta la hipótesis nula)

4.1.3. Análisis filogenético de las cepas de NoV y HAV detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo

El árbol filogenético construido mediante el algoritmo de NJ con el concatenado de las secuencias de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de las cepas de HAV detectadas reveló que todas ellas pertenecen al subgenotipo IB (Figura 4.5). Las cepas constituyen un grupo monofilético robusto junto con la cepa HM-175, con un valor de bootstrap del 99%. A su vez, las cepas detectadas en la ría do Burgo forman un grupo bien definido, con un valor de bootstrap del 88%. Las cepas correspondientes a los diferentes genotipos y subgenotipos incluidos en el análisis constituyen ramas independientes, con valores de bootstrap superiores al 70%.

Los porcentajes de similitud entre las cepas de HAV detectadas en la ría do Burgo y la cepa de referencia HM-175 varían entre el 98,2% y el 99,1%. Catorce de las 15 cepas de HAV son idénticas entre sí, con un porcentaje de similitud del 100%. La cepa restante posee un porcentaje de similitud con estas 14 cepas del 99,6% (Figura 4.5).

De las 41 cepas de NoV detectadas, sólo se obtuvo una secuencia de la región parcial de la cápside apta para el genotipado en el 39% de los casos. El árbol filogenético construido empleando el algoritmo de NJ con secuencias de 6 de las cepas procedentes de la ría do Burgo y secuencias de cepas de referencia pertenecientes a diferentes genogrupos de GI, reveló que todas ellas pertenecían al subgenotipo I.4, constituyendo un grupo monofilético muy robusto (bootstrap de 100%) junto con la cepa tipo de este genotipo (Figura 4.6).

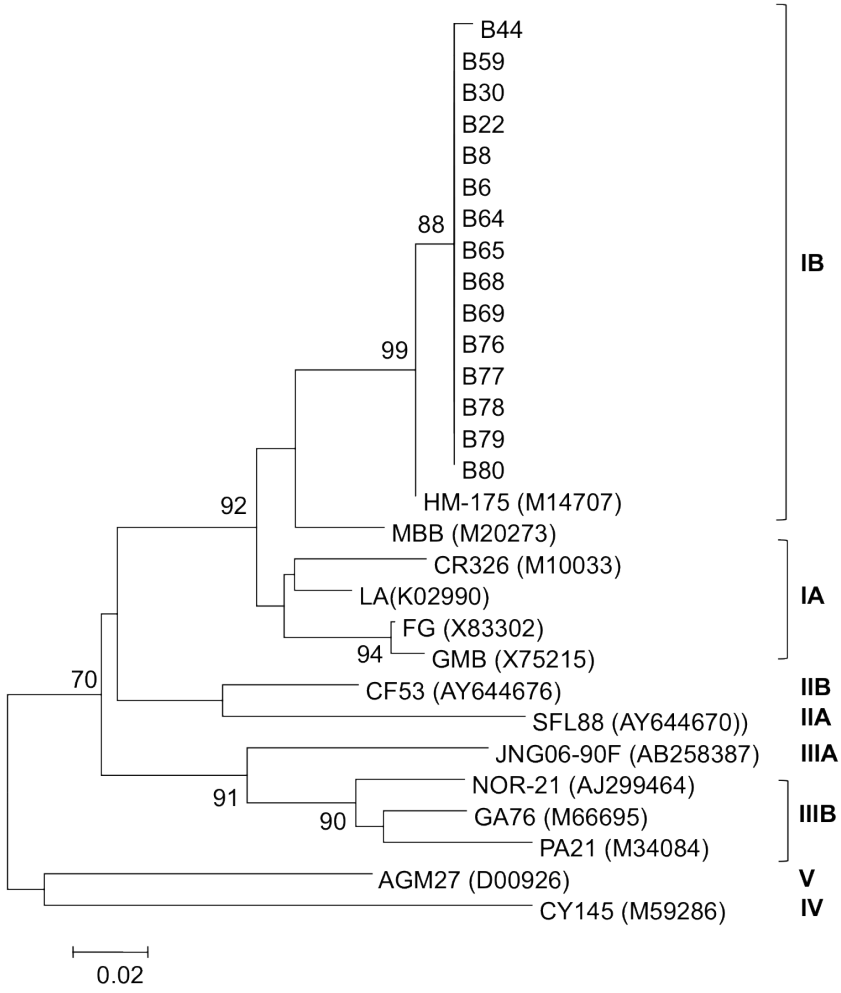


Figura 4.5: Reconstrucción filogenética basada en el concatenado de las secuencias de las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1 de las 15 cepas de HAV detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de cada genotipo y subgenotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

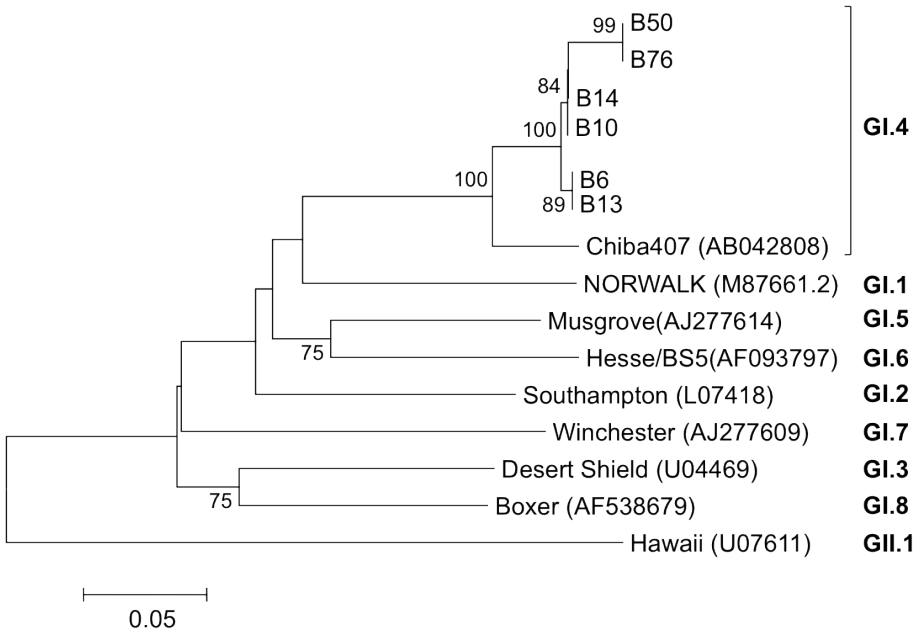


Figura 4.6: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial de la cápside de las 6 cepas de NoV GI detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de cada genotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

Las 6 cepas de la ría do Burgo se agrupan en una única rama bien definida (bootstrap 100%). Los porcentajes de similitud entre estas 6 cepas varían entre el 99,4% y el 100%. Esta variabilidad se encuentra reflejada en el árbol, en el que se observan valores de bootstrap superiores al 84% para cada una de las ramas definidas. Los porcentajes de similitud entre las 6 cepas de la ría do Burgo y la cepa tipo de GI.4 varían entre el 91,7% y el 93,6%.

El árbol filogenético obtenido mediante el análisis de las secuencias de 10 de las cepas detectadas en la ría do Burgo y secuencias de cepas de referencia pertenecientes a diferentes genogrupos de GII mostró que 8 de las cepas pertenecían al genogrupo GII.4, constituyendo un grupo

monofilético con las cepas tipo con un valor de bootstrap del 100% (Fig 4.7). Dentro de este genogrupo, 7 de las cepas se agrupan con otras de referencia de la variante 2006b (bootstrap 93%). La otra cepa procedente de la ría do Burgo se agrupa con otra de referencia de la variante 2010 (bootstrap 80%).

Los porcentajes de similitud entre las 7 cepas caracterizadas como variante 2006b varían entre el 99,4 y el 100%. El porcentaje de similitud de la cepa perteneciente a la variante 2010 respecto a las cepas 2006b varía entre el 97,1 y el 97,4%. Los porcentajes de similitud entre las cepas de la ría do Burgo y las cepas de referencia de GII.4 varían entre el 93,4% y el 94,3%. Las otras dos cepas de la ría do Burgo pertenecen al genogrupo GII.6, agrupándose en una única rama bien definida con la cepa de referencia de dicho genogrupo, con un valor bootstrap del 85%. El porcentaje de similitud entre las cepas es del 98% y entre estas y la cepa de referencia es del 86,2%.

Además del análisis filogenético mediante el algoritmo de NJ, todas las secuencias de las cepas de NoV se analizaron en la base de datos de la Noronet, utilizando la herramienta de genotipado Norovirus *Genotyping Tool Version 1.0*. El resultado obtenido para caracterización de las cepas fue el mismo empleando ambos métodos.

De las 6 cepas caracterizadas como NoV GI, el 50% habían sido detectadas previamente con la pareja de cebadores diseñada para GII, el 16,6% fueron detectadas con la pareja de cebadores diseñada para GI y el 33,3% con ambas parejas de cebadores. De las 10 cepas caracterizadas como NoV GII, el 30% habían sido detectadas con los cebadores para GII, el 20% con los cebadores para GI y el 50% con ambas parejas de cebadores.

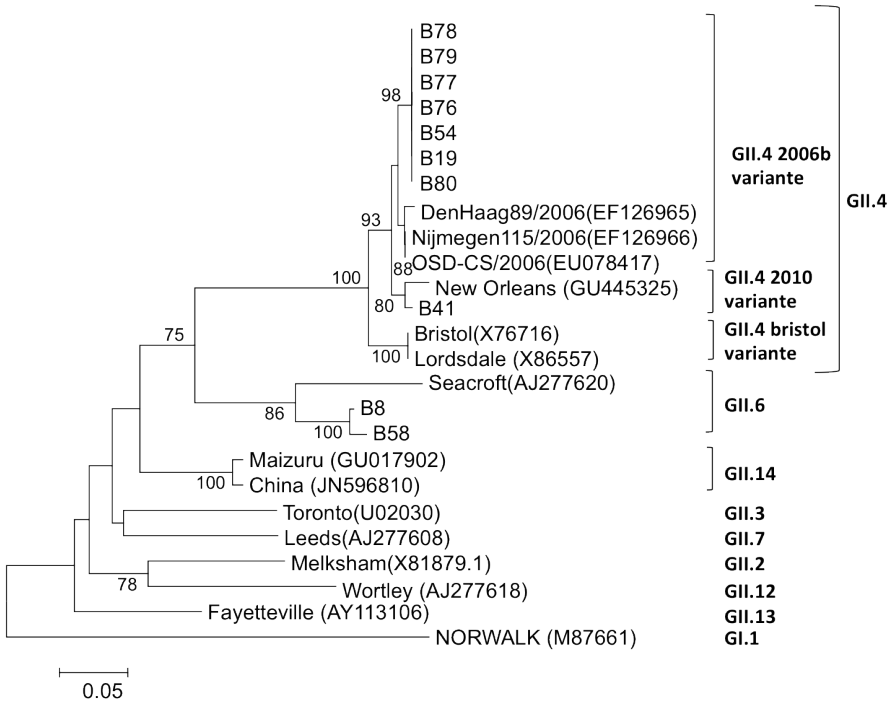


Figura 4.7: Reconstrucción filogenética basada en la secuenciación de la cápside de las 10 cepas de NoV GII detectadas en la ría do Burgo y de cepas de referencia de distintos genotipos por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

4.1.4. Comparación de las cepas de NoV y HAV detectadas en la ría de Vigo y en la ría do Burgo. Análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético del concatenado de las secuencias de VP1-P2A y VP3-VP1 de las cepas de HAV detectadas en la ría de Vigo y en la ría do Burgo. El árbol obtenido mediante el algoritmo de NJ muestras que todas las cepas detectadas en la ría do Burgo, excepto la denominada B44, se agrupan en una única rama. Como se ha mencionado anteriormente, estas cepas tienen un porcentaje de similitud del 100%. La cepa B44, cuyo porcentaje de similitud con el resto de cepas detectadas en la ría do Burgo es del 99,6%, se encuentra localizada en una rama distinta, agrupada con cepas procedentes de la ría de Vigo (Figura 4.8).

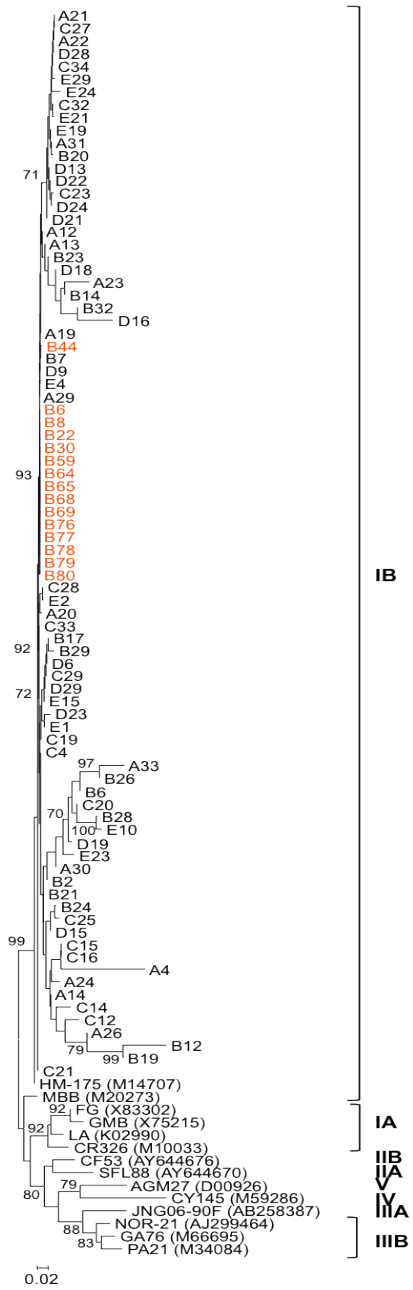


Figura 4.8: Reconstrucción filogenética basada en el concatenado de las secuencias de las regiones de unión VP1-P2A y VP3-VP1 de las cepas de HAV detectadas en la ría de Vigo (Códigos de la muestras: A y B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho) y en la ría do Burgo (destacadas en color naranja), así como de cepas de referencia de cada genotipo y subgenotipo por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

El análisis filogenético realizado incluyendo las secuencias de las cepas de NoV GII detectadas en la ría de Vigo y la ría do Burgo reveló que la cepa de NoV GII.4 asignada a la variante 2010 procedente de la ría de Vigo constituye un grupo monofilético robusto (valor de bootstrap del 86%) junto con una de las cepas detectada en la ría de Vigo asignada a esa misma variante. El porcentaje de similitud entre ambas cepas es del 99,7% (Figura 4.9).

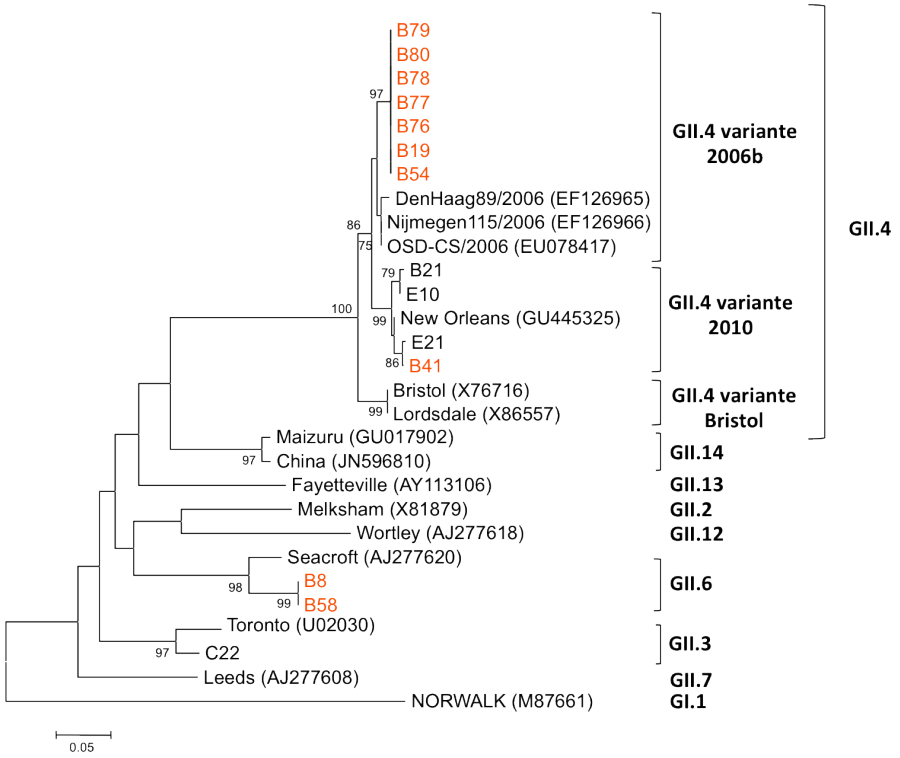


Figura 4.9: Reconstrucción filogenética basada en la secuenciación de la cápside de las cepas de NoV GII detectadas en la ría de Vigo (Códigos de la muestras: A y B pertenecen a mejillón cultivado procedentes de dos bateas diferentes. C pertenece a mejillón de roca, D a almeja y E a berberecho) y en la ría do Burgo (destacadas en color naranja) junto con secuencias de cepas de referencia de distintos genotipos por el método de NJ. La barra representa las sustituciones nucleotídicas por sitio. Sólo se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 re-muestreos).

4.2. Discusión

Las técnicas moleculares basadas en la PCR se consideran la mejor herramienta para la detección de virus patógenos en moluscos bivalvos (Lees, 2000). El TAG-CEN desarrolló un protocolo para la estandarización de la extracción y detección del RNA viral de HAV y NoV GI y GII mediante RT-qPCR en muestras de moluscos (Lees, 2010) y que se ha adoptado como método de referencia para la detección de NoV y HAV en muestras de alimentos (ISO/TS 15216). No obstante, es importante establecer los límites de cuantificación viral que se considerarán aceptables para que el producto sea apto para el consumo, antes de incluir los controles virológicos en la legislación actual. Estudios recientes llevados a cabo por Lowther y col. (2012) ponen de manifiesto la relevancia de la cuantificación para evaluar la carga de la contaminación. Estos autores analizaron la presencia de RNA viral de NoV GI y GII en ostras procedentes de diferentes áreas de producción en Reino Unido. Un elevado número de muestras positivas presentaron unos niveles de cuantificación que excedían el límite de detección del método propuesto por el TAG-CEN (100 copias/g de tejido). Sin embargo, en la actualidad no es posible determinar de forma absoluta el riesgo para la salud que suponen diferentes niveles de NoV.

Con el fin de establecer la correlación existente entre la presencia de HAV y NoV en moluscos y la calidad del agua en siete puntos de muestreo de la ría do Burgo se empleó la técnica de RT-qPCR para evaluar la prevalencia de estos virus en las diferentes zonas de estudio con distinta clasificación.

En el caso de las muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo, la presencia de HAV se detectó en el 44,4% de las muestras analizadas

(Vilariño, 2009). El 61,2% de dichas muestras eran de mejillones, de las cuales, en el 47,9% se detectó la presencia de HAV. El análisis de mejillones procedentes de la ría del Burgo mostró que un 18,5% de las muestras eran positivas para la presencia de HAV. La tasa de detección de este virus en mejillones de la ría do Burgo resultó menor que la detectada por otros autores en regiones geográficas cercanas. Mesquita y col. (2011), obtuvieron una tasa de detección de HAV del 33% mediante RT-PCR convencional en muestras de moluscos procedentes del norte y centro de Portugal. De las muestras de moluscos analizadas por estos autores, el 28,6% eran de mejillón, de las cuales el 64,2% fueron positivas para la presencia de HAV. Aunque el método de detección puede estar influyendo en el número de muestras positivas para HAV observadas, la detección en el caso de las muestras de la ría de Vigo y de la ría do Burgo se llevó a cabo empleando el mismo método, por lo que la menor tasa de detección de HAV observada en los moluscos de esta región podría deberse a una menor prevalencia de este virus en la población durante estos últimos años.

En el caso de NoV, el 24,4% de las muestras procedentes de la ría de Vigo resultaron positivas para este virus. En las muestras de la ría do Burgo, NoV se detectó en un 49,4% de las muestras analizadas. Estas diferencias pueden deberse a que, aunque la prevalencia de NoV en la población es elevada, la aparición de nuevas variantes dentro de un determinado genogrupo hacen que la incidencia en la población aumente durante los años en los que estas variantes emergen (Siebenga y col., 2007b; Motomura y col., 2008; Bull y col., 2010).

Las mayores tasas de detección para HAV, NoV GII y contaminaciones mixtas de NoV GI/GII en los moluscos procedentes de la ría do Burgo se observaron en muestras procedentes de zonas catalogadas como B, mientras que la mayor tasa de detección para NoV GI fue en

muestras procedentes de zona C. Sin embargo, el análisis estadístico aplicando el test Chi-cuadrado mediante tablas de contingencia mostró que no existía una correlación estadísticamente significativa entre el número de muestras positivas detectadas para HAV y NoV y la clasificación de las zonas de crecimiento de moluscos basada en estándares bacterianos. Este resultado apoya estudios previos que afirman que, al menos en los muestreos realizados en estudios de duración limitada, no se observa una asociación entre los actuales sistemas de clasificación de la áreas de cultivo de moluscos basados en estándares bacterianos y la presencia de virus entéricos (Le Guyader y col., 2000; Formiga-Cruz y col., 2002; Romalde y col., 2002; Myrmel y col, 2004; Le Guyader y col., 2006b; Croci y col., 2007; Svraka y col., 2007; Le Guyader y col., 2008; Lowther y col., 2008; Vilariño y col, 2009). Este hecho contribuye, junto con la ineficacia de los métodos de depuración a la hora de eliminar o reducir la carga viral en moluscos bivalvos (Baggi y col., 2001; Kingsley y Richards, 2003; Polo 2013), a que estos puedan constituir un peligro potencial para la salud pública.

Sin embargo, en el caso de HAV y NoV GI, el valor mayor de número de copias de RNA/g de tejido digestivo detectado se observó en muestras procedentes de zona B, tanto si analizamos los resultados aplicando los factores de corrección derivados de las eficiencias de extracción y de PCR como sin corregir. En el caso de NoV GII, el mayor número de copias de RNA/g de tejido digestivo detectado es similar en zonas B y C, tanto si analizamos los resultados aplicando los factores de corrección como sin aplicar.

El análisis filogenético de las cepas de HAV detectadas en la ría de Vigo y en la ría do Burgo reveló que todas ellas pertenecían al subgenotipo IB. El genotipo I es el de mayor prevalencia en todo el mundo, siendo el

subgenotipo IB menos abundante que el IA (Cristina y col., 2007). Los diferentes genotipos de HAV presentan un patrón de distribución geográfica muy bien definido (Rodriges y col., 2007). En América Central y América del Sur todas las cepas de HAV pertenecen al subgenotipo IA, excepto en el caso de Brasil, en el que existe una cocirculación de los subgenotipos IA y IB (de Paula y col., 2003). Además, el genotipo IB ha sido detectado en muestras de moluscos importadas desde Perú a otros países (Sánchez y col., 2002). Este hecho sugiere la presencia de este subgenotipo en la población de otros países da América del Sur, además de Brasil. En América del Norte, China y Vietnam se encuentra una cocirulación de cepas de HAV pertenecientes a los subgenotipos IA y IB (Cristina y col., 2007).

En Europa, aunque se han encontrado cepas de HAV pertenecientes a diversos genotipos posiblemente procedentes de otras regiones (Costa-Mattioli y col., 2003), existe sobre todo una cocirculación de los subgenotipos IA y IB. La existencia de un único genotipo o subgenotipo en una región geográfica determinada se asocia con una circulación endémica de HAV en la población (Mbayed y col., 2002). El hecho de que en Galicia se detecten únicamente cepas pertenecientes al subgenotipo IB coincide con los resultados obtenidos por Mesquita y col. (2011) para la caracterización de cepas de HAV detectadas en moluscos procedentes del norte y centro de Portugal, lo que podría estar indicando una circulación endémica del subgenotipo IB en el oeste de la Península Ibérica.

Los porcentajes de similitud del concatenado de las secuencias de VP1-P2A variaron entre el 87,5 % y el 100% en el caso de las cepas de HAV detectadas en la ría de Vigo y entre 99,1% y el 100% en el caso de las cepas de HAV detectadas en la ría do Burgo. El hecho de que las diferencias nucleotídicas observadas entre las secuencias de las cepas de

HAV de las procedentes de la ría de Vigo sean tan elevadas (superiores al 7,5%) podría deberse a las diferencias metodológicas durante la secuenciación de este grupo de cepas.

El análisis filogenético de las cepas de NoV detectadas en muestras de moluscos procedentes de la ría de Vigo reveló que todas ellas pertenecían al genogrupo GII. El 75% de las cepas se caracterizaron como GII.4 y el 25% restante como GII.3. En el caso de las cepas procedentes de la ría do Burgo, el 37,5% se caracterizó como NoV GI y el 62,5% como NoV GII. Todas las cepas del genogrupo GI pertenecían al genotipo GI.4. De las cepas caracterizadas como GII, el 80% pertenecía al genotipo GII.4 y el 20% al genotipo GII.6. La mayor tasa de detección de NoV GII.4 en las muestras de moluscos analizadas coincide con la situación observada en la población, en la que NoV GII.4 ha sido el genogrupo predominante durante los últimos años (Kanerva y col., 2009; Le Guyader y col., 2010). Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en muestras clínicas revelan que aparentemente existe una dominancia de GII respecto a GI en todo el mundo (Victoria y col., 2009a), sugiriendo que la mayor carga viral de GII en las heces de los individuos afectados facilita la transmisión de este genotipo. Sin embargo, es importante destacar que NoV GI tiene una mayor resistencia a los tratamientos de las aguas residuales, por lo que frecuentemente este genotipo se encuentra en moluscos contaminados, estando implicado en brotes de gastroenteritis asociados al consumo de estos alimentos (Le Guyader y col., 2006b; da Silva y col., 2007).

La diversidad existente entre las cepas de NoV es extremadamente elevada (Zheng y col., 2006), lo que supone un problema a la hora de diseñar los cebadores y las sondas para la detección mediante RT-qPCR. La elección inadecuada de cebadores y sondas podría originar resultados falsos negativos o sesgados en cuanto a la detección de cepas de NoV

presentes en una muestra. Por este motivo, la diversidad existente entre las cepas de NoV GI y GII implica la necesidad de realizar dos ensayos independientes para la detección de cepas de cada genotipo (Lees, 2010). A diferencia de lo que ocurre con HAV, en el que los estándares propuestos por el TAG-CEN especifican que los cebadores y sondas empleados en la detección del virus deben estar diseñados en la región conservada 5' no codificante, en el caso de NoV se emplea la región de unión del ORF1-ORF2. El estudio de Kageyama y col. (2003) reveló que esta región del genoma estaba extremadamente conservada y por tanto apta para el desarrollo de cebadores y sondas para la detección del virus. En las publicaciones posteriores (Jothikumar y col., 2005; Loisy y col., 2005; da Silva y col., 2007; Svraka y col., 2007) se eligió esta región para la detección, con modificaciones mínimas del protocolo original. Actualmente, el TAG-CEN (Lees y col., 2010) propone el uso de esta región como parte de la estandarización de la detección de NoV en muestras de moluscos bivalvos, según el protocolo descrito por Le Guyader y col. (2009). Para confirmar la especificidad de la RT-qPCR, el TAG-CEN realizó la secuenciación de varios amplicones (10 para NoV GI y 14 para NoV GII) y, en todos los casos, se encontró una secuencia específica de NoV que coincidía con el genotipo asignado por la RT-qPCR, confirmando la especificidad de la técnica. Sin embargo, y a pesar de emplear el protocolo propuesto por el TAG-CEN, los resultados obtenidos para el análisis de las cepas de NoV detectadas en la ría de Vigo y en la ría do Burgo mostraron que no en todos los casos el genotipo asignado a las distintas cepas mediante la detección por RT-qPCR coincidió con el obtenido mediante el análisis de las secuencias. El resultado obtenido pone de manifiesto que este protocolo resulta específico para la detección de

NoV pero que la asignación de las cepas detectadas a los genogrupos GI y GII ha de ser comprobada mediante secuenciación.

Por último, los resultados obtenidos de la detección de NoV y HAV en muestras de moluscos procedentes de distintas zonas de muestreo de la ría do Burgo ponen de manifiesto la necesidad de incluir análisis virológicos en los estudios sanitarios realizados para la clasificación de las zonas de crecimiento de moluscos y en los moluscos antes de salir al mercado.

5. DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS CLÍNICAS

5. DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y VIRUS DE LA HEPATITIS A EN MUESTRAS CLÍNICAS

La gastroenteritis infecciosa representa un problema de salud pública en todo el mundo. En países en vías de desarrollo, la gastroenteritis se encuentra asociada a una elevada tasa de mortalidad (O´Ryan y col., 2005; Parashar y col., 2003b). En países desarrollados representa una causa frecuente de hospitalización, especialmente en niños, en los que se observa la mayor incidencia de la enfermedad (Patel y col., 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) estima que se producen 4,6 billones de episodios de gastroenteritis cada año, produciéndose aproximadamente 2,2 millones de muertes asociadas a dicha enfermedad.

Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintos países europeos han proporcionado datos sobre la incidencia de la gastroenteritis en estas regiones. En Reino Unido, la tasa de incidencia de gastroenteritis observada entre los años 1993 y 1996 fue de 3.300 casos/100.000 habitantes al año (Wheeler y col., 1999), aumentando en 2008 y 2009 a 24.700 casos/100.000 habitantes al año (Tam y col., 2012). En los Países Bajos, la incidencia de gastroenteritis en el año 1999 fue de 800 casos/100.000 habitantes al año (de Wit y col., 2001b), mientras que en 2004 la incidencia fue de 2.900/100.000 habitantes al año (Kemmeren y col., 2006). En Cataluña, la tasa de incidencia durante el año 2006 fue de 3.661 casos /100.000 personas al año.

Las causas de la gastroenteritis infecciosa incluyen una gran variedad de bacterias, parásitos y virus. Los estudios realizados sobre esta enfermedad rara vez analizan todas las etiologías exhaustivamente, e incluso en aquellos que lo hacen, en el 40-50% de los casos el agente etiológico continúa siendo desconocido (Patel y col., 2009). Los patógenos

bacterianos más frecuentes en casos de gastroenteritis infecciosa son *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. (Jewkes y col., 1981; Watson y col., 1986; Petersen y col., 1996; Prats y col., 1997; Jansen y col., 2008). De los patógenos virales causantes de gastroenteritis, los NoV están reconocidos como la principal causa de brotes en todo el mundo. Los NoV son el agente causal de más del 90% de los brotes de etiología vírica y aproximadamente del 50% de los casos totales (Froggatt y col., 2004; Lopman y col., 2004b). Desde finales de la década de los noventa, debido al desarrollo de la PCR, se ha demostrado que los NoV son también una de las causas más comunes de casos esporádicos de gastroenteritis en personas de todas las edades a nivel mundial (Parashar y col*.,* 2004; Kirkwood y col., 2005; Patel y col., 2008; Hall y col., 2011). Además de NoV, otros virus frecuentemente asociados con gastroenteritis son RV grupo A, AdV y AsV, que afectan generalmente a niños.

Se estima que diez millones de personas resultan infectadas por HAV cada año en el mundo (Jacobsen y col., 2010). La tasa de incidencia de la enfermedad se encuentra relacionada con factores socioeconómicos y con el acceso a agua potable. En Europa se produjeron un total de 17.370 casos confirmados de hepatitis A durante el año 2009, lo que supone una tasa de incidencia de 3,44 casos/100.000 habitantes al año. Esta tasa es ligeramente superior a la observada durante 2007 (2,79/100.000) y 2008 (3,34/100.000). Los países en los que se registraron más casos fueron Letonia (101/100.000), Eslovaquia (27/100.000), Rumanía (17/100.000), Bulgaria (14/100.000) y República Checa (11/100.000). En el resto de países, la tasa de incidencia de casos confirmados fue menor de 5 casos/100.000 habitantes al año (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades, ECDC, del inglés *European Center for Desease Prevention and Control,* 2011).

La mayoría de casos de hepatitis A registrados en la UE durante el año 2009 fueron de origen endémico. En el caso de España y Malta, el 100% de los casos fueron de origen endémico, en Reino Unido el 94%, en Hungría el 91%, y en Grecia el 90%. En Irlanda, Francia, Alemania, Eslovenia e Islandia, el porcentaje de casos internos varió entre el 67% y el 74%. En los Países Bajos fue del 54%. A pesar de que, como se ha mencionado anteriormente, la tasa de seroprevalencia en Europa es muy baja (Jacobsen y col., 2010), estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de la hepatitis A como enfermedad endémica en la UE (ECDC, 2011).

5.1. Resultados

5.1.1. Análisis bacteriológicos

A las 2.643 muestras clínicas procedentes de pacientes afectados de gastroenteritis incluidas en este estudio se les realizaron análisis bacteriológicos, los cuales se llevaron a cabo en el Hospital Clínico Universitario de A Coruña (Galicia). Los resultados de dichos análisis mostraron que *Campylobacter* spp. fue el patógeno bacteriano causante de gastroenteritis detectado de forma más frecuente en muestras procedentes de pacientes de todas las edades. Este patógeno se detectó en 145 (5,5%) de los casos analizados. La mayor prevalencia se observó en pacientes menores de 18 años, en los que *Campylobacter* spp. se detectó en 117 (8,3%) de las muestras. La presencia de *Salmonella* spp. se observó en 94 (3,5%) de los casos de gastroenteritis. En pacientes menores de 12 años, este patógeno se detectó en un total de 73 (6,6%) muestras, mientras que en pacientes entre 13 y 18 años, no se detectó *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras. *Aeromonas* spp., *Yersinia enterocolítica*, y *Bacillus cereus* se

detectaron en 20 (0,7%), 15 (0,6%) y 6 (0,2%) muestras, respectivamente.

Los otros patógenos bacterianos analizados fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella* spp., *Archobacter* spp. y *Pseudomonas aeuruginosa*. En total, estos 5 patógenos se detectaron en 22 (0,8%) de las muestras. En la Tabla 5.1 se indica el número de muestras correspondientes a los distintos grupo de edad en las que se detectó cada uno de los patógenos analizados. En 31 (1,2%) de las muestras examinadas se observó disbacteriosis, es decir, un desplazamiento de microbiota normal del individuo (Tabla 5.1).

Ocho de las muestras procedían de pacientes inmunodeprimidos. En estas muestras se realizaron además análisis parasitológicos. Las 8 muestras analizadas fueron positivas para *Cryptosporidium spp*. (Tabla 5.1).

No se observó un patrón estacional en la detección de ninguno de los patógenos bacterianos y parasitarios analizados, excepto en el caso de *Salmonella* spp. (Fig. 5.1). El mayor número de casos en los que se detectó la presencia de esta bacteria en muestras de heces de pacientes afectados de gastroenteritis ocurrieron durante los meses de julio y agosto. Se observó además un pequeño aumento en el porcentaje de muestras en el que se detectó este patógeno durante el mes de noviembre.

Tabla 5.1: Número de muestras pertenecientes a los distintos grupos de edad en las que se detectó la presencia de los diferentes patógenos bacterianos analizados

	No. muestras	***Campylobacter***	***Salmonella***	***Aeromonas* spp.**	***Yersinia enterocolitica***	***Bacillus cereus***	**Otras[a]**	**Disbacteriosis**	***Cryptosporidium* spp.[b]**
0-2 años	895	76 (8,5%)	54 (6,0%)	6 (0,7%)	11 (1,2%)	1 (0,1%)	6 (0,7%)	7 (0,8%)	2 (100%)
3-5 años	198	18 (9,1%)	7 (3,5%)	2 (1%)	0	0	1 (0,5%)	2 (1%)	3 (100%)
6-12 años	243	16 (6,6%)	12 (4,9%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)	0	0	0	0
13-18 años	70	7 (10%)	0	0	0	0	0	2 (2,8%)	0
19-59 años	637	15 (2,3%)	9 (1,4%)	4 (0,6%)	2 (0,3%)	4 (0,6%)	2 (0,3%)	7 (1,2%)	3 (100%)
> 60 años	593	13 (2,2%)	12 (2,%)	7 (1,2%)	1 (0,2%)	1(0,17%)	13 (2,2%)	13 (2,2%)	0
desconocido	7	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2643	145 (5,5%)	94 (3,5%)	20 (0,7%)	15 (0,6%)	6 (0,2%)	22 (0,8%)	31 (1,2%)	8 (100%)

[a] *S. Aureus, E. Coli O157:H7, Shigella* spp.*, Arcobacter* spp. y *P. Aeruginosa*.
[b] La tasa de detección de *Criptosporidium* spp. se calculó en 8 muestras pertenecientes a pacientes inmunodeprimidos

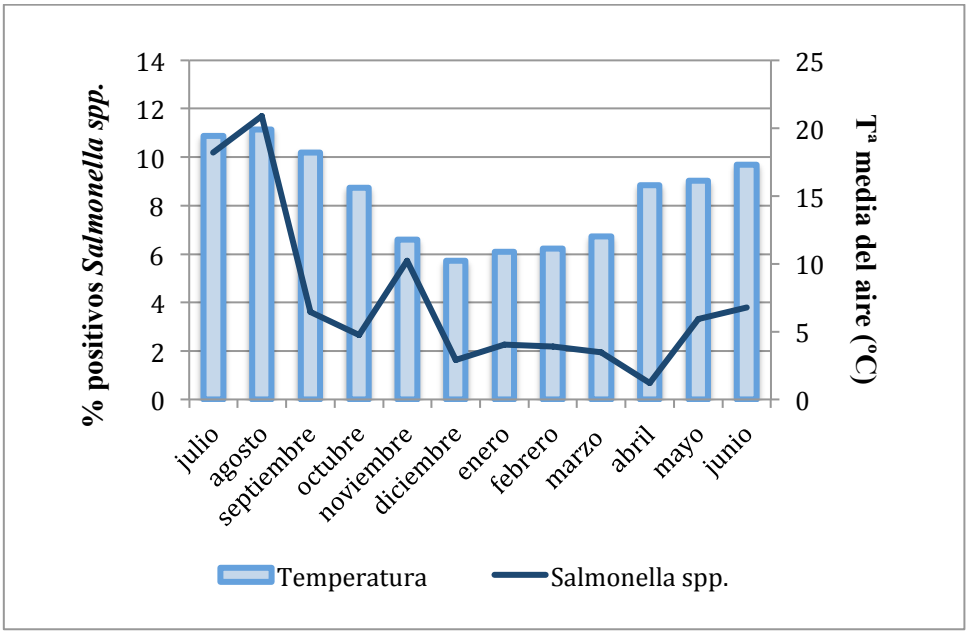


Figura 5.1: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para *Salmonella* spp. y la temperatura ambiental (ºC). Datos de las temperaturas medias mensuales obtenido de www.meteogalicia.es

5.1.2. Análisis virológicos

5.1.2.1. Rotavirus y Adenovirus

En los casos en los que la Unidad de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de A Coruña lo requirió, se llevó a cabo el análisis de RV y AdV mediante EIA. En total, se analizaron 125 muestras de pacientes menores de 18 años: 112 muestras de pacientes entre 0-2 años (23,4% de las muestras totales recolectadas en pacientes pertenecientes a ese grupo de edad), 6 (4,9%) de pacientes entre 3-5 años, 6 (4,2%) de pacientes entre 6-12 años y 1 (2,5%) de pacientes entre 13-18 años.

La presencia de RV se detectó en 34 (27,2%) de las muestras examinadas, mientras que AdV se detectó en 5 (4%) de ellas. Todas las muestras positivas para ambos virus pertenecían a pacientes de entre 0-2

años (Tabla 5.2). En 4 de estas muestras, se detectó infección mixta de RV y AdV.

Las muestras analizadas para determinar la presencia de RV y AdV se habían recogido durante los meses de enero a junio de 2011. Las muestras positivas para RV y AdV se detectaron en los meses de febrero, marzo, abril y mayo. En la Tabla 5.3 se resume el número de muestras analizadas para determinar la presencia de ambos virus durante cada mes y el porcentaje de muestras positivas detectadas.

Tras realizar los análisis bacteriológicos, parasitológicos y virológicos que de forma rutinaria se realizan en casos de gastroenteritis, la posible etiología de la enfermedad sólo pudo ser determinada en 380 (14,4%) de las 2.643 muestras incluidas en el estudio.

Tabla 5.2: Distribución de los positivos de RV y AdV en los distintos grupos de edad establecidos.

Grupos de edad	Nº Total de Muestras	Positivos Rotavirus	Positivos Adenovirus
0-2 años	112	34 (30,3%)	5 (4,5%)
3-5años	6	0	0
6-12 años	6	0	0
13-18años	1	0	0
19-59 años	0	0	0
> 60 años	0	0	0
desconocido	0	0	0
TOTAL	125	34 (27,2%)	5 (4%)

Tabla 5.3: Distribución de los positivos de RV y AdV durante los distintos meses.

Mes	Nº Total de Muestras	Positivos Rotavirus	Positivos Adenovirus
Enero	3	0	0
Febrero	38	8 (21%)	0
Marzo	19	9 (47,3%)	1 (5,3%)
Abril	34	13 (28,2%)	1 (2,9%)
Mayo	15	4 (26,7%)	3 (20%)
Junio	16	0	0
TOTAL	125	34 (27,2%)	5 (4%)

5.1.2.2. Virus de la hepatitis A

Una vez en el laboratorio de la USC, las heces se analizaron para determinar la presencia de HAV en las mismas. En total, se analizaron 1.183 muestras, correspondientes a los 6 primeros meses del muestreo (junio 2010-diciembre 2010). En todos los casos se calcularon las eficiencias de extracción y de RT-qPCR. En 258 muestras, la eficiencia de extracción fue aceptable (1-10%) y, en las otras 925, se consideró como buena (>10%). La eficiencia de RT-qPCR obtenida para HAV fue aceptable (1-10%) en 118 muestras y buena (>10%) en 1.065 muestras. La presencia de HAV se detectó en un total de 3 (0,2%) muestras. Una de las muestras pertenecía a un paciente del grupo de edad entre 0-2 años y fue

detectada durante el mes de septiembre, con un nivel de cuantificación de $8,3x10^9$ copias de RNA/g de heces. Otra muestra pertenecía al grupo de entre 3-5 años, siendo detectada en el mes de octubre. El nivel de cuantificación de esta muestra fue de $2,9x10^6$ copias de RNA/g de heces. La tercera muestra positiva pertenecía al grupo de entre 19-59 años, siendo detectada durante el mes de noviembre con un nivel de cuantificación de $3,1x10^7$ copias de RNA/g de heces (Tablas 5.4 y 5.5).

Tabla 5.4: Distribución de los positivos de HAV en los distintos grupos de edad establecidos.

Grupos de edad	**Nº Total de Muestras**	**Positivos HAV**	**Copias de RNA/gr de heces**
0-2 años	416	1 (0,2%)	$8,3x10^9$
3-5años	76	1 (1,3%)	$2,9x10^6$
6-12 años	102	0	---
13-18años	31	0	---
19-59 años	287	1 (0,3%)	$3,1x10^7$
> 60 años	260	0	---
desconocido	11	0	---
TOTAL	1183	3 (0,2%)	---

Tabla 5.5: Distribución de los positivos de HAV durante los distintos meses.

Meses	Nº Total de Muestras	Positivos HAV
julio	38	0
agosto	215	0
septiembre	275	1 (0,4%)
octubre	222	1 (0,4%)
noviembre	191	1 (0,5%)
diciembre	242	0
TOTAL	1183	3 (0,2%)

5.1.2.3. Norovirus

Con el fin de determinar el agente etiológico de la enfermedad en un mayor número de muestras y determinar el papel de los NoV en el desarrollo de la misma, se llevó a cabo en todas las muestras la detección de este virus mediante RT-qPCR, empleando cebadores y sondas TaqMan específicos para la detección de GI y GII. En todos los casos, se calcularon las eficiencias de extracción y de RT-qPCR. En 679 muestras, la eficiencia de extracción fue aceptable (1-10%) y en las otras 1.964, fue considerada como buena (>10%). La eficiencia de RT-qPCR obtenida empleando los cebadores y la sonda diseñados para la amplificación de GI fue aceptable (1-10%) en 105 muestras y buena (>10%) en 2.538 muestras. En el caso de

los cebadores y sonda diseñados para la amplificación de GII, la eficiencia de RT-qPCR fue aceptable en 161 muestras y buena en 2.482 muestras.

La presencia de NoV se detectó en un total de 747 (28,3%) de las muestras (Tabla 5.6). En 416 (15,7%), la amplificación de NoV se obtuvo con la pareja de cebadores y la sonda diseñados para GI. En 278 (10,5%) muestras, NoV se detectó con la pareja de cebadores y la sonda diseñados para GII. En 53 (2%) muestras, NoV se detectó con ambas parejas de cebadores y sondas.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de NoV en los distintos grupos de edad establecidos. Los resultados obtenidos para la detección de NoV mostraron que es el patógeno es la causa más común de gastroenteritis en pacientes de todas las edades en el área sanitaria de A Coruña. En niños menores de 2 años, la presencia de NoV se detectó en 31,4% de los casos. En el resto de grupos de edad, NoV se detectó en más del 20,5% de los pacientes de cada grupo (Tabla 5.6).

La tasa de detección de NoV fue mayor en los meses de octubre a enero. En estos meses las temperaturas fueron más bajas y se registraron las mayores lluvias (Tabla 5.7). Además, se observó un notable aumento en la tasa de detección de NoV durante el mes de abril (Figura 5.2; Figura 5.3).

Tabla 5.6: Distribución de los positivos de NoV detectados con ambos conjuntos de cebadores y sondas, así como el número total de muestras positivas para NoV, en los distintos grupos de edad establecidos.

Grupos de edad	Nº Muestras Totales	Detección con cebadores/sonda NoV GI	Detección con cebadores/sonda NoV GII	Detección con cebadores/sonda NoV GI/GII	Total de muestras positivas NoV	% total muestras positivas NoV
0-2 años	895	142	118	21	281	31,4
3-5años	198	25	14	2	41	20,7
6-12 años	243	36	33	7	76	31,3
13-18años	70	9	10	1	20	28,6
19-59 años	637	117	53	10	180	28,2
> 60 años	593	85	49	12	146	24,6
desconocido	7	2	1	0	3	42,8
TOTAL	2643	416	278	53	747	28,3

Tabla 5.7: Distribución de los positivos de NoV detectados en los distintos meses empleando ambos conjuntos de cebadores y sondas. Se indica también la temperatura media de aire (ºC) y las lluvias (L/m^2) registradas durante cada mes.

Meses	Nº Muestras Totales	Detección con cebadores/sonda NoV GI	Detección con cebadores/sonda NoV GII	Detección con cebadores/sonda NoV GI/GII	Total de muestras positivas NoV	% total muestras positivas NoV	Temperatura media del aire (ºC)	Lluvia (L/m^2)
julio	38	4	2	1	7	18,4	19,4	27
agosto	215	31	10	1	42	19,5	19,9	7,3
septiembre	275	44	14	2	60	21,8	18,2	26,9
octubre	222	39	23	8	70	31,5	15,6	126,5
noviembre	191	57	11	10	78	40,8	11,8	186,6
diciembre	242	45	38	9	92	38	10,2	129,4
enero	218	84	8	5	97	44,5	10,9	96,8
febrero	269	19	35	4	58	21,6	11,1	90,8
Marzo	300	19	36	2	57	19	12	71,6
abril	298	31	73	9	113	37,9	15,8	68,6
mayo	202	25	19	1	45	22,3	16,1	17,7
junio	173	18	9	1	28	16,2	17,3	10,6
TOTAL	2643	416	278	53	747	28,3	----	----

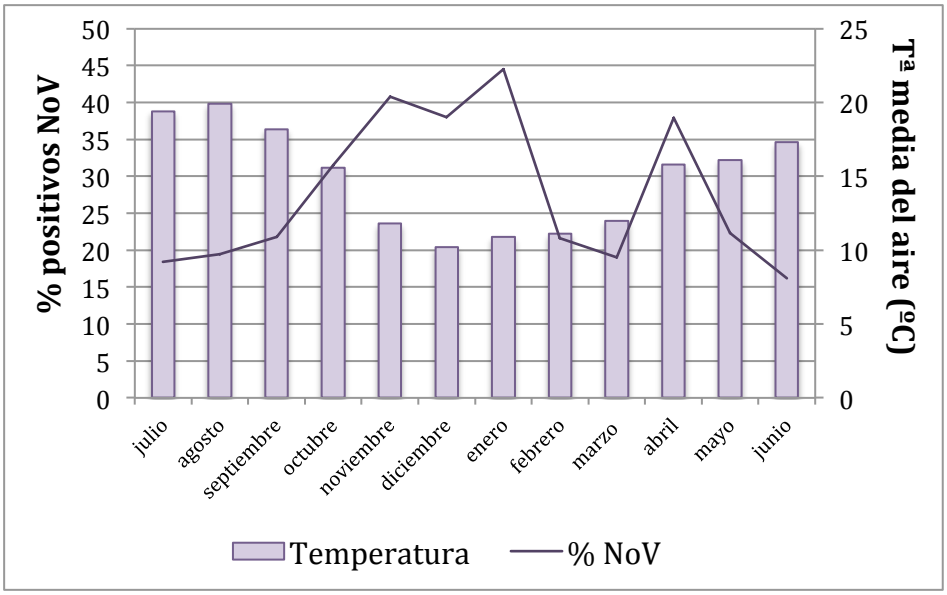


Figura 5.2: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para NoV y la temperatura ambiental (ºC). Datos de las temperaturas medias mensuales obtenido de www.meteogalicia.es

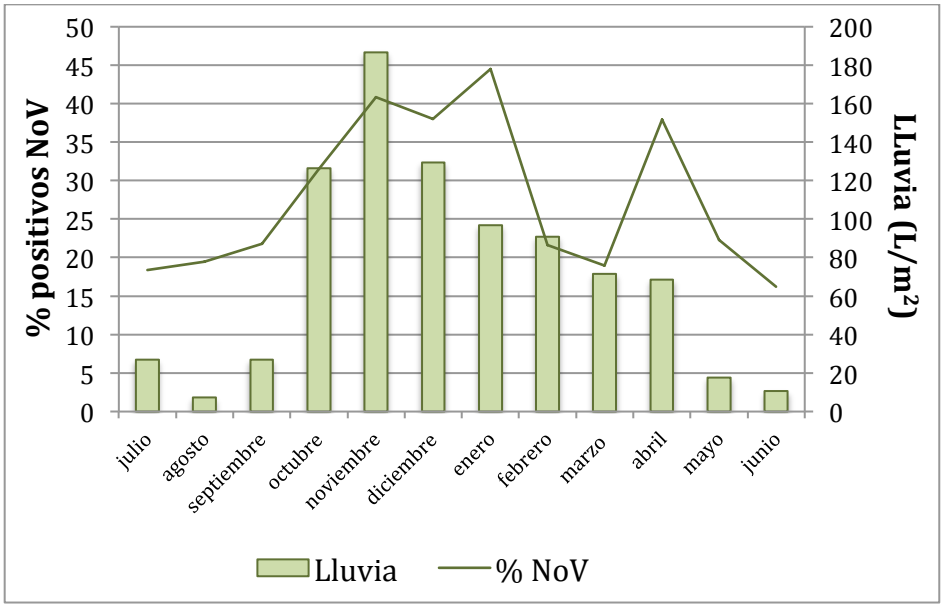


Figura 5.3: Relación entre el porcentaje de muestras positivas para NoV y las lluvias (L/m^2). Datos de las lluvias mensuales obtenidos de www.meteogalicia.es

5.1.2.4. Infecciones Múltiples

En diversas muestras se observó la presencia de infecciones mixtas producidas por NoV y patógenos bacterianos. La presencia de NoV se observó en 37 (25,5%) de las 145 muestras en las que previamente se había detectado *Campylobacter* spp. La mayor parte de las infecciones mixtas NoV-*Campylobacter* spp. se observaron en pacientes de entre 13 y 18 años (42,9%) y de entre 0 y 2 años (27,6%). En el resto de grupos de edad, las infecciones mixtas de ambos patógenos se observaron en un 25% de los casos, excepto en pacientes de entre 3 y 5 años, en los que solo se observó en un 11,1% de los casos (Tabla 5.8).

En el caso de las 94 muestras en las que se había detectado *Salmonella* spp., se observó la presencia de NoV en 18 (19,1%) de ellas. El mayor número de coinfecciones NoV-*Salmonella* spp. se detectó en pacientes de entre 19 y 59 años (33,3%). En pacientes de entre 6 y 12 años se detectó la coinfección de ambos patógenos en un 25% de las muestras, disminuyendo a un 18,5% en pacientes de 0-2 años (Tabla 5.8).

De las 71 muestras en las que se observó la presencia de otros patógenos bacterianos (*Aeromonas* spp., *Y. enterocolitica, E. coli* O157:H7, *B. cereus, S. aureus, P. aeruginosa, Shigella* spp. y *Arcobacter* spp.) se detectaron infecciones mixtas con NoV en el 29,6% de los casos. La mayoría de estas infecciones mixtas fueron en pacientes de 0 a 2 años y en pacientes mayores de 60 años (Tabla 5.8). Seis (30%) de las muestras positivas para *Aeromonas* spp. fueron también positivas para NoV. En 2 casos se detectó coinfección de *Aeromonas* spp.-*Campylobacter* spp. La presencia de *Y. enterocolitica* se observó en 15 muestras, detectándose NoV en 7 (46,6%) de ellas.

Tabla 5.8: Porcentajes de infecciones mixtas NoV-*Campylobacter*, NoV-*Salmonella* y NoVs-otros patógenos

	Grupos de edad (años)							
	0-2	**3-5**	**6-12**	**13-18**	**19-59**	**> 60**	**desconocido**	**TOTAL**
Nº muestras positivas *Campylobacter spp.*	76	18	16	7	15	13	0	145
Nº muestras positivas NoVs-*Campylobacter spp.*	21	2	4	3	4	3	0	37
% de coinfecciones	27,6	11,1	25	42,9	26,7	23,1	0	25,5
Nº muestras positivas *Salmonella spp.*	54	7	12	0	9	12	0	94
Nº muestras positivas NoVs-*Salmonella spp*	10	1	3	0	3	1	0	18
% de coinfecciones	18,5	14,3	25	0	33,3	8,3	0	19,1
Nº muestras positivas otros patógenos analizados (1)	26	6	2	0	15	22	0	71
Nº muestras positivas NoVs- otros patógenos	10	1	1	0	3	6	0	21
% de coinfecciones	38,4	16,7	50	0	20	27,3	0	29,6
Nº muestras positivas flora desplazada (disbacteriosis)	7	2	0	2	7	13	0	31
Nº muestras positivas NoV- disbacteriosis	1	1	0	0	0	4	0	6
% de coinfecciones	14,3	50	0	0	0	30,8	0	19,3

(1) *Aeromonas* spp., *Y. enterocolitica*, *E. coli* 057:H7, *B. cereus*, *S. aureus*, *Arcobacter* spp, *Shigella* spp., *P. aeruginosa* y *Cryptosporidium* spp.

Las infecciones mixtas con NoV también se detectaron en 4 (66,7%) y 1 (50%) de las muestras positivas para *B. cereus* y *S. aureus*, respectivamente. En el caso de *P. aeruginosa* en 3 (27,3%) de las 11 muestras positivas para este patógeno se observó también la presencia de NoV.

No se encontraron infecciones mixtas con NoV en los casos de *E. coli* O175:H7, *Shigella* spp. o *Arcobacter* spp. Tampoco se detectaron coinfecciones en el caso del parásito *Cryptosporidium* spp. En ningún caso de detectaron infecciones múltiples producidas por ambos genogrupos de NoV (GI, GII) y otra bacteria o parásito.

Tras realizar el análisis de NoV, y teniendo en cuenta las infecciones mixtas de NoV y otros patógenos bacterianos, la posible etiología de la enfermedad pudo ser determinada en un 39,5% de los casos (Figura 5.4).

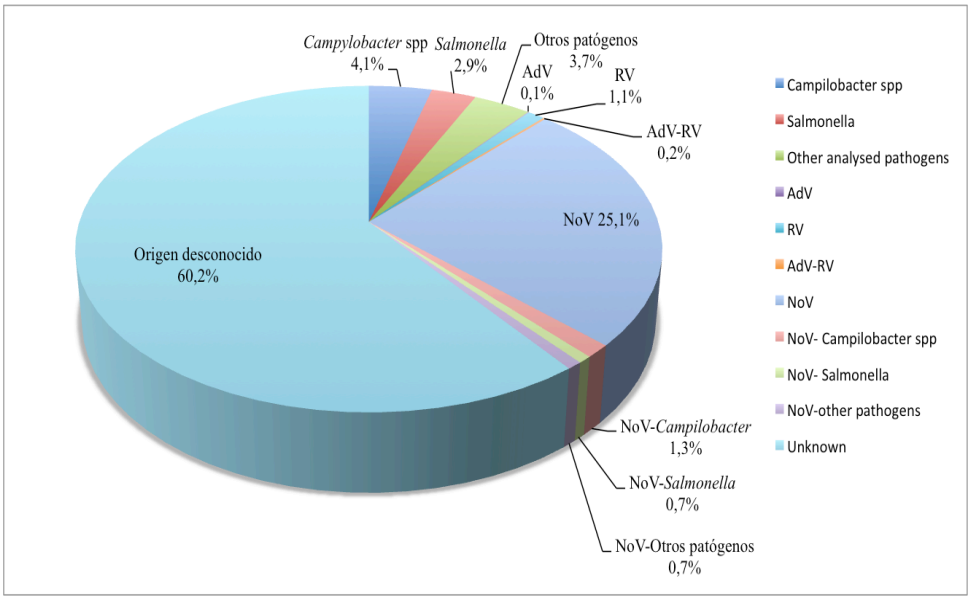


Figura 5.4: Porcentaje de muestras en las que se detectó la presencia de los diversos patógenos analizados, así como de las muestras en las que se detectaron coinfecciones.

Se calcularon los niveles de cuantificación de NoV excretados en las heces de los individuos afectados de gastroenteritis. Utilizando el conjunto de cebadores y sonda diseñados para la detección de NoV GI, los niveles de cuantificación detectados variaron entre $1{,}7x10^{4}$ y $1{,}7x10^{11}$ copias de

RNA/g de heces. La tasa media de cuantificación fue de $6,4x10^6$ copias de RNA/g de heces. En el caso de los NoV detectados con el conjunto de cebadores y sonda diseñados para NoV GII, los niveles de cuantificación observados variaron entre $1,4x10^4$ y $1,1x10^{12}$ copias de RNA/g de heces, con una tasa media de cuantificación de $2,4x10^{10}$ copias de RNA/g de heces. En la Tabla 5.9 se resumen los resultados de la tasa media de cuantificación en cada uno de los grupos de edad establecidos. No se observaron diferencias en los niveles de cuantificación entre las muestras en las que se detectó NoV y aquellas en las que se detectaron infecciones mixtas entre NoV y otro patógeno.

Tabla 5.9: Rangos de cuantificación (y desviación estándar) para NoV GI y NoV GII en cada grupo de edad analizado.

	NoV detectados con el conjunto de cebadores y sonda para GI		NoV detectados con el conjunto de cebadores y sonda para GII	
Grupo de edad	Q*	SD**	Q*	SD**
0-2 años	$1,5 \times 10^{10}$	17×10^{10}	2×10^{10}	8×10^{10}
3-5 años	$7,8 \times 10^{7}$	32×10^{7}	$5,2 \times 10^{9}$	$10,6 \times 10^{9}$
6-12 años	$7,9 \times 10^{8}$	31×10^{8}	$1,4 \times 10^{10}$	$7,1 \times 10^{10}$
13-18 años	$1,9 \times 10^{6}$	$2,4 \times 10^{6}$	$3,7 \times 10^{8}$	$7,6 \times 10^{8}$
19-59 años	$4,4 \times 10^{8}$	$22,7 \times 10^{8}$	2×10^{10}	$6,6 \times 10^{10}$
> 60 años	$4,9 \times 10^{9}$	$30,5 \times 10^{9}$	$6,3 \times 10^{10}$	$20,6 \times 10^{10}$
Total	$6,4 \times 10^{9}$	105×10^{9}	$2,4 \times 10^{10}$	$10,7 \times 10^{10}$

* Q, Valor medio de cuantificación (copias de RNA/g de heces)
** SD, desviación estándar

5.2. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio aportan nuevos datos sobre la etiología de la gastroenteritis aguda en pacientes en el área de A Coruña (Galicia).

Al igual que en otros estudios llevados a cabo en países industrializados (Jewkes y col., 1981; Watson y col., 1986; Petersen y col., 1996; Prats y col., 1997; Jansen y col., 2008; Huhulescu y col., 2009), los resultados obtenidos de los análisis bacterianos realizados mostraron que *Campylobacter* spp. es el agente bacteriano que se detecta con más frecuencia en pacientes con gastroenteritis, seguido de *Salmonella spp.* La campylobacteriosis es la enfermedad gastrointestinal de origen bacteriano más común en la UE. Durante el año 2009 se registraron 201.605 casos confirmados de esta enfermedad, siendo su incidencia de 53,07 casos /100.000 habitantes (ECDC, 2011). Los casos registrados de salmonelosis en la UE durante el año 2009 ascienden a un total 111.115. La tasa de incidencia de la enfermedad fue de 23,6 casos/100.000 habitantes, menor que la observada durante los 4 años anteriores (ECDC, 2011). A pesar de esta reducción en la incidencia de la enfermedad, la salmonelosis continua siendo una de las infecciones gastrointestinales más comunes en la UE. En general, la incidencia de la enfermedad aumenta notablemente durante los meses de verano, aunque en el año 2009 el incremento de casos de salmonelosis en estos meses fue menor que en años anteriores, probablemente debido a la disminución de los casos totales de la enfermedad respecto a años anteriores (ECDC, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con el patrón estacional descrito para este patógeno, aunque se observó un pequeños aumento en la detección del mismo durante el mes de noviembre. La ausencia de datos epidemiológicos

de los que disponemos dificulta la posibilidad de asociar este pico de detección con un brote de la enfermedad.

RV es el agente etiológico más común en casos de gastroenteritis en niños menores de 2 años (Parashar y col., 2003a). En este estudio, el análisis de RV se realizó en un total de 125 muestras procedentes principalmente de niños menores de esa edad, resultando positivas el 27,2% de ellas. En España, el calendario oficial de vacunación no incluye la vacuna contra RV como obligatoria, sino únicamente como recomendada. La eficacia y la efectividad de las vacunas contra RV se ha demostrado, desde su comercialización en 2006, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo (Soares-Weiser y col., 2012). Durante los últimos 6 años, más de 30 países han incluido la vacuna contra RV en sus calendarios de vacunación, lo que ha supuesto una disminución significativa del número de hospitalizaciones debido a la infección por RV, un descenso en la mortalidad debida a esta infección en muchos de esos países y una disminución en las tasas de infección nosocomial (Ogilvie y col., 2012). Además, se ha observado una disminución del riesgo de gastroenteritis causada por RV en grupos de niños mayores y adultos no vacunados, probablemente por efecto de la inmunidad de grupo (Lopman y col., 2012b; Glass, 2012).

En España, de las 2 vacunas registradas frente a rotavirus, la vacuna pentavalente (RotaTeq®) sigue siendo la única disponible actualmente en los canales de distribución de farmacias, según lo establecido en 2010 por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (AEMPS, 2010). En nuestro país, también se confirma la tendencia a una reducción significativa de las hospitalizaciones debidas a la infección por RV, con una relación directa entre el grado de cobertura y la reducción de los ingresos hospitalarios (Martinón-Torres y col., 2011; Castilla y col.,

2012). Sin embargo, y a pesar de que carecemos de datos sobre el estado de vacunación de los niños menores de 2 años atendidos en el CHUAC por gastroenteritis, la elevada tasa de detección de RV puede sugerir que la actual situación de esta vacuna como recomendada necesite ser revisada.

La presencia de HAV se detectó en el 0,2% de las muestras analizadas. Este resultado puede deberse a que la tasa de incidencia de HAV en España es muy baja (ECDC, 2011) y a las estrategias de vacunación de los principales grupos de riesgo. Además, las muestras de heces incluidas en este estudio pertenecen a pacientes afectados de gastroenteritis. Estas muestras se analizaron para determinar la presencia de HAV debido a que, ocasionalmente, la infección por este virus produce diarrea. Dada la baja tasa de detección observada durante los 6 primeros meses del estudio, no se continuó realizando los análisis para HAV durante los 6 meses posteriores.

Los patrones epidemiológicos de hepatitis A muestran una considerable variación entre los distintos países de la UE, posiblemente debido a las diferentes rutas de infección (ECDC, 2011). Además de la transmisión de HAV por el consumo de agua o alimentos contaminados, existen otros factores de riesgo con diferentes características en la transmisión de la enfermedad. En España, todas las comunidades autónomas, excepto Cataluña, Ceuta y Melilla, siguen una estrategia de vacunación contra la hepatitis A que se basa en la vacunación selectiva en grupos con riesgo incrementado, siguiendo las recomendaciones expresadas por la circular 15/98 de la Dirección General de Farmacia.

La vacunación está indicada en:

- Personas que viajan a zonas de alta o media endemicidad de hepatitis A, especialmente si han nacido con posterioridad a 1966 o se desplazan a zonas rurales o con condiciones higiénico-sanitarias

deficientes.

- Personas con procesos hepáticos crónicos, en tratamiento prolongado con fármacos hepatotóxicos, o con hepatitis B o C, que a pesar de no tener un mayor riesgo de infección, sí lo tienen de sufrir una hepatitis A fulminante.

- Pacientes hemofílicos que reciben hemoderivados y pacientes candidatos a trasplantes de órganos.

- Cuidadores o familiares en contacto directo con enfermos de hepatitis A.

- Personas con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

- Personas que presentan estilos de vida que suponen un mayor riesgo de infección, por ejemplo, usuarios de drogas por vía parenteral.

- Además, se recomienda la vacunación en determinadas situaciones: manipuladores de alimentos, personal que trabaja en guarderías infantiles y personal sanitario de instituciones asistenciales.

De las tres muestras positivas para HAV, dos de ellas pertenecían a pacientes de 1 y 3 años, respectivamente. La otra muestra procedía de un paciente del grupo de edad de entre 19-59 años. La ausencia de datos epidemiológicos dificulta la posibilidad de determinar la vía de transmisión. Sin embargo, es importante destacar el hecho de que, en España, el papel de las guarderías en la difusión HAV está subestimado. Las guarderías que atienden a niños con pañales tienen más probabilidad de experimentar brotes de esta enfermedad. Por esta razón, y según el Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría (AEP) (1998), los niños mayores de 12 meses que acuden a guardería deberían beneficiarse de la administración de la vacuna contra la hepatitis A (Moreno-Pérez y col., 2013).

El papel de NoV como causa de gastroenteritis en pacientes de todas la edades está ampliamente documentado (Parashar y col., 2004; Kirkwood y col., 2005; Patel y col., 2008). El posible agente etiológico de la enfermedad pudo ser determinado en el 39,5% de los casos de gastroenteritis analizados. En el 28,3% de las muestras, se observó la presencia de NoV, siendo el patógeno detectado más frecuentemente en todos los grupos de edad. Este resultado coincide con los obtenidos en otros estudios. Karsten y col. (2009) determinaron la etiología de la enfermedad en un 35% de las muestras procedentes de 1.086 pacientes de todas la edades, recolectadas durante el año 2004 en una zona rural y otra urbana de Alemania. La presencia de patógenos virales se observó en un número mayor de casos que los bacterianos, siendo NoV el patógeno más frecuente, detectado en un 16% de los casos. Por otro lado, Hall y col. (2011), analizando 572 muestras de pacientes afectados de gastroenteritis en Georgia (EEUU), determinaron que en el 24% de los casos se trataba de una etiología vírica, siendo el 12% de ellos causados por NoV.

El análisis temporal de la prevalencia de NoV indica que el mayor número de casos de gastroenteritis causada por NoV ocurrieron durante los meses de octubre a enero. Estos datos coinciden con lo establecido en estudios previos, en los que se demuestra un predominio de la gastroenteritis asociada a NoV durante los meses fríos del año. El mes en el que se producen más casos puede variar, pero todos los estudios de vigilancia realizados muestran que el número de infecciones de gastroenteritis presentan su punto más bajo en los meses cálidos. Estos resultados son independientes de los diferentes parámetros del estudio, es decir, si se analizan brotes o casos esporádicos, la edad de los pacientes o los métodos de detección empleados (Mounts y col., 2000). Es importante destacar el aumento del número de casos registrado durante el mes de abril,

hecho que podría estar relacionado con un brote de la enfermedad. Sin embargo, la ausencia de datos epidemiológicos recogidos en estos pacientes impide relacionar casos entre sí y, por tanto, confirmar dicho brote.

En el 15,7% de las muestras, la detección de NoV se obtuvo empleando el conjunto de cebadores y sondas diseñados para GI; en el 10,5% de las muestras, NoV se detectó con el conjunto de cebadores y sondas diseñados para GII y en el 2% de las muestras, con ambos conjuntos de cebadores y sondas. Este resultado no coincide con lo publicado en otros estudios, en los que se muestra un aparente dominio de las cepas de NoV GII sobre las cepas de NoV GI en todo el mundo (Victoria y col., 2009a; Hall y col., 2011). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente en el capitulo 4 de esta memoria, los resultados obtenidos para el análisis de las cepas de NoV detectadas en moluscos de la ría de Vigo y de la ría do Burgo mostraron que no en todos los casos el genogrupo asignado a las distintas cepas mediante la detección por RT-qPCR coincidía con el obtenido mediante el análisis de las secuencias, por lo que el genotipado de las cepas detectadas en muestras clínicas sería necesario para determinar la tasa de detección de ambos genotipos.

Se observaron infecciones mixtas con NoV en el 20% de las muestras en las que previamente se había detectado algún patógeno bacteriano. Aunque existen estudios que enfatizan la importancia de las infecciones concomitantes en niños con gastroenteritis, los datos sobre coinfecciones en adultos hospitalizados por esta enfermedad son escasos, dado que las infecciones duales en este sector de la población no han sido investigadas de manera sistemática (Jansen y col., 2008). Además, la interpretación de los datos sobre las infecciones mixtas virus-bacteria es complicada, dado que en muchos casos uno de los potenciales

enteropatógenos puede no estar contribuyendo etiológicamente a la enfermedad. Sin embargo, se ha sugerido que en los casos en los que ambos patógenos contribuyen al desarrollo de la gastroenteritis en adultos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían ser más severas (Jansen y col., 2008).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de NoV en las heces de pacientes afectados de gastroenteritis apoyan los resultados obtenidos en estudios previos, en los que se observó que la cantidad media de NoV excretada en heces era de 9,5 x 10^{10} copias de RNA/ g (Atmar y col., 2008). No se encontró ninguna relación entre los casos de gastroenteritis en los que se detectó infección mixta y una excreción menor de NoV en heces.

El porcentaje de pacientes en los que no se detectó la presencia de ningún patógeno fue del 60,5%. Es importante destacar que es muy probable que algunos de estos casos fuesen de naturaleza no infecciosa, dado que, clínicamente, no se pude diferenciar entre gastroenteritis infecciosa y no infecciosa. Además, la gastroenteritis podría estar producida por otros microorganismos no incluidos en este estudio o por una infección causada por otro tipo de patógeno distinto de los enteropatógenos, como por ejemplo el virus de la gripe (de Wit y col., 2001b). La presencia en las muestras de otros virus entéricos causantes de gastroenteritis, como astrovirus o sapovirus, está siendo actualmente analizada en nuestro laboratorio.

Aunque existen diversos estudios realizados acerca de brotes de gastroenteritis ocurridos en España (Buesa y col., 2008; Torner y col., 2008; Barrabeig y col., 2010), este es el primer estudio llevado a cabo de manera sistemática en Galicia, y según nuestro conocimiento en España, con el fin de determinar el papel de diversos patógenos causantes de gastroenteritis en el desarrollo de la enfermedad. Los resultados obtenidos

muestran que NoV es la principal causa de gastroenteritis en pacientes de todas la edades, siendo detectado en un número de casos mucho mayor que cualquier otro patógeno causante de la enfermedad. Este hecho pone de manifiesto que realizar únicamente análisis bacteriológicos de manera rutinaria en casos de gastroenteritis aguda resulta inadecuado. Además, el que no se realice el diagnóstico de NoV de forma rutinaria contribuye a infravalorar la importancia de este virus en el desarrollo de gastroenteritis, especialmente en casos esporádicos. El desarrollo de ensayos clínicos sensibles y económicos para la identificación de patógenos virales como NoV, así como su uso universal, supondrían una ayuda a la hora de diagnosticar los casos individuales de gastroenteritis, facilitando la gestión del riesgo para la salud pública que pueden suponer determinados pacientes. Además, los análisis rutinarios aportarían datos sobre la incidencia y epidemiología de la enfermedad.

6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE NOROVIRUS EN GALICIA

6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE NOROVIRUS EN GALICIA

De los genogrupos de NoV que afectan a humanos, el genogrupo GII es clínicamente el más significativo. Este genogrupo es el de mayor prevalencia y, en comparación con otros, el que con más frecuencia se encuentra asociado a brotes de la enfermedad (Bull y col., 2010). Dentro del genogrupo GII, el genotipo GII.4 es el más relevante, dado que el 62% de los brotes de gastroenteritis a nivel mundial están causados por cepas de NoV pertenecientes a este genotipo (Tan y Jiang, 2005; Siebenga y col., 2007b).

La elevada incidencia de las infecciones por NoV parece estar relacionada con la aparición secuencial y la rápida expansión de nuevas variantes que evolucionan por deriva génica del gen de la cápside o por eventos de recombinación (Bull y col., 2005, 2007, 2010; Siebenga y col., 2007b). Durante los últimos años, se ha incrementado de forma notable el estudio de las nuevas variantes de NoV, especialmente de las pertenecientes a GII.4. La clasificación de estas nuevas variantes de GII.4 se basa en la presencia de variaciones aminoacídicas en el gen VP1 que supongan una diferencia >5% respecto a otras cepas de GII.4 (Bull y col., 2006; Zheng y col., 2010). La primera vez que se observó una variante de NoV GII.4 con carácter pandémico fue durante el invierno de 1995-1996. Esta variante se denominó US 95/96 (Vinjé y col., 1997) y se detectó en brotes de la enfermedad durante los 7 años siguientes. En el año 2002, se detectó una nueva variante de NoV GII.4, denominada Farmington Hills, que se convirtió en la predominante durante los siguientes dos años (Widdowson y col., 2004). La principal característica de esta cepa era la inserción de un aminoácido en la región hipervariable de la cápside

(Widdowson y col., 2004). Desde el año 2002, cada dos o tres años emerge una nueva variante de GII.4, convirtiéndose en pandémica. La variante Farmington Hills fue reemplazada en el año 2004 por la denominada Hunter. En el año 2006 emergieron dos nuevas variantes que reemplazaron a la 2004 y que se denominaron 2006a-Lauren/Yerseke y 2006b-Minerva (Tu y col., 2008). Ambas variantes cocircularon hasta 2009. En el invierno de 2009-2010 se identificó una nueva variante, llamada GII.4 New Orleans, siendo responsable del 60% de los brotes de gastroenteritis causados por NoV durante ese periodo (Vega y col., 2011). Estudios recientes informan de la detección de una nueva variante, denominada variante Sydney, que podría estar emergiendo en diferentes regiones del mundo desde finales de 2012. Van Beek y col. (2013) detectaron por primera vez esta variante en Australia, EEUU, Bélgica y Dinamarca. Esta variante de NoV GII.4 ha sido detectada también en Escocia durante el año 2012 (Bennett y col., 2013).

Todavía no se conoce completamente el motivo por el cual algunas variantes de GII.4 se convierten en pandémicas y otras no. La combinación de nuevos sitios antigénicos en la región protuberante de la cápside (centrados en los aminoácidos 295 y 396) y el cambio o expansión de una población susceptible podrían ser la causa de la emergencia de variantes pandémicas (Donaldson y col., 2008; Lindesmith y col., 2008). Las diferencias antigénicas de las nuevas cepas supondrían un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedador, contribuyendo a la persistencia de GII.4 en la población (Lindesmith y col., 2008; Cannon y col., 2009).

Además de la evolución por deriva genética que originaría la aparición de nuevos sitios antigénicos, los NoV sufren también recombinación homóloga. Las zonas de recombinación identificadas de forma más frecuente se localizan en la región de unión de las ORF1/ORF2

(Bull y col., 2005; 2007). Otros estudios demuestran la existencia de recombinación dentro de la ORF1 (Waters y col., 2007) y la ORF2 (Rohayem y col., 2005; Lindesmith y col., 2008). La recombinación en la región de unión ORF1/ORF2 es particularmente importante, dado que facilita el intercambio de genes no estructurales (ORF1) y estructurales (ORF2-3) entre diferentes linajes de NoV, lo que proporciona otro mecanismo, además de la mutación, para la aparición de nuevas cepas distintas a nivel antigénico. De este modo, y al igual que ocurre con el virus de la gripe, la recombinación es un mecanismo importante que contribuye a la emergencia de nuevas variantes (Rambaut y col., 2008; Eden y col., 2013).

Existen numerosos estudios que indican que los periodos en los que se registra un mayor número de infecciones por NoV están relacionados con la emergencia de nuevas variantes de GII.4 y que a estos periodos les siguen años caracterizados por un descenso en el número de brotes de la enfermedad (Buesa y col., 2002; Adamson y col., 2007; Okada y col., 2007; Johansen y col., 2008; Reuter y col., 2008; Tu y col., 2008). Estos datos sugieren que la inmunidad comunitaria podría ser un regulador importante de la evolución de NoV GII.4 y de su persistencia en la población (Lindesmith y col., 2008; Cannon y col., 2009).

Desde la década de los 90, las cepas de NoV GII.4 han sido predominantes a nivel mundial (Noel y col., 1999; Lopman y col., 2004b; Okada y col., 2005; Blanton y col., 2006; Bull y col., 2006; Motomura y col., 2008; Siebenga y col., 2007b, 2009; Zheng y col., 2010) y aunque existen otros muchos genotipos circulando en la población, estos se detectan en menor medida. Ocasionalmente, se producen incrementos en la prevalencia de estos genotipos (Lewis y col., 1997; Iritani y col., 2000; Koopmans y col., 2000) que, de acuerdo con diversos estudios, podrían

evolucionar de forma similar a GII.4, sugiriendo la posibilidad de que emerjan y se expandan nuevas variantes de otros genotipos de NoV además de GII.4 (Iritani y col., 2008).

6.1. Resultados

6.1.1. Genotipado y análisis filogenético de las cepas de Norovirus detectadas en muestras clínicas

Las 747 muestras clínicas positivas para NoV se sometieron a una *seminested* RT-PCR empleando cebadores específicos para la amplificación de una región parcial de la cápside del virus. Dicho amplímero fue posteriormente secuenciado. Sólo en 306 muestras (41%) se obtuvo una secuencia óptima para la posterior reconstrucción filogenética. El análisis filogenético de las secuencias de NoV se realizó mediante el método de NJ, empleando como valor de bootstrap 1000 pseudoréplicas. El árbol filogenético construido con las 306 secuencias de NoV reveló que todas las cepas analizadas pertenecían al genogrupo GII, encontrándose 8 genotipos distintos. Las secuencias pertenecientes a cada uno de los distintos genotipos constituyeron un grupo monofilético robusto, con valores de bootstrap entre 95% y 99% (Figura 6.1).

El genotipo mayoritariamente detectado fue GII.4. El 45,4% de las secuencias analizadas pertenecían a este genotipo. Se observó también un elevado número de secuencias pertenecientes al genotipo GII.14 (34,9%). Los otros genotipos detectados fueron GII.1 (0,6%), GII.3 (1,6%), GII.6 (1,3%), GII.7 (6,9%), GII.12 (1,9%) y GII.13 (7,2%) (Figura 6.2). El resultado obtenido del análisis filogenético se confirmó empleando la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0,* obteniéndose la misma caracterización de las cepas.

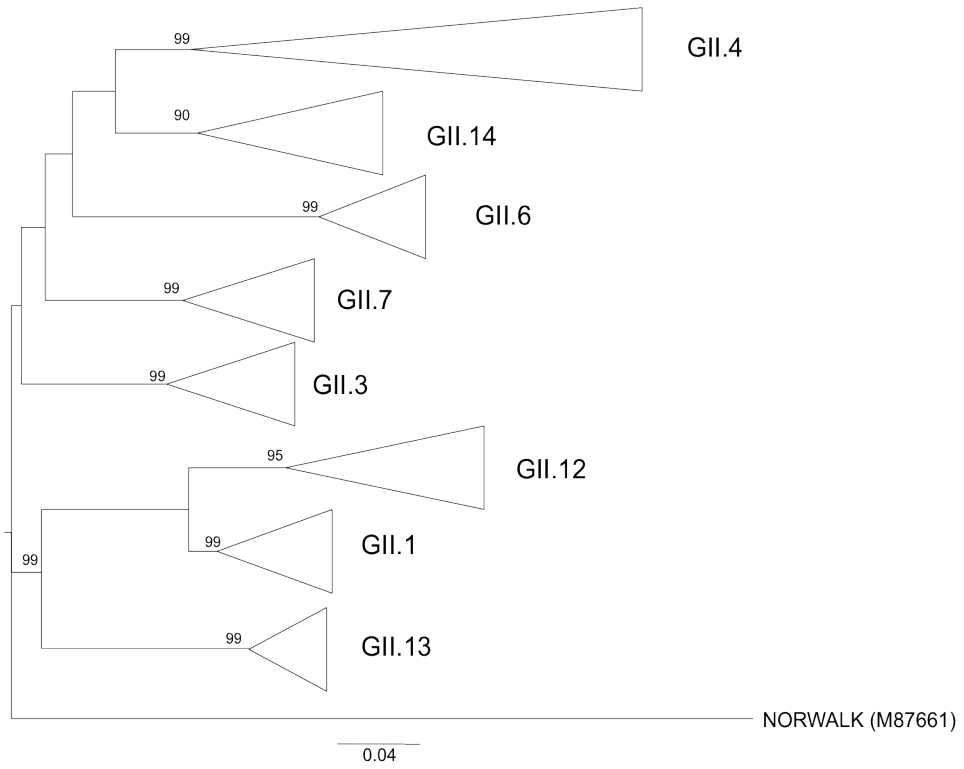


Figura 6.1: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio y de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

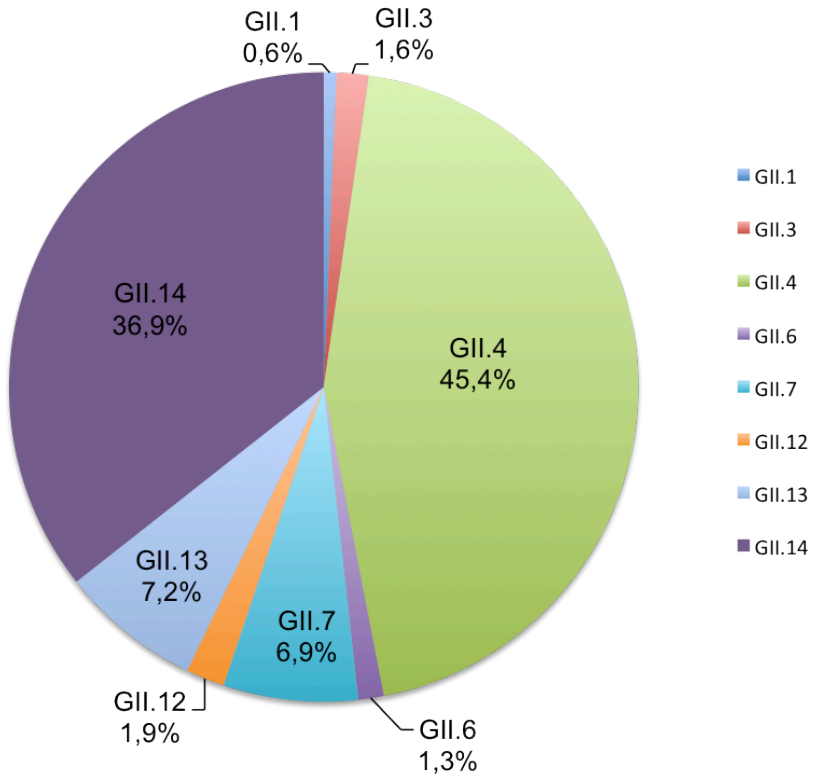


Figura 6.2: Porcentaje de NoV asignados a los diferentes genotipos detectados.

Los resultados de la caracterización de las cepas de NoV detectadas en los diferentes grupos de edad se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1: Resumen de los resultados de la caracterización de las cepas de NoV detectadas en los diferentes grupos de edad

	Grupos de edad						
	0-2 años	3-5 años	6-12 años	13-18 años	19-59 años	> 60 años	TOTAL
NoV detectados	281	41	76	20	180	146	748
Secuencias obtenidas	117	17	39	11	70	52	306
GII.1	1 (0,8%)	-	-	-	1	-	2 (0,6%)
GII.3	2 (1,7%)	-	2 (5,1%)	-	1 (1,4%)	-	5 (1,3%)
GII.4	53 (45,3%)	7 (41,1%)	13 (33,4%)	8 (72,7%)	30 (42,8%)	28 (53,8%)	139 (45,4%)
GII.6	1 (0,8%)	-	1 (2,6%)	-	2 (2,8%)	-	4 (1,3%)
GII.7	11 (9,4%)	1 (5,9%)	5 (12,8%)	1 (9,1%)	2 (2,8%)	1 (1,9%)	21 (6,9%)
GII.12	4 (3,4%)	-	1 (2,6%)	-	1 (2,8%)	-	6 (1,9%)
GII.13	13 (11,2%)	1 (5,9%)	3 (7,7%)	-	4 (5,7%)	1 (1,9%)	22 (7,2%)
GII.14	32 (27,3%)	8 (47%)	14 (35,9%)	2 (18,2%)	29 (41,4%)	22 (42,3%)	107 (34,9%)

La herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0* se empleó también para asignar cada una de las secuencias caracterizadas como GII.4 a una variante específica dentro de este genotipo. De las 139 secuencias analizadas, 10 (7,2%) se caracterizaron como variante 2006b. Ocho de estas cepas se detectaron durante el mes de agosto de 2010 y las otras dos en septiembre y diciembre de 2010, respectivamente. En los meses comprendidos entre agosto de 2010 y junio de 2011, 70 (50,3%) de las cepas detectadas se caracterizaron como variantes 2010. Las otras 59 (42,4%) cepas no se pudieron asignar a ninguna variante específica. En la Figura 6.3 se muestra el árbol filogenético construido con las secuencias asignadas a las variantes 2006b y 2010 mediante el método de NJ. En el análisis se incluyeron también cepas de referencia pertenecientes a distintos genotipos.

Las 59 secuencias de NoV GII.4 que no se asignaron a ninguna variante específica empleando la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0,* se analizaron filogenéticamente mediante el método de NJ, incluyendo también las secuencias de referencia de la nueva variante 2012 (variante Sydney). El árbol filogenético reveló que 49 de las secuencias analizadas (35,2% de las secuencias totales de NoV GII.4) formaban un cluster bien diferenciado junto con las secuencias de la variante 2012. Las otras 10 secuencias (7,4% de las secuencias de NoV GII.4) incluidas en el análisis no se situaron en ningún cluster específico (Figura 6.4).

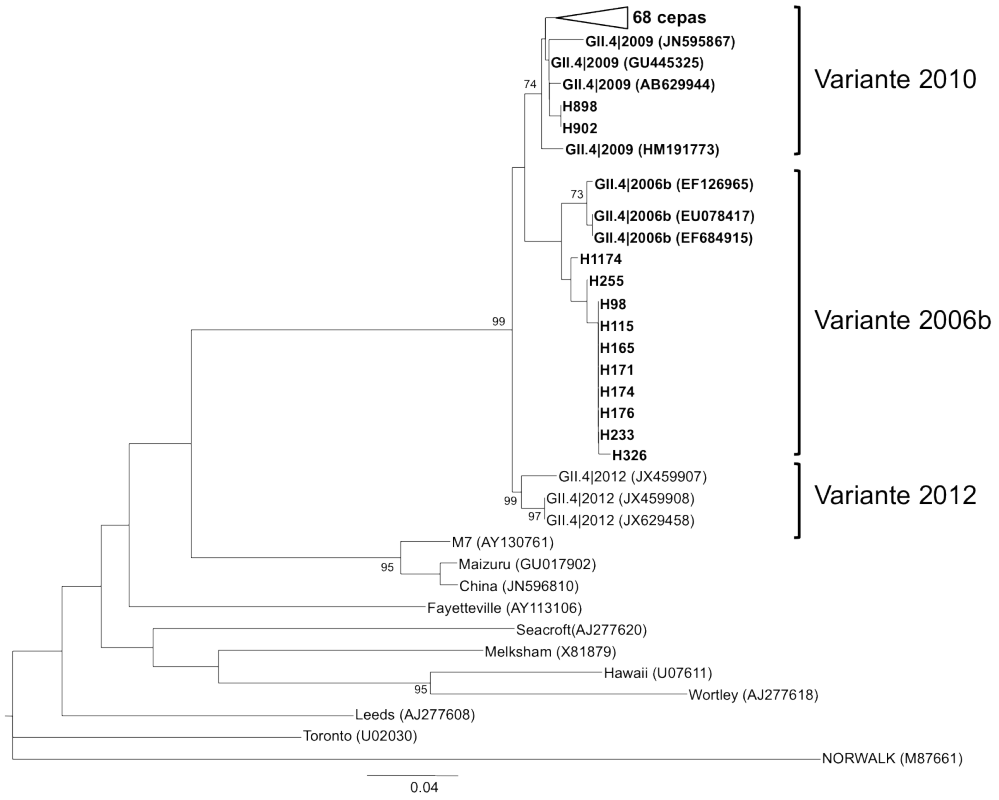


Figura 6.3: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio asignadas a las variantes 2006b y 2010, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

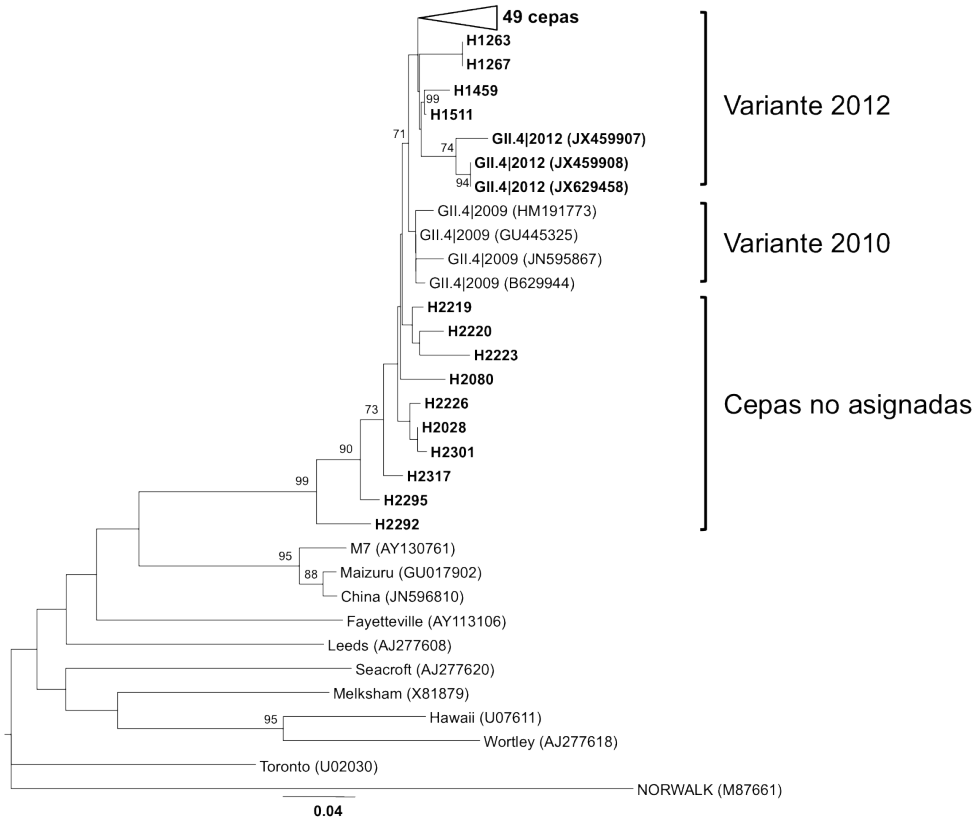


Figura 6.4: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV incluidas en este estudio que no pudieron asignarse a ninguna variante específica empleando la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

El porcentaje de similitud observado entre las secuencias de las distintas cepas pertenecientes a la variante 2010 osciló entre 96,8% y 100%. Dentro de las cepas asignadas a la variante 2012, el porcentaje de similitud se situó entre 96,4% y 100% y entre las cepas asignadas a la variante 2006b, entre 94,9% y 100%. El porcentaje de similitud existente entre las cepas de NoV GII.4 pertenecientes a la variante 2010 y las cepas pertenecientes a la variante 2012 osciló entre 94,6% y 98,4%. Entre las cepas asignadas a las variantes 2010 y 2006b, el porcentaje de similitud osciló entre 94,8% y 98,9% y entre las cepas asignadas a las variantes 2012 y 2006b, entre 94,4% y 96,3%.

La detección de cepas asignadas a la nueva variante 2012 fue mayor durante los meses de invierno de 2010/2011. En el periodo comprendido entre octubre de 2010 y marzo de 2011, se detectaron un total de 88 cepas de NoV GII.4. Cuarenta y cuatro (50%) de ellas se caracterizaron como variante 2012, 43 (48,8%) como variante 2010 y 1 (1,2%) como 2006b. Entre agosto y septiembre de 2010, 9 (56,3%) de las 16 cepas de NoV GII.4 detectadas se asignaron a la variante 2006b, 5 (31,2%) a la variante 2010 y 2 (12,5%) a la variante 2012. Por último, entre abril y junio de 2011 se detectaron un total de 35 cepas de NoV GII.4, de las cuales 23 (65,7%) pertenecían a la variante 2010, 2 (5,7%) a la variante 2012 y 10 (34,3%) no se asignaron a ninguna variante específica (Figura 6.5).

En términos epidemiológicos, GII.14 fue el segundo genotipo más importante, siendo detectado en un 34,9% de las muestras. Se aplicó el algoritmo de NJ a las 107 secuencias de NoV GII.14 para obtener un árbol filogenético. Aunque en términos generales los valores de bootstrap obtenidos en este árbol son bajos, se observa que las secuencias parciales de la cápside de las cepas de NoV GII.14 detectadas forman un grupo

monofilético robusto con las cepas de referencia de este genogrupo, con un valor de bootstrap del 98% (Figura 6.6). El porcentaje de similitud entre las secuencias de las cepas de GII.14 varían entre el 86,6% y el 100%.

Al igual que ocurría en el caso de las cepas de GII.4, se detectó un mayor número de cepas de NoV GII.14 durante los meses fríos. De las 107 cepas de NoV GII.14, 70 (65,4%) se detectaron entre los meses de octubre de 2010 y marzo de 2011. Las otras 37 (34,6%) cepas se detectaron entre abril y junio de 2011. No se detectó ninguna cepa de NoV GII.14 entre julio y septiembre de 2010.

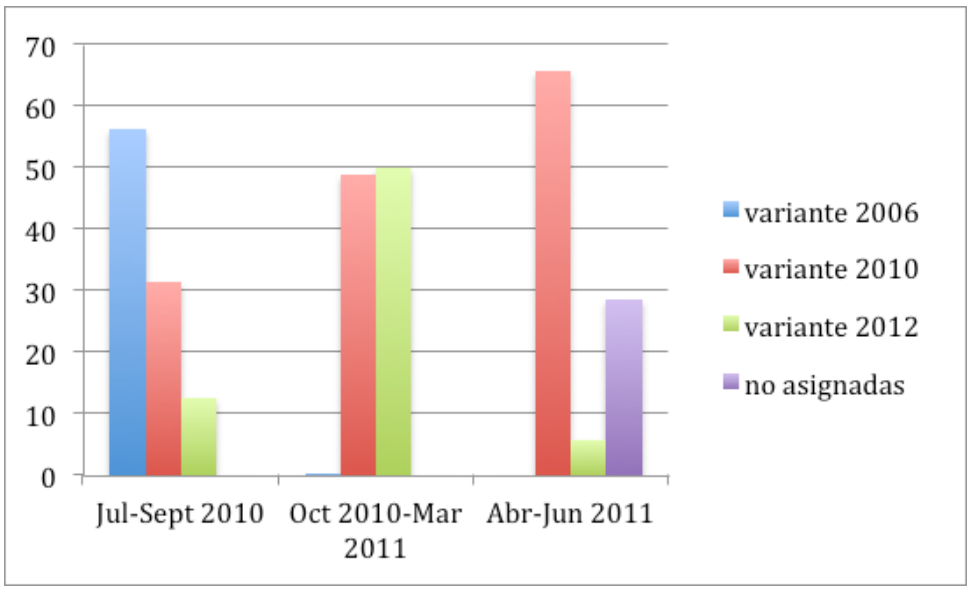


Figura 6.5: Porcentaje de las diferentes variantes de GII.4 detectadas durante los meses cálidos y fríos de 2010/2011.

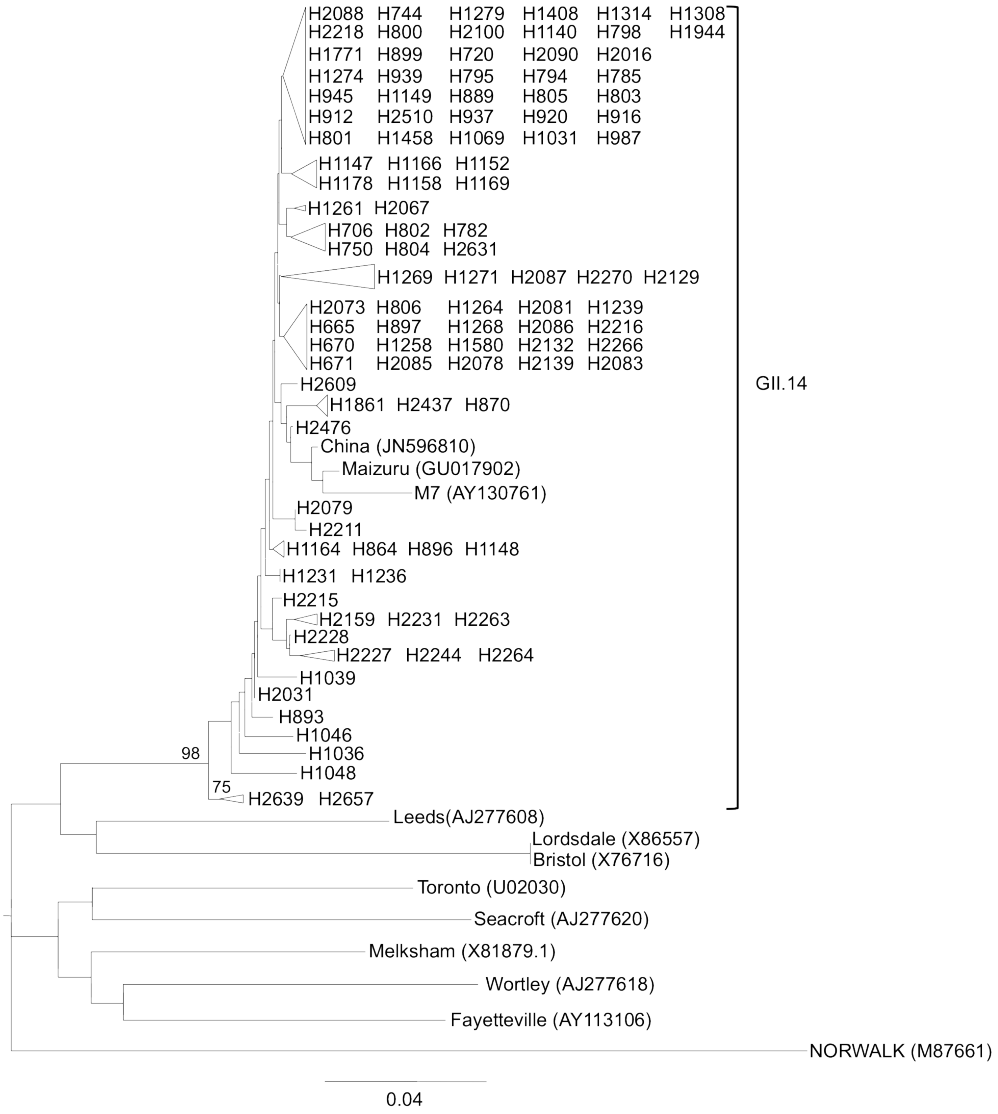


Figura 6.6: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV GII.14, así como de cepas de referencia de distintos genotipos construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

Es importante destacar que aunque tanto las cepas de NoV GII.4 y GII.14 se detectaron en mayor medida durante los meses fríos, se observó un patrón de detección alterno de ambos genotipos, como se muestra en la Figura 6.7.

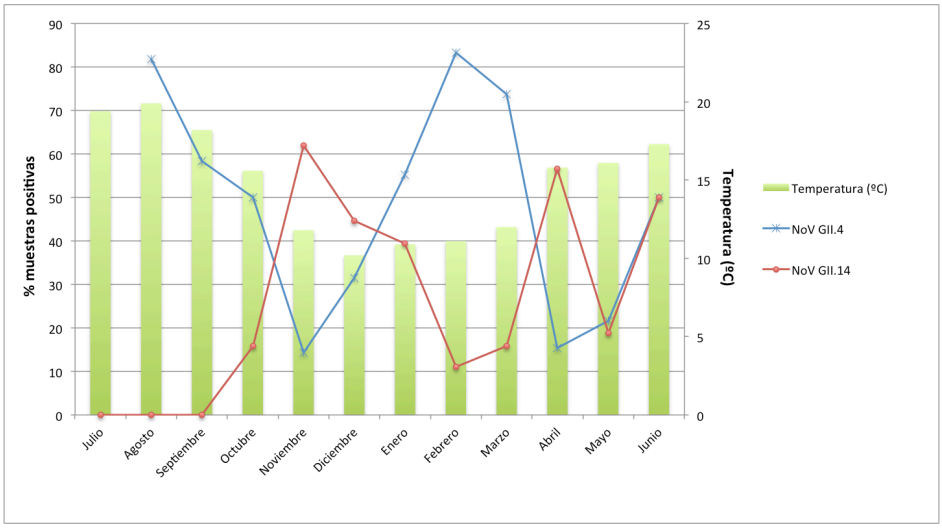


Figura 6.7: Patrón estacional de NoV GII.4 y GII.14.

En total se asignaron 21 y 22 secuencias a los genotipos GII.7 y GII.13, respectivamente. Como en el caso de los otros genotipos, se construyó un árbol filogenético basado en el método de NJ. Las cepas detectadas en muestras clínicas constituyen dos grupos monofiléticos bien diferenciados, con valores de bootstrap de 99% y 100%, respectivamente. En la figura 6.8 y 6.9 se muestran los arboles filogenéticos construidos incluyendo las cepas asignadas a los genotipos GII.7 y GII.13, respectivamente.

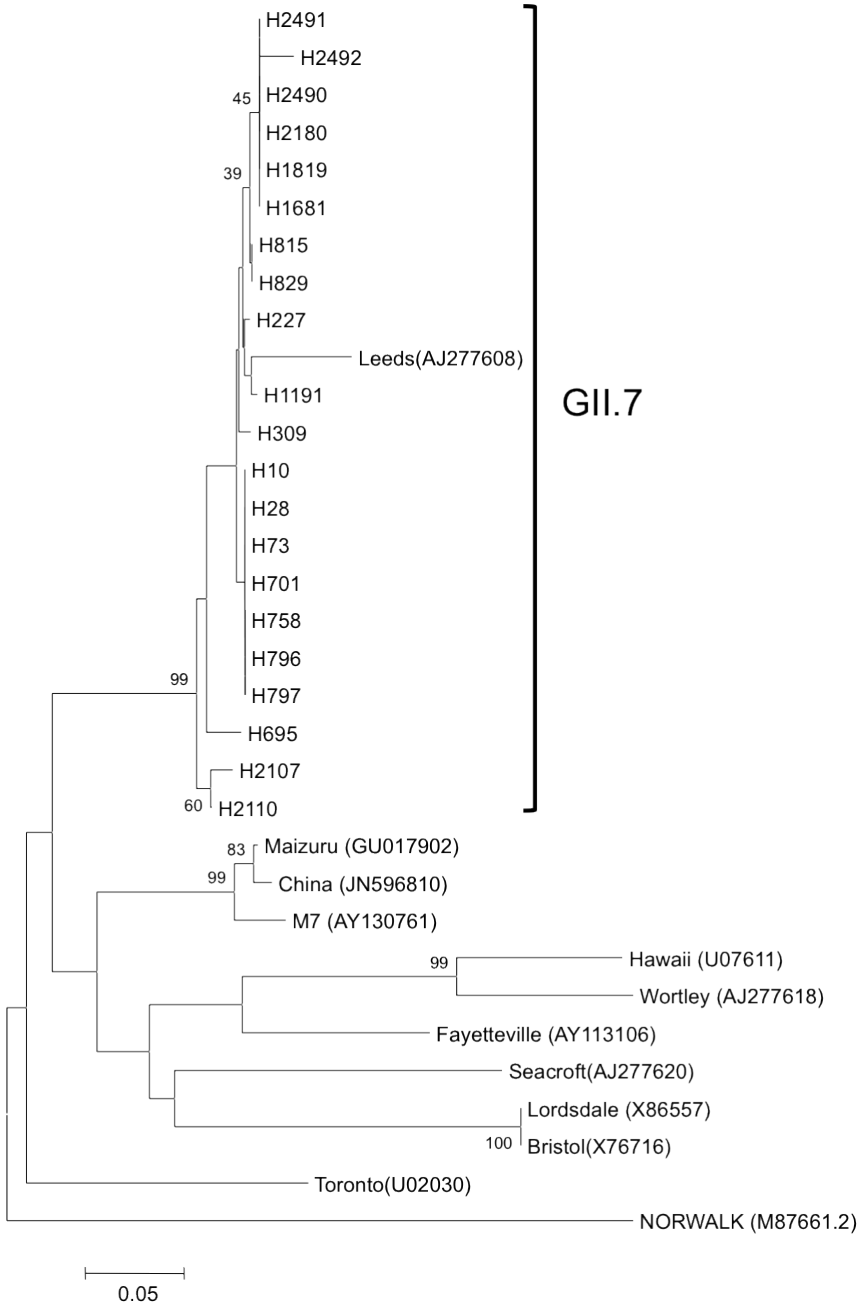


Figura 6.8: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV asignadas a GII.7, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

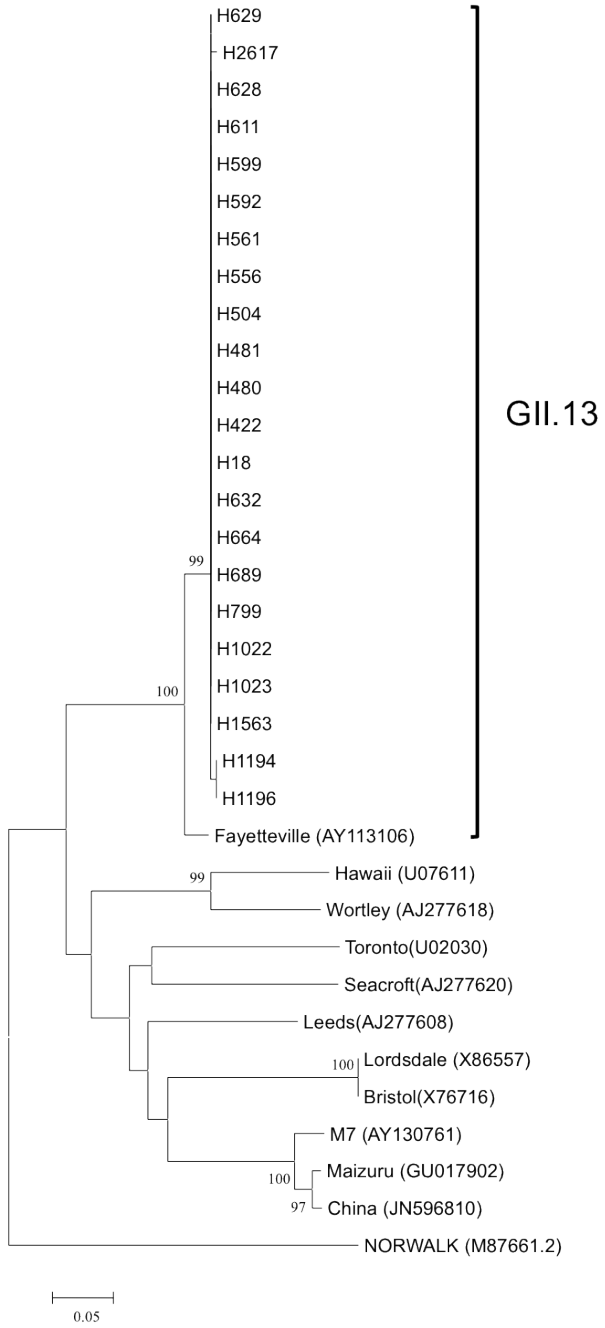


Figura 6.9: Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas de NoV asignadas a GII.13, así como de cepas de referencia construido por el método de NJ. La barra representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

El porcentaje de similitud entre las secuencias de GII.7 varió entre el 96,1% y el 100%, y en las secuencias de GII.13 entre el 98,8% y el 100%. En el caso de las cepas de GII.7 parece existir un patrón estacional. Al contrario de lo que ocurre con GII.4 y GII.14, el genotipo GII.7 sería más prevalente durante los meses cálidos (Figura 6.10). No se observó ningún patrón estacional en el caso de las GII.13 (Figura 6.11).

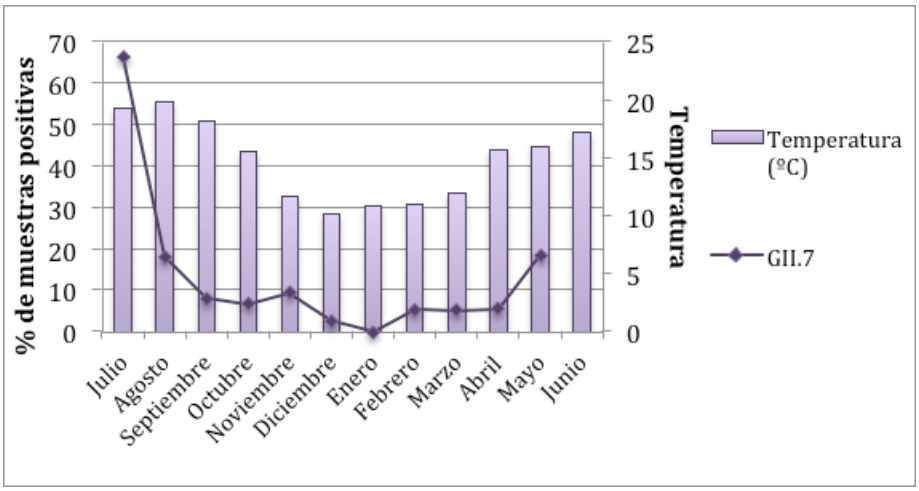


Figura 6.10: Patrón estacional de NoV GII.7.

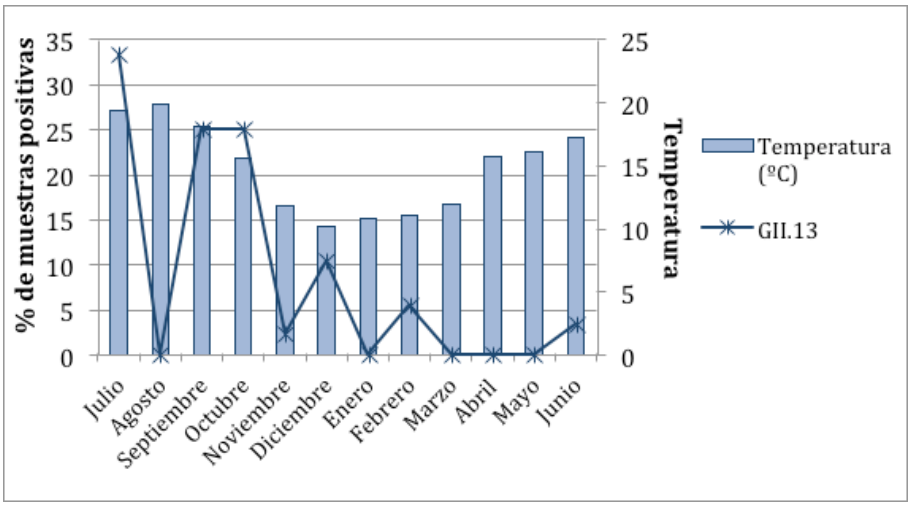


Figura 6.11: Patrón estacional de NoV GII.13.

6.2. Discusión

El genotipado de las cepas de NoV detectadas en pacientes afectados de gastroenteritis en A Coruña (Galicia) refleja la aparición, la expansión y el patrón estacional de cepas pertenecientes a diferentes genotipos, así como la cocirculación de genotipos y los cambios en la epidemiología de NoV en una región geográfica limitada.

A pesar de que todas las cepas de NoV detectadas se sometieron a la amplificación del dominio N-terminal de la cápside, solamente en el 41% de los casos se obtuvo un amplímero y una secuencia óptima del mismo para el posterior genotipado de las cepas. Estudios previos realizados por McAllister y col. (2012) y Mans y col. (2013) muestran resultados similares. En dichos estudios, el porcentaje de cepas que pudieron ser genotipadas fue del 38% y el 41%, respectivamente. Probablemente, estos resultados se deban a que la diversidad existente en las cepas de NoV es extremadamente alta. El extremo 5´de la región de la cápside de NoV es una región relativamente conservada del genoma viral y se emplea para la amplificación, utilizando parejas de cebadores universales para un amplio rango de genotipos de NoV GI y GII (Katayama y col., 2002). Sin embargo, en esta región se encuentran una gran variedad de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, del inglés *single nucleotide polimorphism*), que dificultan el diseño de cebadores adecuados para la amplificación de todas las cepas de NoV pertenecientes a los distintos genotipos (Kageyama y col., 2003; Loisy y col., 2005).

Las cepas de NoV detectadas en muestras clínicas de Galicia se clasificaron en ocho genotipos diferentes, indicando la elevada diversidad de NoV incluso en una región geográfica limitada. Esta diversidad es similar a la observada por otros autores (Ferreira y col., 2010; Mahar y

Kirkwood, 2011; McAllister y col., 2012). La caracterización molecular de las cepas de NoV detectadas mostró que el genotipo GII.4 fue mayoritario durante todo el periodo de estudio y en todos los grupos de edad analizados. Este resultado coincide con el obtenido en numerosos estudios epidemiológicos y de vigilancia llevados a cabo recientemente en los que se observa que NoV GII.4 es responsable de la mayoría de las infecciones causadas por NoV y de la mayoría de brotes de la enfermedad en todo el mundo (Lopman y col., 2004b; Kroneman y col., 2008; Siebenga y col 2009; Bull y col., 2010).

Los resultados obtenidos muestran que, en Galicia, la variante 2010 del genotipo GII.4 reemplazó a la variante 2006b durante los meses de verano de 2010. Diversos autores informan de resultados similares obtenidos de estudios realizados en Europa, Asia y América (Kroneman y col., 2008; Kaplan y col., 2011; McAllister y col., 2012;Vega y col., 2011; Payne y col., 2013).

Lindesmith y col. (2008) estudiaron los mecanismos moleculares por los que NoV GII.4 evoluciona dando lugar a la emergencia y persistencia de nuevas cepas. Las variantes emergentes parecen tener ventajas a la hora de transmitirse, así como una mayor virulencia. Se ha planteado la hipótesis de que NoV GII.4 persiste a lo largo del tiempo mediante alteraciones en los carbohidratos presentes en los lugares de unión de los antígenos que interactúan con el sistema de histocompatibilidad ABH, permitiendo así evadir la susceptibilidad del huésped. Una explicación alternativa es que las cepas evolucionan por deriva génica bajo la presión selectiva del sistema inmune, acumulando mutaciones hasta el punto en el que se establece una nueva variante fenotípica, siendo capaz de evadir la inmunidad preestablecida del huésped (Siebenga y col., 2007b). La recombinación intergenotípica e intragenotípica tiene también un papel

importante en la aparición de nuevas cepas emergentes (Eden y col., 2013).

Es importante destacar el elevado número de secuencias que no pudieron asignarse a una variante específica empleando la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0* (Kroneman y col., 2011). Los análisis filogenéticos realizados mediante NJ incluyendo dichas cepas junto con cepas de la variante 2012, detectada recientemente (Bennett y col., 2013; Fonager y col., 2013; van Beek y col., 2013), permitió la caracterización de la mayoría de las cepas analizadas como variante 2012. La nueva variante Sydney 2012 ha sido descrita como la responsable de un elevado número de brotes de gastroenteritis durante los últimos meses de 2012 (Bennett y col., 2013; Fonager y col., 2013; van Beek y col., 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos del genotipado de la cepas de NoV detectadas en Galicia revelan que esta nueva variante podría haber estado circulando desde el invierno de 2010/2011.

Por otro lado, las diez secuencias que no se pudieron asignar a ninguna variante específica mediante análisis filogenéticos o mediante la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0,* podrían constituir nuevas variantes emergentes originadas por deriva génica del gen de la cápside o bien ser cepas recombinantes. Como se indicó en Material y Métodos (Capítulo 3), el genotipado de las cepas de NoV se realizó mediante la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína VP1 (región C). La secuenciación de esta región del genoma ha sido descrita como una buena herramienta para el genotipado de las cepas de NoV (Kojima y col., 2002), permitiendo la diferenciación entre genotipos (Katayama y col., 2002). Sin embargo, la secuenciación del gen completo de la cápside podría incrementar la señal filogenética, proporcionando así una asignación de las variantes más exacta (Kroneman y col., 2011). Por este motivo, se necesitan más estudios analizando la

región completa del genoma que codifica para la proteína de la cápside VP1, así como la región de unión completa de las ORF1/ORF2, debido a su condición de punto frecuente de recombinación.

Diversos autores han informado de la emergencia de cepas pertenecientes a otros genotipos distintos de GII.4 (Lewis y col., 1997; Koopmans y col., 2000; Iritani y col., 2010). Durante el invierno de 2009/2010, se observó la emergencia de una nueva cepa perteneciente al genotipo GII.12, responsable del 16% de los brotes de gastroenteritis ocurridos durante ese año (Vega y col., 2011). En el periodo de tiempo analizado en este estudio (Julio 2010-Junio 2011), se detectaron otros 7 genotipos, además de GII.4. De estos 7 genotipos, el mayoritario fue el GII.14, aunque también se detectó un número considerable de cepas pertenecientes a GII.7 y GII.13. Estas cepas aparecen, se diseminan y desaparecen en la población en un periodo corto de tiempo. Este comportamiento podría atribuirse a la inmunidad adquirida en la población, como se ha descrito en otros estudios (Iritani y col., 2008). Esta es la primera vez que se detecta una alta prevalencia del genotipo GII.14 en España. Estudios previos realizados en otras regiones del país analizando brotes de gastroenteritis describen el genotipo GII.4 como la causa mayoritaria de la enfermedad, aunque también se han detectado brotes de gastroenteritis asociados a los genotipos GII.1, GII.2 y GII.6 (Dominguez y col., 2008; Martinez y col., 2008; Barrabeig y col., 2010). Como en el caso de las cepas de GII.4, se necesitan más estudios analizando regiones mayores del genoma con el fin de confirmar la posibilidad de la emergencia de nuevas variantes o cepas recombinantes.

Este estudio representa una primera aproximación para conocer la epidemiología molecular de NoV en Galicia. La gastroenteritis causada por NoV continua teniendo un gran impacto en la salud pública en todo el

mundo. Los análisis regionales, nacionales y globales de las infecciones causadas por NoV, así como un mejor conocimiento de su evolución, podría ayudar al desarrollo de medidas efectivas para su control y prevención.

7. ESTUDIO DE COALESCENCIA MEDIANTE INFERENCIA BAYESIANA. DIFERENCIAS EN LAS DINÁMICAS EVOLUTIVAS DE DISTINTOS GENOTIPOS DE NOROVIRUS GII

7. ESTUDIO DE COALESCENCIA MEDIANTE INFERENCIA BAYESIANA. DIFERENCIAS EN LAS DINÁMICAS EVOLUTIVAS DE DISTINTOS GENOTIPOS DE NoV GII

El estudio del origen, la emergencia y la propagación de las infecciones virales en la población es una de las áreas más activas dentro de la biología evolutiva moderna (Sharp, 2002). La elevada tasa evolutiva de los virus, especialmente de los virus RNA, junto con el pequeño tamaño de su genoma, hacen que sean buenos organismos modelo para la realización de estudios evolutivos. La tasa de evolución molecular extremadamente rápida de estos virus supone que los procesos epidemiológicos y ecológicos que dan forma a su diversidad genética actúen aproximadamente en la misma escala de tiempo en la que las mutaciones son fijadas en la población viral (Holmes, 2004). En consecuencia, la variación genética generada por los virus RNA puede ser utilizada para inferir los patrones y la dinámica de la evolución viral, dando una perspectiva molecular única de sus ancestros y mecanismos de cambio (Moya y col., 2004).

La mayoría de virus RNA poseen una tasa de evolución molecular del orden de 10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (Duffy y col., 2008). La rápida evolución de los virus RNA se debe a una combinación de i) una tasa de mutación extremadamente alta, cometiéndose aproximadamente un error en cada replicación del genoma, que generalmente tiene una longitud inferior a 15 Kb, ii) un tiempo de generación corto, lo que supone que cada progenie puede ser generada en un día y iii) el gran tamaño poblacional. Estos factores hacen que las tasas de sustitución nucleotídica de los virus RNA sean, de media, seis órdenes

de magnitud mayores que en eucariotas y virus DNA (Jenkins y col., 2002).

El desarrollo de las metodologías basadas en la coalescencia, empleadas para estimar las tasas de crecimiento poblacional, supuso uno de los avances más importantes en los estudios de evolución de los virus. De hecho, los virus RNA parecen adaptarse particularmente bien a este tipo de análisis, dado que su rápida evolución supone que los árboles filogenéticos obtenidos suelen tener una alta resolución. Cuanto más alta sea la tasa de crecimiento de la población, más peso en la base tendrá la filogenia, con la mayoría de eventos coalescentes ocurriendo cerca de la raíz del árbol (Pybus y col., 2000; 2001).

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la elevada incidencia de las infecciones por NoV parece estar relacionada con la emergencia de nuevas variantes de GII.4, lo cual permite evadir la respuesta inmune del huésped (Donaldson y col., 2008). El patrón de reemplazamiento continuo de linajes (referido a una evolución temporal), con nuevas variantes emergentes que ocupan el lugar de las variantes predominantes existentes, es muy similar a la epidemiología molecular del virus de la gripe A (Lindesmith y col., 2008). Además, se han registrado aumentos ocasionales en la prevalencia de otros genotipos además de GII.4 (Lewis y col., 1997; Koopmans y col., 2000; Hoffman y col., 2010; Iritani y col., 2010). Por este motivo se ha propuesto la posibilidad de que otros genotipos de NoV puedan estar evolucionando de una forma similar a GII.4, sugiriendo la futura emergencia y dispersión de variantes epidémicas de estos genotipos (Iritani y col., 2008). Sin embargo, es poco lo que se conoce actualmente sobre las tasas evolutivas y la dinámica poblacional de NoV, aunque se ha sugerido que genotipos como GII.3 o GII.7 podrían tener una desventaja evolutiva en comparación con GII.4,

debido a una menor tasa de evolución y a una polimerasa con una menor capacidad de procesamiento, es decir, con menor capacidad de llevar a cabo múltiples ciclos catalíticos sin disociarse de su sustrato (Bull y col., 2010).

Con el fin de obtener una visión de los mecanismos evolutivos de diferentes genotipos de NoV y, en particular, de la población de NoV GII detectada en Galicia, se realizó un estudio de coalescencia mediante inferencia bayesiana. Para realizar este análisis se incluyeron, además de las 306 secuencias de la región parcial del gen de la cápside de las cepas detectadas en Galicia (139 secuencias de cepas pertenecientes a NoV GII.4, 107 a GII.14, 21 a GII.7, 22 a GII.13 y 5 a GII.3), numerosas secuencias de cepas procedentes de otros países de las que se conoce la fecha de detección (Anexo I) (74 secuencias de cepas pertenecientes a NoV GII.4, 16 a GII.14, 26 a GII.7, 31 a GII.13 y 77 a GII.3). En total, el conjunto de secuencias perteneciente a NoV GII.4 analizado consistió en 213 secuencias pertenecientes a cepas detectadas a lo largo de un periodo de tiempo de 37 años. Para GII.14, se analizaron 123 secuencias, comprendiendo un periodo de tiempo de 12 años. Se analizaron también 82 secuencias de NoV GII.3 pertenecientes a cepas detectadas durante un periodo de tiempo de 36 años, 47 de GII.7 comprendiendo un periodo de 21 años y 52 de GII.13 obtenidas en un periodo de tiempo de 13 años.

La tasa evolutiva y la dinámica poblacional en el tiempo de diferentes genotipos de NoV pudo ser inferida mediante la aproximación de coalescencia bayesiana. El tiempo transcurrido hasta el ancestro común mas reciente (TMRCA) de las cepas gallegas se infirió también mediante este método.

7.1. Resultados

7.1.1. Tasas de cambio evolutivo y tiempo del ancestro común más reciente

Para cada conjunto de secuencias de cepas pertenecientes a los diferentes genotipos de NoV se infirió la tasa de cambio evolutivo, expresada como sustituciones nucleotídicas por sitio por año, mediante el método de coalescencia bayesiana, asumiendo tanto un reloj molecular relajado como un reloj molecular estricto. Los resultados del análisis asumiendo un reloj molecular relajado, revelaron que la tasa media de sustitución nucleotídica para NoV GII.4 era alta, con un valor de $1,6x10^{-2}$ sustituciones/sitio/año (95% HPD, $9,3x10^{-3}$-$2,5x10^{-2}$ sustituciones/sitio/año). Asumiendo un reloj molecular estricto, la tasa media de sustitución nucleotídica para este genotipo fue de $7,1x10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (95% HPD, $5,2x10^{-3}$-$9,3x10^{-3}$ sustituciones/sitio/año). NoV GII.14 mostró una tasa media de sustitución nucleotídica similar a la observada para NoV GII.4. Asumiendo un modelo de reloj molecular relajado, el valor observado fue de $1,4x10^{-2}$ sustituciones/sitio/año (95% HPD, $8,1x10^{-3}$-$2x10^{-2}$ sustituciones/sitio/año). Al igual que en el caso de NoV GII.4, aplicando un reloj molecular estricto la tasa media de sustitución nucleotídica fue menor, mostrando un valor de $3,7x10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (95% HPD, $1,6x10^{-3}$-$6x10^{-3}$ sustituciones/sitio/año). Este valor de 10^{-3} sustituciones/sitio/año es similar a los obtenidos para NoV GII.7 y GII.13 asumiendo tanto un modelo de reloj molecular relajado como estricto, y similar al obtenido para GII.3 aplicando un reloj molecular relajado (Tabla 7.1).

El tiempo medio estimado para el TMRCA de cada uno de los diferentes genotipos analizados se corresponde con el tiempo de divergencia de los diferentes linajes. En el caso de NoV GII.14, NoV GII.7 y NoV GII.13, asumiendo un reloj molecular relajado, se observó que los diferentes linajes divergieron hace 20 años, mientras que en el caso de NoV GII.4 y NoV GII.3, los diferentes linajes divergieron hace 38 años. Los resultados obtenidos del análisis de coalescencia mediante inferencia bayesiana asumiendo tanto un reloj molecular estricto como relajado se muestran en la Tabla 7.1.

El Coeficiente de Variación (CoV) obtenido bajo el supuesto de un reloj molecular relajado refleja cómo la estimación de la tasa de sustitución en los diferentes genotipos se ajusta al reloj molecular. Este estadístico resume cómo la tasa evolutiva varía entre los distintos linajes. En el caso de NoV GII.4, GII.14 y GII.13, el valor medio del CoV es elevado, sugiriendo un comportamiento no ajustado, indicativo de grandes diferencias en la tasa de variación entre los distintos linajes. Para estos tres genogrupos, el valor de la probabilidad marginal obtenido bajo el supuesto de un reloj molecular relajado es mayor que el obtenido asumiendo un reloj molecular estricto, apoyando la elección del modelo relajado como el correcto (Tabla 7.2).

En el caso de los genogrupos GII.7 y GII.13, aunque los valores medios del CoV son muy bajos, el comportamiento no ajustado de las cepas incluidas en el análisis de estos genotipos se ve apoyado por un valor mayor de la probabilidad marginal para el modelo de reloj molecular relajado que estricto (Tabla 7.2).

Tabla 7.1: Tasas de sustitución nucleotídica y tiempos de divergencia de cepas de NoV pertenecientes al genotipo GII.4, GII.14, GII.3, GII.7 y GII.13, calculados mediante inferencia bayesiana empleando secuencias de una región parcial del gen de la cápside.

Genotipo	Reloj molecular estricto			Reloj molecular relajado (UCLN)		
	Tasa de sustitución nucleotídica [a] (sustituciones/sitio/año) (95% HPD)[b]	TMRCA[c] (95% HPD):		Tasa de sustitución nucleotídica [a] (sustituciones/sitio/año) (95% HPD)[b]	TMRCA[c] (95% HPD):	
		Nº de años	Fecha (rango)		Nº de años	Fecha (rango)
GII4	$7,1x10^{-3}$ ($5,2x10^{-3}$-$9,3x10^{-3}$)	38,6 (37,4-40,2)	1972 (1971-1974)	$1,6x10^{-2}$ ($9,3x10^{-3}$-$2,5x10^{-2}$)	38,7 (37,1-41,5)	1972 (1970-1974)
GII14	$3,7x10^{-3}$ ($1,6x10^{-3}$-$6x10^{-3}$)	88,3 (41,8-150,5)	1923 (1861-1970)	$1,4x10^{-2}$($8,1x10^{-3}$-$2x10^{-2}$)	20,1 (12,2-33,9)	1991 (1977-1999)
GII3	$3,7x10^{-6}$($2,5x10^{-3}$-$4,8x10^{-3}$)	37,1 (35,1-40,9)	1974 (1970-1976)	$4,2x10^{-3}$ ($3x10^{-3}$-$5,6x10^{-3}$)	38,2 (36,1-42,6)	1973 (1969-1975)
GII7	$4,6x10^{-3}$ ($2,6x10^{-3}$-$6,6x10^{-3}$)	21,8 (21,3-23,2)	1989 (1988-1990)	$4,1x10^{-3}$ ($2,2x10^{-3}$-$6,3x10^{-3}$)	22,3 (21,3-24,7)	1989 (1986-1990)
GII13	$3,28x10^{-3}$ ($1,8x10^{-3}$-$4,9x10^{-3}$)	69,5 (38-107,9)	1942 (1904-1973)	$8,5x10^{-3}$ ($2,4x10^{-3}$-$1,4x10^{-2}$)	21,2 (13,7-45,7)	1990 (1965-1997)

[a] Tasa evolutiva media determinada aplicando, de manera independiente, un reloj molecular estricto y un reloj molecular relajado.

[b] 95% HPD, 95% densidad posterior más alta (95% *highest posterior density*)

[c] TMRCA, tiempo del ancestro común más reciente (del inglés *time of most recent common ancestor*)

Los cinco genotipos de NoV GII incluidos en el estudio fueron analizados de forma conjunta mediante el método de inferencia bayesiana. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada uno de los genotipos, el análisis se realizó asumiendo un reloj molecular relajado. Los resultados obtenidos revelaron que la tasa evolutiva media era de $5{,}12x10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (95% HPD, $3.8x10^{-3}$- $6{,}4x10^{-2}$). El TMRCA compartido por los cinco genotipos data de hace 88 años (95% HPD, 49-143 años) (Tabla 7. 1). El valor medio del CoV fue elevado, apoyando el comportamiento no ajustado al reloj molecular de NoV (Tabla 2.7).

Tabla 7.2: Estimación del ajuste del modelo de reloj molecular relajado (CoV) y de las probabilidades marginales obtenidas para el modelo de reloj molecular estricto y relajado, como una medida de la calidad del análisis.

	Reloj molecular estricto		Reloj molecular relajado (UCLN)	
Genotipo	CoV (95% HPD)	Log P(M/D)[a] (S.E)[b]	CoV (95% HPD)	Log P(M/D)
GII.4	NA[c]	-1931,2 (+/-24)	1,7	-1873 (+/- 0,5) *
GII.14	NA	-2075,1 (+/- 0,2)	2,5 (1,4-4)	-1851,9 (+/- 0,2)*
GII.3	NA	-1716,2 (+/- 0,1)	0,85 (0,5-1,2)	-1716,4 (+/- 0,1)*
GII.7	NA	-765 (+/- 0,1)	0,5 (0,2-1,2)	-745,2 (+/-0,1)*
GII.13	NA	-1078 (+/- 0,1)	2,3 (1,1-3,5)	-1063 (+/- 0,1)*

[a] Probabilidades marginales para cada uno de los conjuntos de secuencias considerados bajo dos relojes moleculares estudiados. El reloj molecular elegido está indicado como (*)

[b] S.E.(estimación suavizada, del inglés *smoothed estimate*) empleando 1000 réplicas de bootstrap

[c] NA, no aplicable

7.1.2. Relación filogenética de las secuencias de la región parcial de la cápside de Norovirus

En base al análisis evolutivo (realizado bajo los parámetros establecidos *a priori* en el programa BEAST V1.7.4) de cada serie de secuencias, se infirió el árbol MCCT correspondiente a los diferentes genotipos de NoV. Estos árboles muestran la relación filogenética medida en unidades de tiempo de las secuencias de la región parcial de la cápside.

El MCCT inferido para NoV GII.4 (secuencias de cepas detectadas durante un periodo de tiempo de 37 años) (Figura 7.1) reveló que las cepas de NoV detectadas en Galicia se encuentran distribuidas en dos grupos bien diferenciados, que divergieron hace un tiempo medio de 6,5 años (95% HPD, 5-7,5 años) (nombrados como A y B en el MCCT). Las cepas detectadas en Galicia pertenecientes a la variante 2006b se situaron en uno de los dos grupos, divergiendo del TMRCA junto con una cepa de Korea hace 2 años (95% HPD, 1,5-3 años) (grupo A). Por otro lado, las cepas gallegas pertenecientes a la variante 2010, 2012 y aquellas que no pudieron ser asignadas a ninguna variante, se encuentran situadas en el segundo grupo (grupo B). La mayoría de estas cepas han evolucionado junto con otras cepas detectadas en España durante diferentes brotes de la enfermedad. Las cepas de referencia de la nueva variante 2012 (nombradas en el árbol como AU2012a, AU2012b y CHN2012) comparten un ancestro común con 5 cepas detectadas en Galicia pertenecientes a esta misma variante, con un tiempo medio de divergencia de un año (95% HPD, 0,5-1 años).

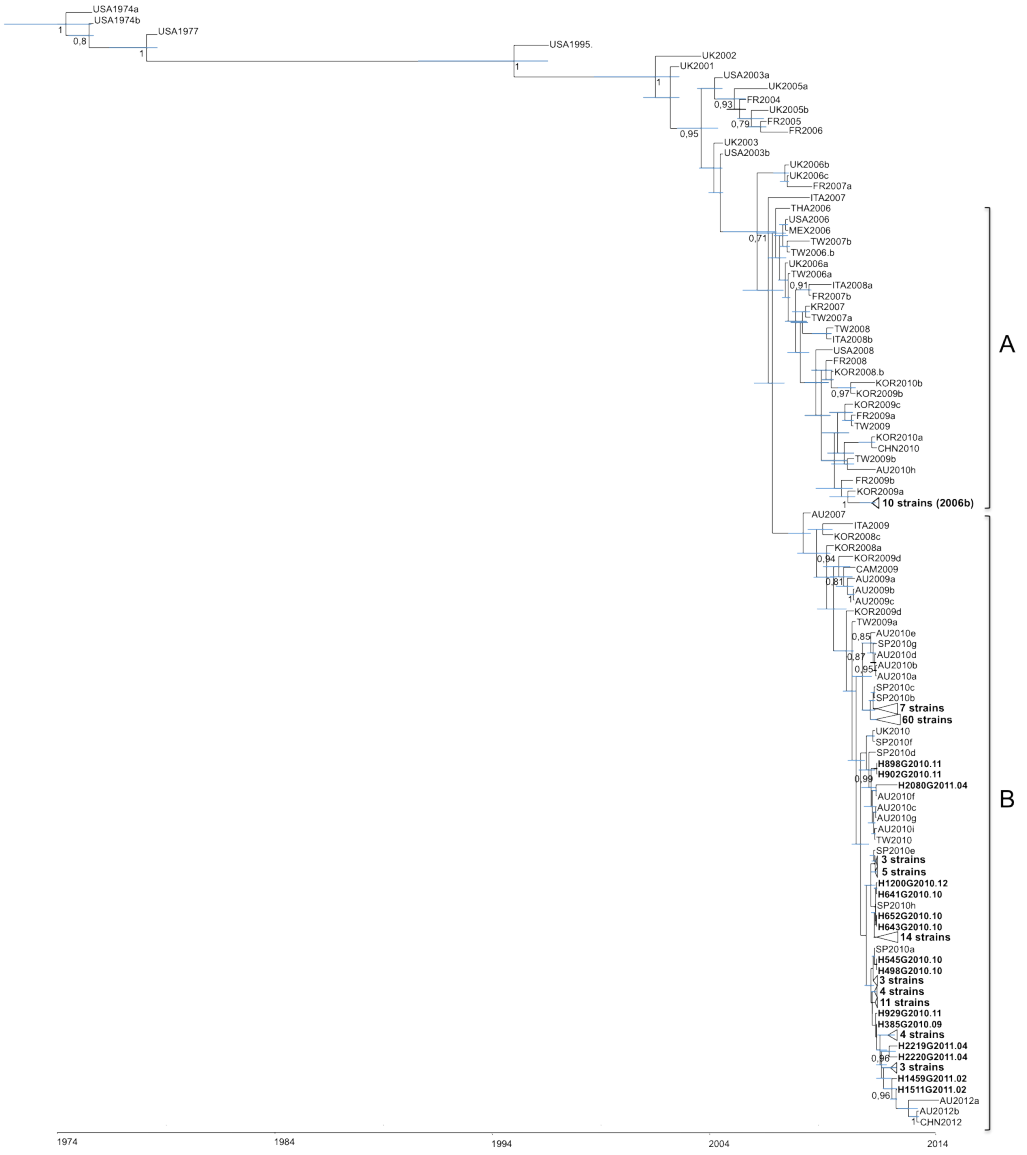


Figura 7.1: MCCT de 213 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas de Galicia se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado. (Ampliación de la figura disponible en Anexo 2).

El MCCT inferido para la serie de datos de NoV GII.14 (periodo de 12 años) (Figura 7.2) mostró que los linajes europeos más recientes divergieron de un ancestro común datado hace 7,5 años (95% HPD, 7,5-9,5 años). Las cepas detectadas en Galicia divergieron junto con una cepa danesa a partir de un ancestro común datado hace 5,5 años (95% HPD, 4,5-6,5 años). Las cepas gallegas se encuentran separadas en dos grupos principales, con un tiempo de divergencia medio de 4,5 años (95% HPD, 3-5,5 años).

En el caso de NoV GII.3, el MCCT inferido a partir de la serie de datos de este genotipo (periodo de 36 años) (Figura 7.3) reveló que las cepas detectadas en Galicia forman un único cluster, que comparte un ancestro común con una cepa de EEUU aislada en 1990. Este TMRCA tiene un tiempo medio de divergencia de 23 años (95% HPD, 21-27 años).

El MCCT inferido para el conjuno de secuencias de NoV GII.7 (periodo de 21 años) (Figura 7.4), mostró que las cepas detectadas en Galicia se encontraban localizadas en tres ramas principales, compartiendo un ancestro común con una cepa de origen francés y otras cepas aisladas en España durante distintos brotes, con un tiempo medio de divergencia de 3 años (95% HPD, 2-4,5 años).

En el caso de GII.13, el MCCT inferido en base a la serie de datos de este genotipo (periodo de 13 años) (Figura 7.5) mostró que las cepas detectadas en Galicia se encontraban agrupadas en una misma rama, junto con una cepa detectada en Italia. Estas cepas comparten un ancestro común con una cepa francesa y otras cepas detectadas en España, con un tiempo medio de divergencia de 2 años (95% HPD, 1,5-3,5 años).

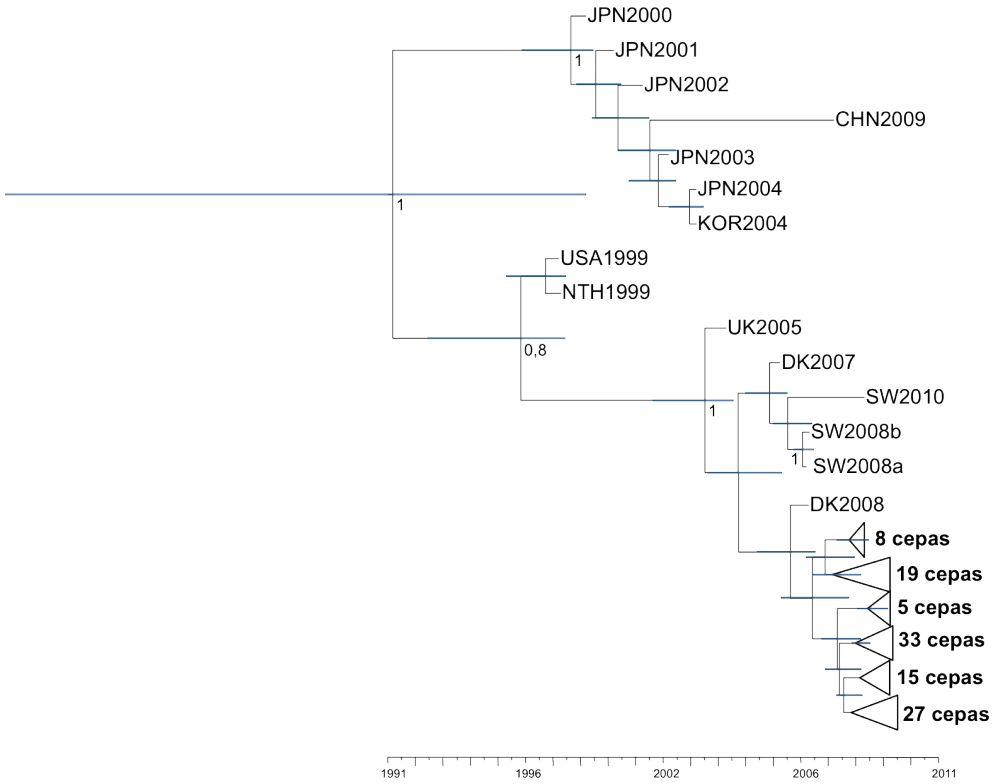


Figura 7.2: MCCT de 123 secuencias de NoV GII.14 (periodo de 12 años). Las cepas de Galicia se encuentran representadas en ramas colapsadas endicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.

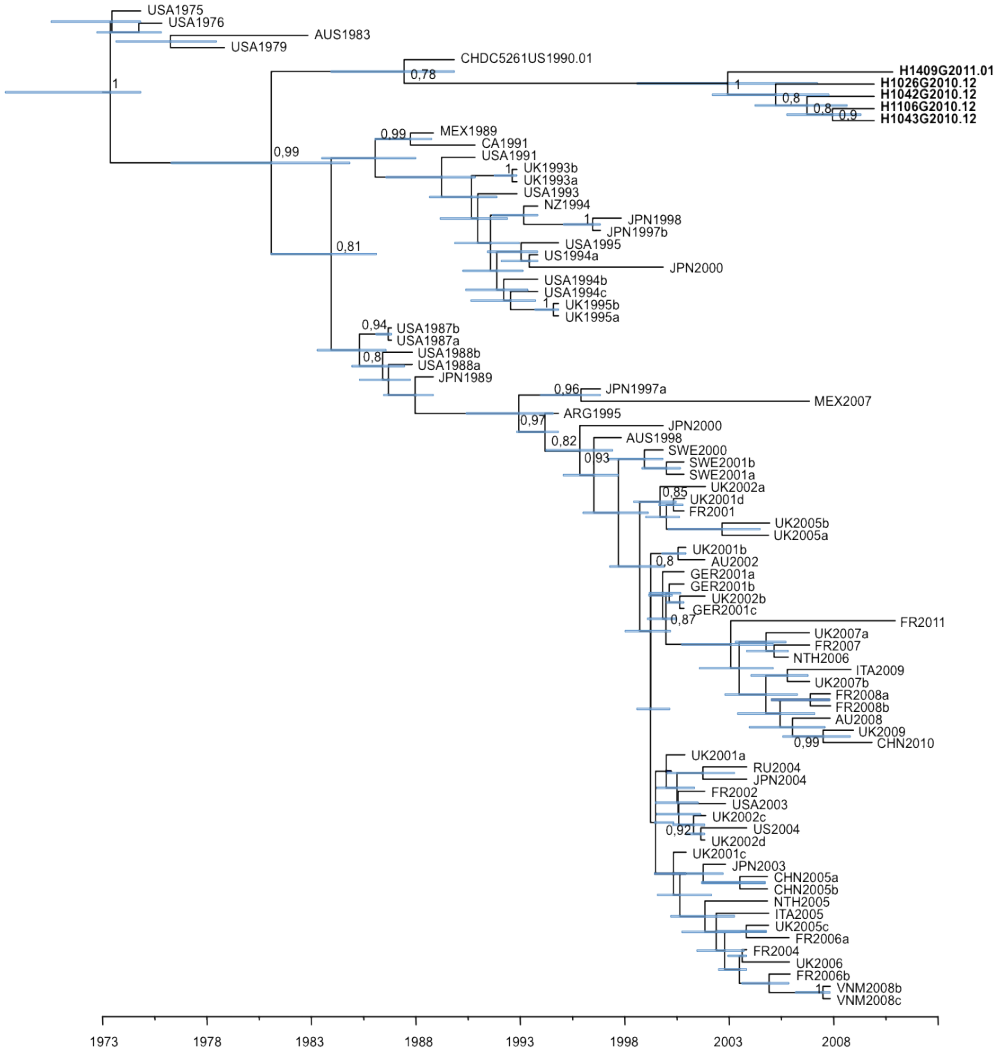


Figura 7.3: MCCT de 82 secuencias de NoV GII.3 (periodo de 36 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.

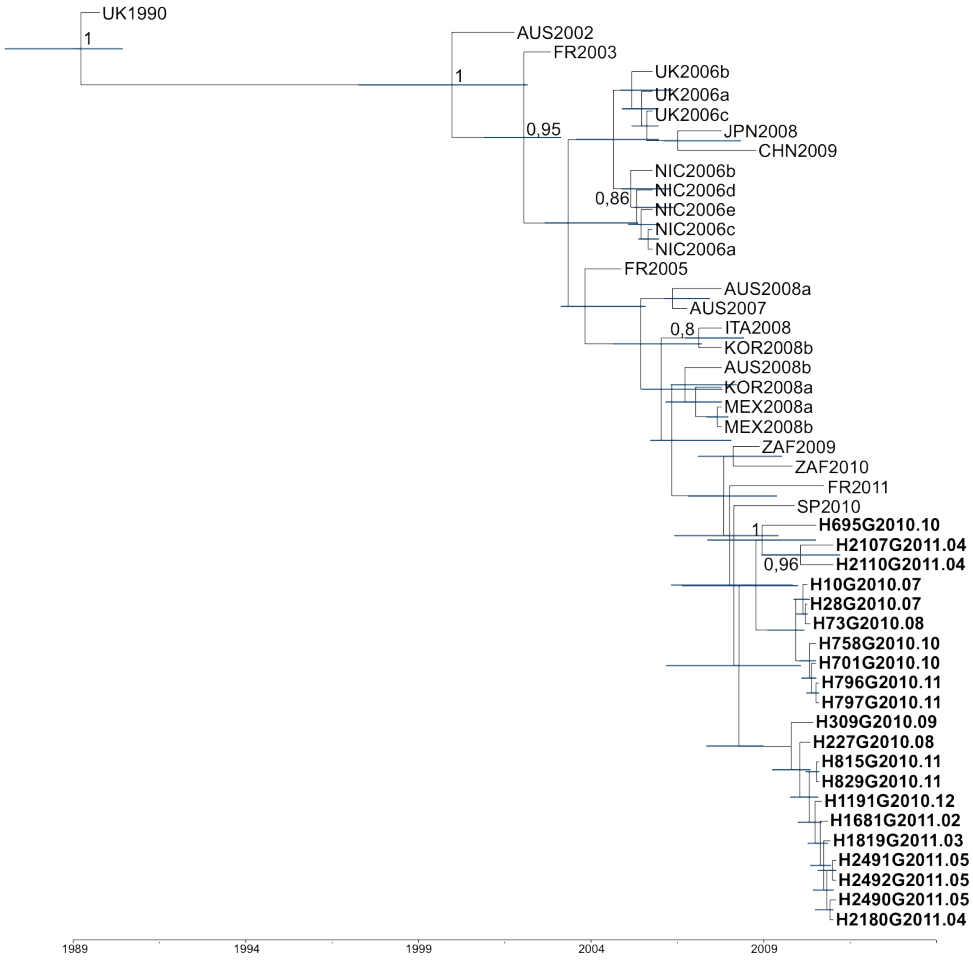


Figura 7.4: MCCT de 47 secuencias de NoV GII.7 (periodo de 21 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.

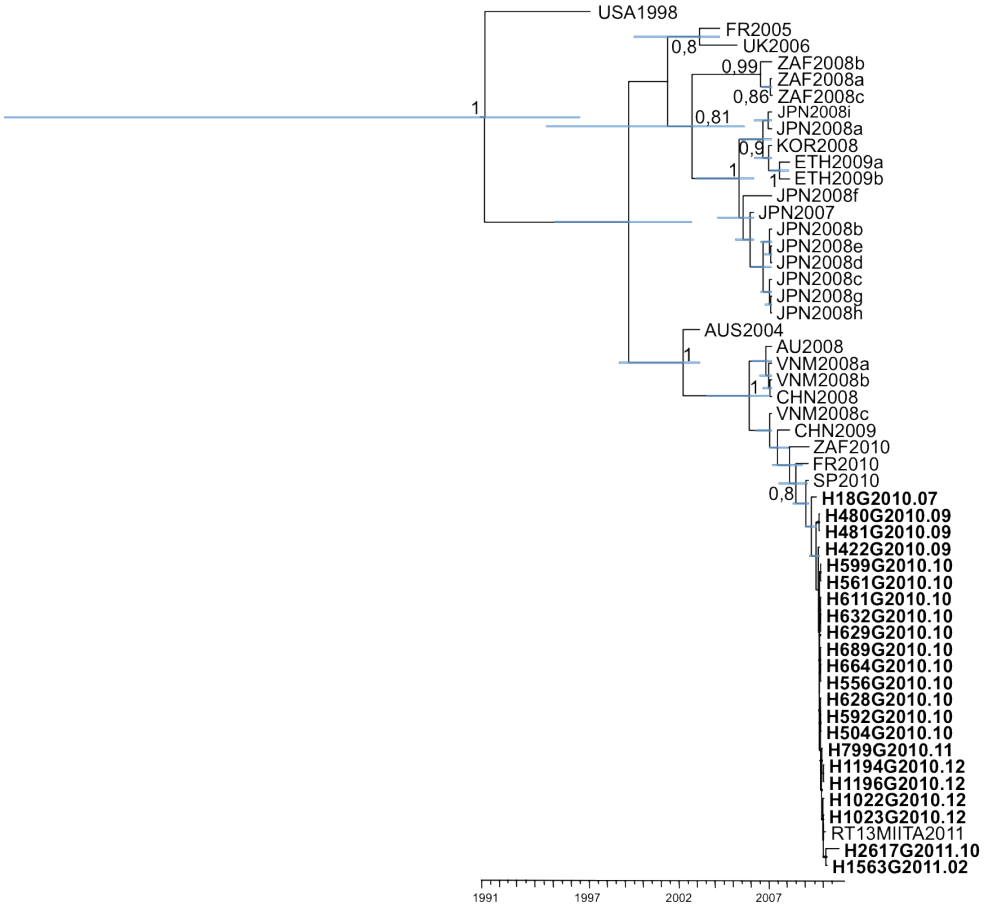


Figura 7.5: MCCT de 52 secuencias de NoV GII.13 (periodo de 13 años). Las cepas de Galicia se encuentran indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.

El árbol MCCT inferido para establecer las relaciones filogenéticas entre los distintos genotipos reveló que estos divergieron a partir de un TMRCA datado hace 88 años (95% HPD, 34-40 años). En una de las ramas se localizaron los linajes correspondientes a NoV GII.4 y GII.14. El TMRCA compartido por ambos genogrupos data de hace 52 años (95% HPD, 11-17 años). En la otra rama se encuentran localizados NoV GII.3, GII.13 y GII.7. NoV GII.3 divergió hace 50 años (95% HPD, 10-25 años) Los genotipos que más recientemente divergieron fueron NoV GII.7 y NoV GII.13, compartiendo ambos un ancestro común hace 31 años (95% HPD, 10-15 años) (Figura 7.6).

7.1.3. Inferencia de la dinámica evolutiva

Para inferir la historia de la población de los diferentes genotipos de NoV se empleó el modelo de gráficas de líneas de cielo (BSP, del inglés *Bayesan Skyline Plot*) obtenidas por inferencia bayesiana. Este modelo muestra la diversidad genética relativa de una población a lo largo del tiempo, donde N_e es el tamaño efectivo de la población y τ es la generación. El parámetro $N_e\tau$ refleja el número de infecciones efectivas (replicaciones) establecidas por el virus. Estas gráficas de la diversidad genética relativa pueden ayudar a ilustrar la historia demográfica del virus, mostrando aumentos y disminuciones de la diversidad genética dentro de un marco de tiempo definido. Las gráficas de linajes a través del tiempo (LTTP, del ingés *Lineages Through Time Plot*) se emplean también para tener una visión en conjunto del patrón de diversificación, expresado en este caso como el número de linajes que tuvieron alguna descendencia exitosa en el tiempo.

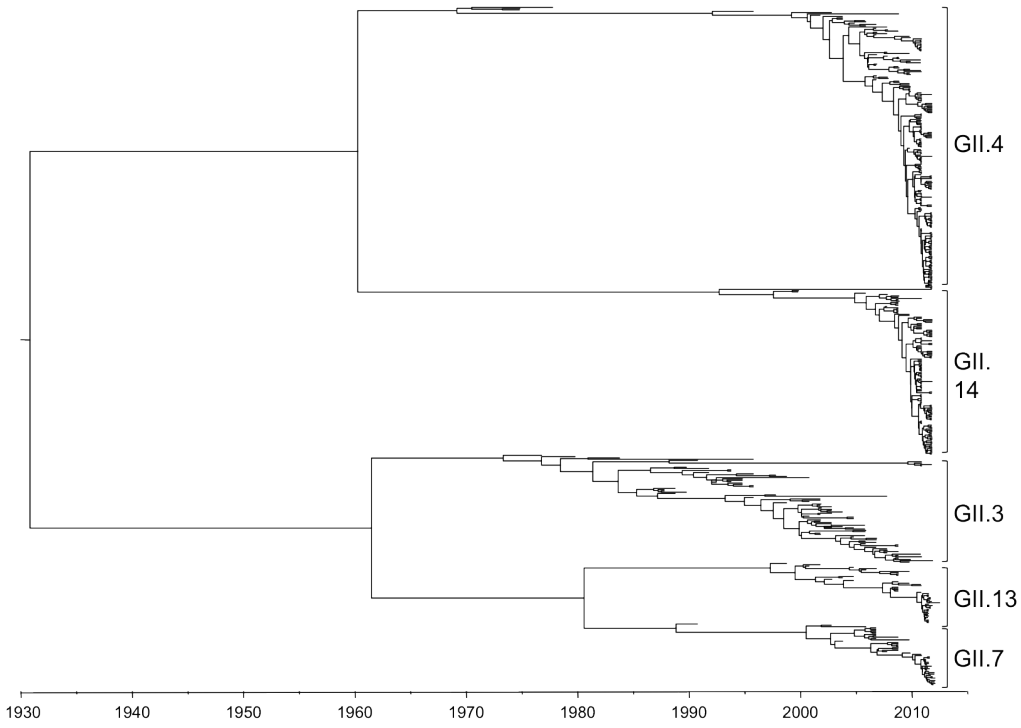


Figura 7.6: MCCT de NoV GII.4, GII.14, GII.3, GII.7 y GII.13. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.

La BSP obtenida para NoV GII.4 mostró un ligero incremento en el valor de $N_e\tau$ en los años 2002 y 2004. Entre los años 2006 y 2009, se observa el valor más alto para este parámetro (Figura 7.7a), con un nuevo incremento en 2010. Este resultado concuerda con lo observado en la LTTP (Figura 7.7b), en la que se encuentra reflejada la emergencia de las variantes epidémicas 1995, 2002, 2004, 2006 (a y b) y 2010. La variante 2002, que tuvo un importante impacto en la población de acuerdo con los datos de vigilancia epidemiológica, no coincide con un aumento del valor de $N_e\tau$ durante esos años, mientras que la aparición de las variantes 2006 y 2010, parecen coincidir con un notable aumento del valor de $N_e\tau$ en la BSP.

El análisis de la gráfica de BSP obtenida para NoV GII.14 (Figura 7.8a,b) muestra un aumento del valor de $N_e\tau$ durante el año 2009, alcanzando su valor más alto a comienzos de 2010. Tras una disminución de $N_e\tau$ durante ese mismo año, se produce un nuevo aumento en el valor de $N_e\tau$ en el 2011, que supone el valor más alto para este parámetro durante el periodo de tiempo analizado. La gráfica de LTTP muestra un importante aumento en el número de linajes durante esos mismos años.

Es importante destacar que las gráficas de BSP de NoV GII.14 y GII.4 se encuentran relacionadas. Como se ha mencionado anteriormente, se había observado un patrón alterno en la detección de estos dos genotipos. En las gráficas de BSP se puede observar cómo el aumento en el valor de $N_e\tau$ de GII.14 ocurrido a comienzos de 2009 coincide con una disminución del valor de $N_e\tau$ de GII.4 durante este mismo periodo de tiempo. Del mismo modo, el aumento del valor de $N_e\tau$ de GII.4 durante el año 2010 (que coincide con la emergencia a nivel mundial de la variante 2010) se correlaciona con una disminución del valor de $N_e\tau$ de GII.14 durante la primera mitad de ese año (Figura 7.9).

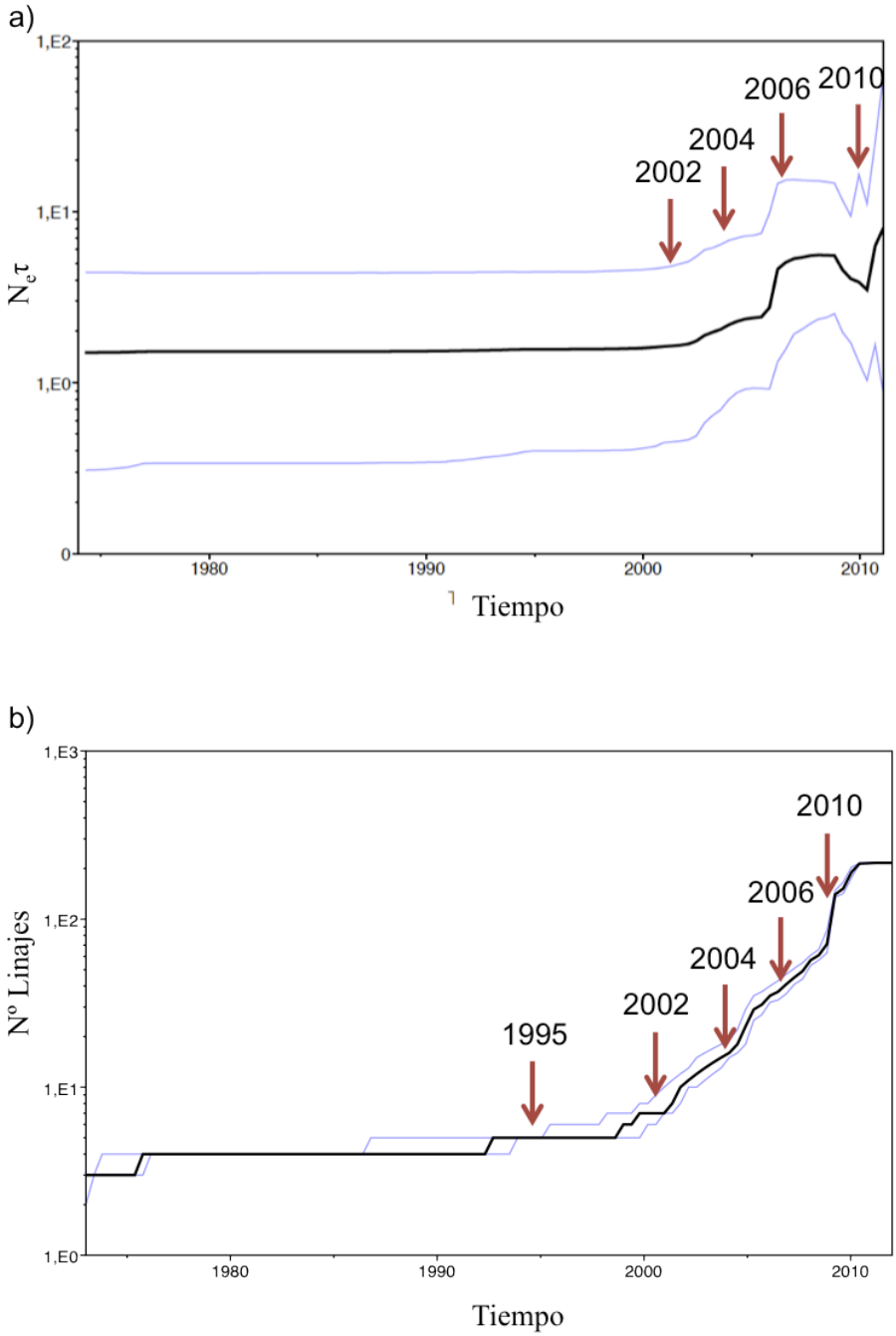


Figura 7.7: a) Gráfica BSP obtenidas para NoV GII.4. b) Gráfica LTTP obtenidas para NoV GII.4. La gráfica BSP representa la diversidad genética relativa a lo largo del tiempo, mientras que la gráfica LTTP representa el patrón de diversificación expresado como el número de linajes que tuvieron alguna descendencia exitosa en el tiempo.

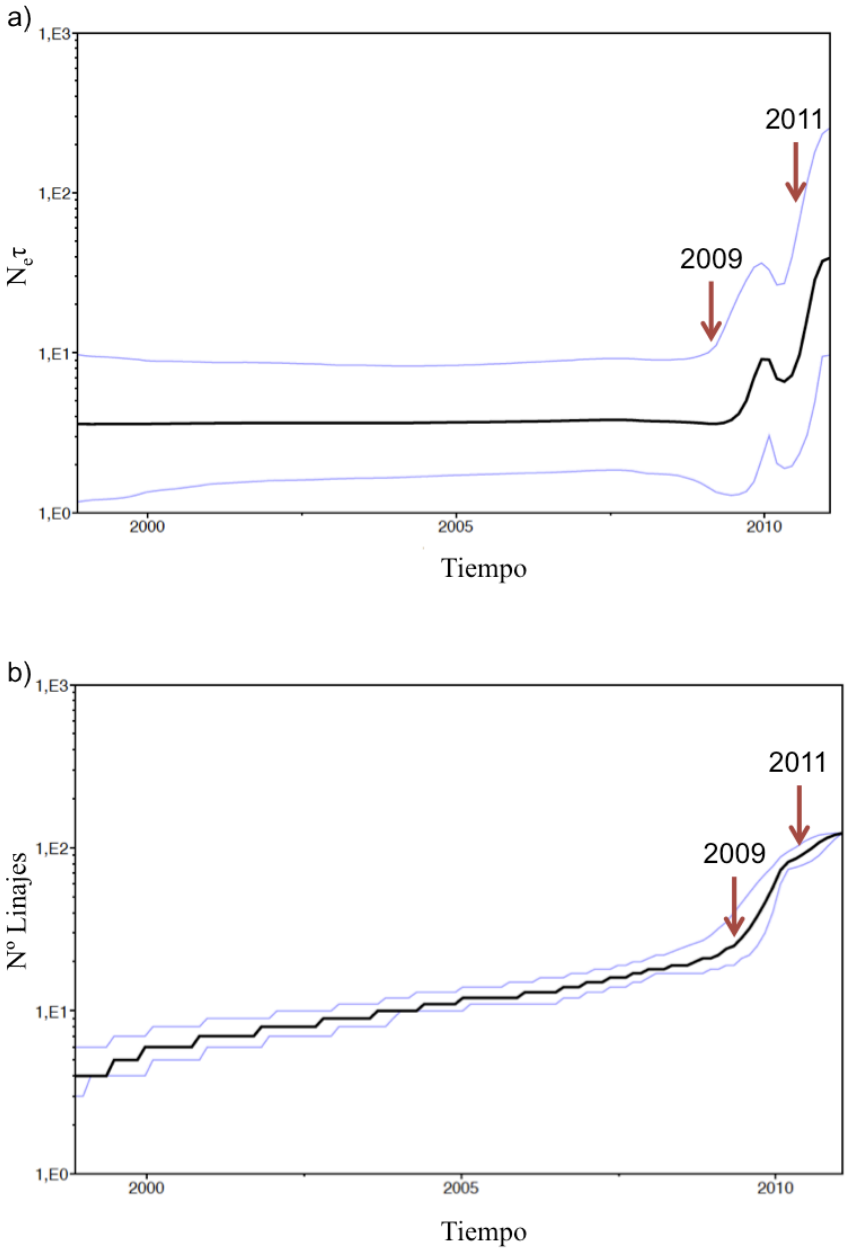


Figura 7.8: a) Gráfica BSP obtenidas para NoV GII.14. b) Gráfica de linajes a través del tiempo (*Lineages through time plot*, LTTP) obtenidas para NoV GII.14. La gráfica BSP representa la diversidad genética relativa a lo largo del tiempo, mientras que la gráfica LTTP representa el patrón de diversificación expresado como el número de linajes que tuvieron alguna descendencia exitosa en el tiempo.

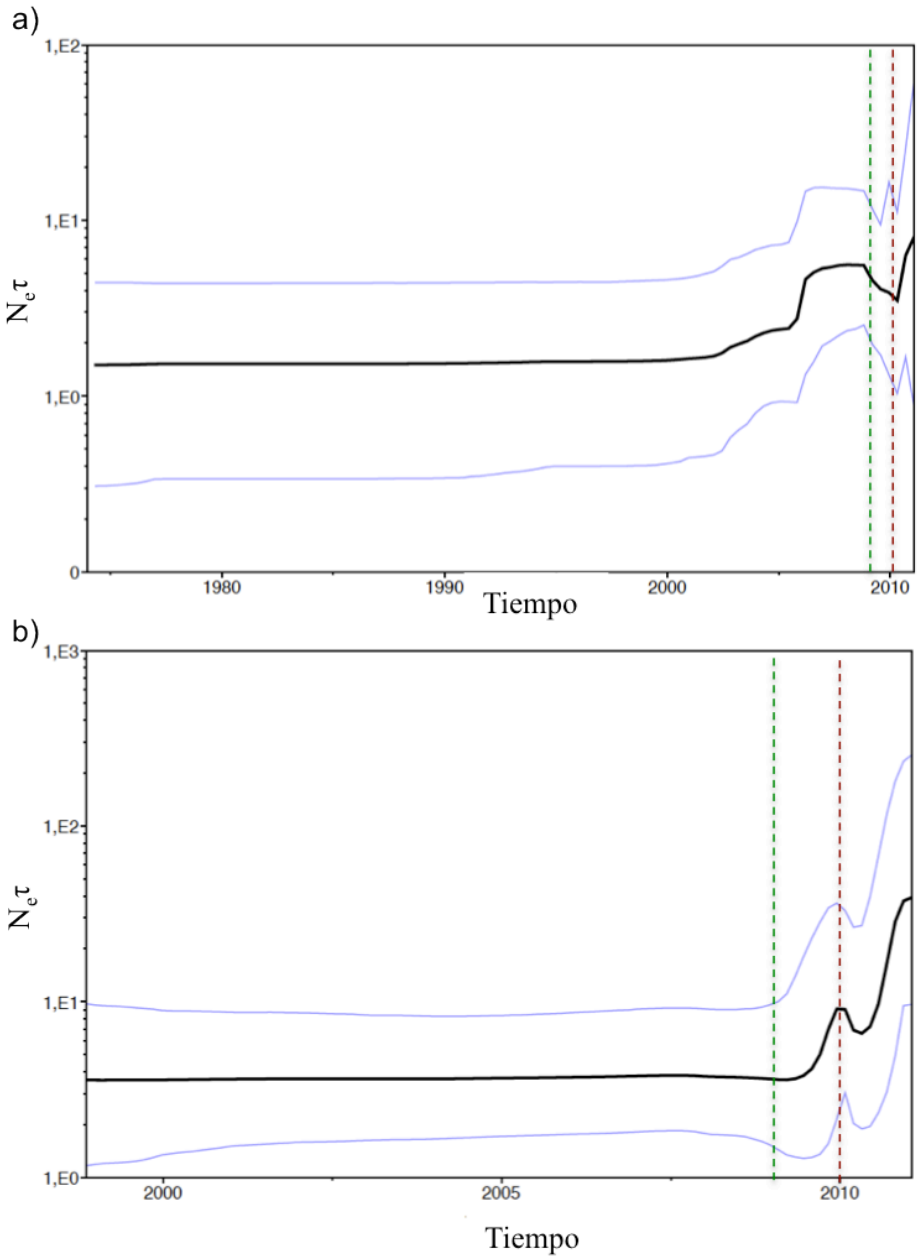


Figura 7.9: Comparación de las gráfica BSP obtenidas para NoV GII.4 (a) y GII.14 (b). Las líneas verdes, que coinciden con el comienzo del año 2009, señalan el aumento en el valor de $N_e\tau$ para GII.4 y la disminución de este valor para GII.14 durante el mismo punto en el tiempo. La línea roja, que coincide con el comienzo del año 2010, representa la disminución del valor de $N_e\tau$ para GII.4 y el aumento de este valor para GII.14 durante el mismo punto en el tiempo.

La gráfica de BSP obtenida para GII.3 (Figura 7.10a) mostró un incremento en el valor de $N_e\tau$ durante el año 2000. Este incremento en el tamaño efectivo de la población se mantuvo constante hasta 2011. En el caso de GII.7, la gráfica de BSP (Figura 7.10c) mostró una dinámica evolutiva similar a la observada para NoV GII.4, con un aumento del tamaño efectivo de la población durante los años 2006-2009. A diferencia del resto de genotipos analizados, la gráfica de BSP obtenida para GII.3 (Figura 7.10e) mostró una disminución del valor de $N_e\tau$ durante los años 2002-2010. En estos tres genotipos, especialmente en el caso de GII.3, la tasa de sustitución nucleotídica es más baja que las observadas para GII.4 y GII.14. Las gráficas de LTTP (Figura 7.10b, d, f) muestran en los tres casos un patrón de diversificación más bajo, es decir, el número de linajes a lo largo del tiempo es menor que el observado en GII.4 y GII.14.

7.2. Discusión

Pese a que NoV es el agente etiológico más importante de la gastroenteritis aguda tanto en niños como en adultos, el mecanismo responsable de la emergencia de determinadas cepas que se convierten en predominantes todavía no se conoce completamente (Hoehne y Schreier, 2006; Iturriza-Gomara y col., 2008). La mayoría de los estudios evolutivos de NoV se centran principalmente en el genotipo GII.4, dado que es el de mayor prevalencia en la población (Lindesmith y col., 2008; Victoria y col., 2009b; Bok y col., 2009; Siebenga y col., 2010). Durante los años 2010 y 2011 existió una cocirculación de diferentes genotipos de NoV GII en Galicia y, aunque NoV GII.4 fue el mayoritario, se observó también una elevada tasa de detección de NoV GII.14 durante este periodo de tiempo.

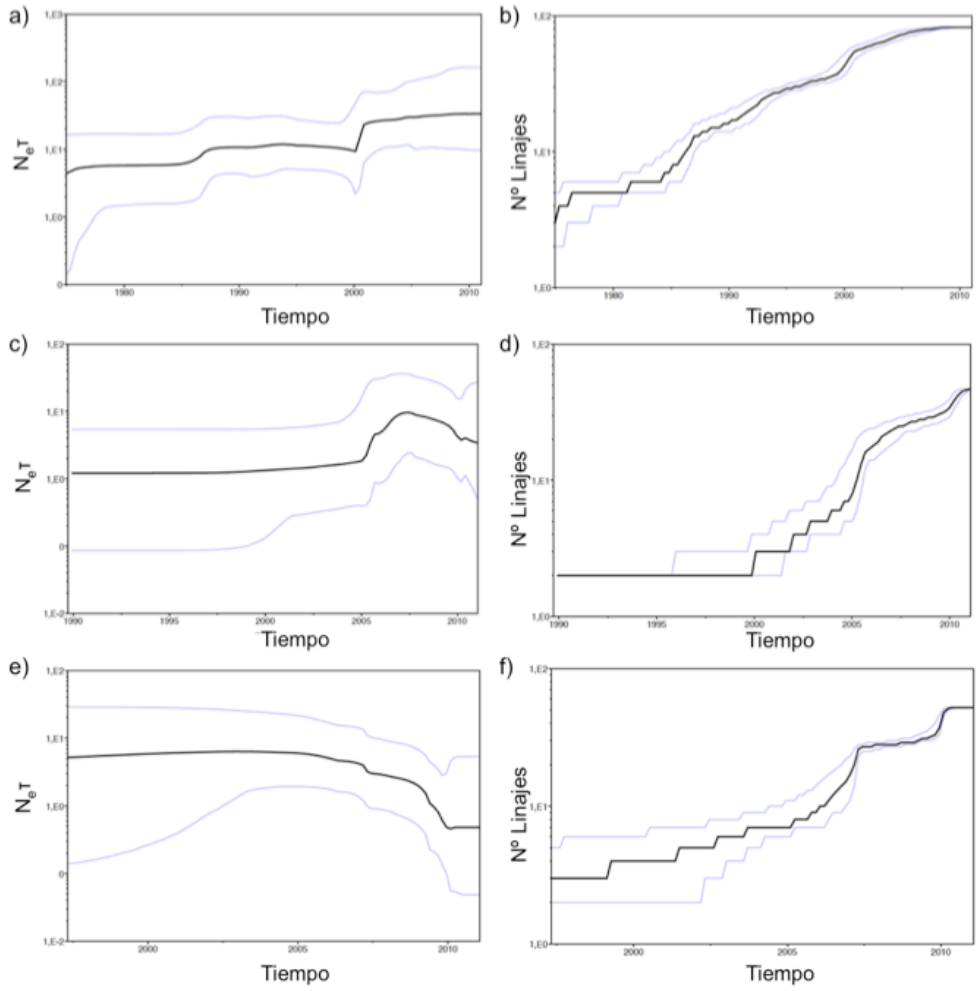


Figura 7.10: a) Gráfica BSP obtenida para NoV GII.3. b) Gráfica LTTP obtenida para NoV GII.3. c) Gráfica BSP obtenida para NoV GII.7. d) Gráfica LTTP obtenida para NoV GII.7 e) Gráfica BSP obtenida para NoV GII.13. f) Gráfica LTTP obtenida para NoV GII.13.

Con la finalidad de determinar el TMRCA de las cepas detectadas en Galicia y realizar una comparación de la dinámica poblacional de los diferentes genotipos detectados, se llevó a cabo un estudio de coalescencia mediante inferencia bayesiana.

Una pieza clave a la hora de establecer los mecanismos evolutivos de NoV es conocer la tasa a la cual se genera la diversidad genética que lleva a la fijación de mutaciones en la población viral. Como ya se ha mencionado, la mayoría de virus RNA evolucionan a una tasa de 10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (Duffy y col., 2008). El análisis de las secuencias de la región parcial de la cápside mostró que las cepas pertenecientes a los genotipos GII.3, GII.7 y GII.13 evolucionaron a una tasa comparable a esta durante el periodo de tiempo analizado. El resultado obtenido para el genotipo GII.3 coincide con lo establecido en estudios previos realizados por Boon y col. (2011). Analizando la secuencia completa de la región VP1, estos autores infirieron una tasa de sustitución nucleotídica de 10^{-3} para las cepas pertenecientes a este genotipo. La tasa de sustitución nucleotídica observada para NoV GII.4 fue mayor, con un valor de 10^{-2} sustituciones nucleotídicas por sitio por año. Este valor es similar al obtenido en otros estudios realizados mediante el análisis, tanto de la región completa del gen de la cápside, como de una región parcial (Victoria y col., 2009b). Al igual que en el caso de NoV GII.4, la tasa evolutiva observada para NoV GII.14, calculada por primera vez en este estudio, fue de 10^{-2} sustituciones nucleotídicas por sitio por año.

Las tasas evolutivas altas de determinados genotipos de NoV permitirían la generación de grupos de cepas que podrían reemplazar a las ya existentes dentro del mismo genotipo, evadiendo así la respuesta inmune del huésped constantemente (Siebenga y col., 2007b). De acuerdo

con esto, NoV GII.4, con una tasa evolutiva más alta que otros genotipos del virus, es el más detectado en la población (Lopman y col., 2004b; Kroneman y col., 2008; Siebenga y col., 2009; Bull y col., 2010). Sin embargo, los datos obtenidos del análisis de las cepas de NoV GII.14 revelaron que la tasa evolutiva observada para este genotipo es también muy elevada. Al igual que ocurre en el caso de NoV GII.4, este hecho podría estar relacionado con la alta tasa de detección de NoV GII.14 observada en la población de Galicia durante el periodo de tiempo analizado, debido probablemente a la emergencia y propagación de nuevas variantes de este genotipo (Capítulo 6). Cabe destacar que NoV GII.4 y GII.14 son, tal y como mostró el árbol MCCT obtenido del análisis conjunto de todos los genotipos, los primeros en divergir hace 83 y 54 años, respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente, las gráficas de BSP muestran la diversidad genética relativa de una población a lo largo del tiempo, reflejando el número de infecciones efectivas o replicaciones ($N_e\tau$) establecidas por el virus.

El análisis de la grafica BSP obtenida para NoV GII.4 reveló que los incrementos observados en el valor de $N_e\tau$ concuerdan con la emergencia de las variantes epidémicas 2006a, 2006b y 2010. De acuerdo con los datos de vigilancia, la variante 2002 tuvo un importante impacto en la población. Sin embargo, la emergencia de dicha variante no parece coincidir con un aumento notable del valor de $N_e\tau$ durante esos años. En estudios previos realizados por otros autores (Siebenga y col., 2010) se observó un resultado similar. Dicho resultado se debe a que las gráficas de BSP no reflejan bien los procesos de cuello de botella ocurridos en la población, por lo que se necesita analizar un número de secuencias mucho mayor del que se dispone para la región parcial de la cápside. Estos autores,

analizando secuencias del gen de la polimerasa, observan en la grafica BSP obtenida una disminución en el valor de $N_e\tau$ durante estos años, lo que demuestra que el reemplazamiento de la variante 1996 por la variante 2002 supuso una pérdida significativa y repentina de diversidad genética en la población.

El análisis de la gráfica BSP obtenida para GII.14 reveló que se produjo un notable aumento en el valor de $N_e\tau$ a finales del año 2009. A partir de ese momento, y como ocurría con la tasa de detección, se puede observar un patrón alterno de los valores de $N_e\tau$ en los genotipos GII.4 y GII.14. Este patrón alterno podría ser debido a que, tras la emergencia a nivel mundial de las variantes epidémicas GII.42006a y 2006b, la respuesta inmune producida en los individuos fomenta la aparición de nuevas variantes no sólo dentro de este genotipo, sino también de otros genotipos, como es el caso de GII.14.

Bull y col. (2010) propusieron que una tasa de evolución menor y una polimerasa con una capacidad menor de procesamiento implicarían una desventaja evolutiva de otros genotipos de NoV GII en comparación con GII.4. Esto es lo que ocurre en el caso de NoV GII.7, en el que aunque la dinámica evolutiva observada es similar a la de GII.4, la tasa de sustitución nucleotídica en este genotipo es más baja. Este resultado coincide con los obtenidos en estudios previos realizados por estos mismos autores (Bull y col., 2010), en los que se observaba que los linajes de NoV GII.7, a pesar de tener una tasa de replicación elevada, poseen una tasa de sustitución nucleotídica baja, lo que limita su capacidad de adaptación y por tanto su incidencia. En el caso de NoV GII.13, la desventaja evolutiva respecto a otros genotipos del virus viene dada tanto por una tasa de sustitución nucleotídica más baja, como por una disminución en el número de replicaciones efectivas del virus ($N_e\tau$) durante un largo periodo de

tiempo. NoV GII.3 mostró un patrón evolutivo con un tamaño efectivo de población constante desde el año 2000 al 2012. Este genotipo ha sido descrito como uno de los que más se asocian a casos esporádicos de gastroenteritis, especialmente en niños, en los que frecuentemente se identifica como el genotipo dominante (Dove y col., 2005; Phan y col., 2005; Bok y col., 2009; Barreira y col., 2010; Dey y col., 2010). Sin embargo, en Galicia, la tasa de detección para este genotipo fue baja. Esto, junto con el hecho de que las cepas gallegas de NoV GII.3 mostraron un TMRCA con una tasa de divergencia media de 23 años, indica que la emergencia de nuevas cepas en esta región geográfica es lenta.

La eficacia (*fitness*) epidemiológica de NoV GII.4 es una consecuencia de la habilidad del virus para generar diversidad genética, ya que las cepas pandémicas de NoV GII.4 están asociadas con un aumento en las tasas de replicación y mutación (Bull y col., 2010). Los resultados obtenidos para el análisis de NoV GII.14 muestran una tasa de sustitución nucleotídica y una dinámica poblacional similar a la de GII.4, lo cual apoya la hipótesis de que existen otros genotipos de NoV que evolucionan de una forma similar a GII.4, y sugiere la futura emergencia y dispersión de variantes epidémicas de estos genotipos (Iritani y col., 2008).

La caracterización exhaustiva de los patrones evolutivos de los diferentes genotipos de NoV resulta un punto crítico a la hora de desarrollar una vacuna adecuada, que ha de resultar efectiva para las cepas que con mayor probabilidad circularán en un momento dado.

8. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

8. IMPLICACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica se creó para dar cumplimiento al Real Decreto 2210/1995, con el fin de enmarcar un programa nacional de vigilancia de las enfermedades transmisibles, dando prioridad a la coordinación e intercambio de información, no sólo entre las diferentes Comunidades Autónomas de España, sino entre los diferentes países de la UE (Anónimo, 1996).

El Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria constituye uno de los sistemas de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Su finalidad es contribuir a la prevención y control de las enfermedades incluidas en la lista de declaración obligatoria. La notificación inicial del caso se basa en sospechas clínicas que, posteriormente, se exponen a criterios de confirmación microbiológicos (Centro Nacional de Epidemiología, 1996).

El Sistema de Información Microbiológica (SIM) se define como el sistema básico de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. La vigilancia microbiológica tiene como objetivo añadir especificidad a la vigilancia de las enfermedades de declaración obligatoria basada en la declaración del caso por sospecha clínica. El objetivo principal del sistema es contribuir al conocimiento de la patología infecciosa identificando los diferentes agentes etiológicos, sus principales características y detectando cambios en los patrones de presentación.

Dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria se incluyen enfermedades a vigilar por su importancia sanitaria. La hepatitis A, así como el resto de hepatitis víricas, se incluyen en esta lista, por lo que todos los casos individuales, así como los brotes de la enfermedad, han de ser notificados. Con el fin de permitir la homogeneidad y

comparabilidad de los datos, el manual de notificación del sistema de enfermedades de declaración obligatoria contiene los diferentes impresos de notificación y las definiciones de caso a efectos de vigilancia, así como cuestionarios epidemiológicos para cada una de las enfermedades (Centro Nacional de Epidemiología, 1996). En el caso de las infecciones gastrointestinales, únicamente las causadas por bacterias del género *Shigella* son de declaración obligatoria. Otros casos de gastroenteritis causados por diversos patógenos analizados de manera rutinaria se notifican al SIM de forma exclusivamente numérica.

La vigilancia de NoV se realiza a través del Sistema de Brotes, mediante el cual las distintas comunidades autónomas notifican al Centro Nacional de Epidemiología los brotes de NoV ocurridos en su territorio. La declaración de brotes es obligatoria en España para todos los médicos, tanto de instituciones públicas como privadas (Anónimo, 1996). Estos datos se completan con los resultados de los análisis virológicos, efectuados por el Centro Nacional de Microbiología y por los Departamentos de Microbiología de las Universidades de Barcelona y Valencia. Cuando las nuevas técnicas de diagnóstico estén ampliamente difundidas, se contará con información de los laboratorios de microbiología clínica.

8.1. Resultados

Con el fin de establecer la posible relación epidemiológica existente entre los casos de hepatitis A y el consumo de moluscos, se realizaron análisis filogenéticos incluyendo las cepas de HAV detectadas en muestras clínicas y en muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo.

El análisis filogenético se realizó empleando el algoritmo de NJ, incluyendo el concatenado de las secuencias de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 de las 3 cepas detectadas en muestras clínicas y de las 15 detectadas en muestras de moluscos. El árbol filogenético obtenido (Figura 8.1) reveló que todas las cepas detectadas en ambos tipos de muestras constituían un grupo monofilético robusto junto con la cepa tipo del subgenotipo IB, con un valor de bootstrap del 100%. Las cepas detectadas en muestras clínicas y de moluscos se encuentran localizadas en una única rama, con un valor de bootstrap del 88%. Las secuencias de las 3 cepas detectadas en muestras clínicas mostraron un porcentaje de similitud del 100% con todas las cepas detectadas en muestras de moluscos, excepto con la denominada B44, que fue del 99,5%.

La cepa H266 fue detectada en una muestra de un paciente de 1 año de edad en septiembre de 2010. La cepa H533 se detectó en un paciente de 3 años en octubre de 2010. En el caso de la cepa H942, la detección tuvo lugar en una muestra procedente de un paciente de 29 años durante noviembre de 2010.

En cuanto a las cepas detectadas en muestras de moluscos, B6 y B8 fueron también detectadas durante noviembre de 2010. El resto de cepas se detectaron entre marzo de 2010 y marzo de 2011.

Del mismo modo, se realizó un análisis filogenético incluyendo las secuencias de cepas de NoV detectadas en muestras clínicas y en muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo. En ambos tipos de muestras se detectaron cepas de NoV pertenecientes a los genotipos GII.4 y GII.6. Para NoV GII.4, se construyó un árbol filogenético basado en el algoritmo de NJ, incluyendo las 80 secuencias de las cepas detectadas en muestras clínicas que fueron caracterizadas como variantes 2006b y 2010, así como las 8 secuencias de las cepas detectadas en moluscos, pertenecientes

también a estas variantes (Figura 8.2). El árbol filogenético reveló que las 7 cepas detectadas en mejillones y las 10 de las detectadas en muestras clínicas caracterizadas como 2006b, constituían un grupo monofilético junto con las cepas de referencia de esta variante incluidas en el análisis, con un valor de bootstrap del 74%. Los porcentajes de similitud entre las secuencias de las cepas de estudio varió entre el 99,4% y el 100%, siendo 7 de las secuencias de las cepas detectadas en mejillón y 7 de las secuencias de las cepas detectadas en muestras clínicas, idénticas entre ellas.

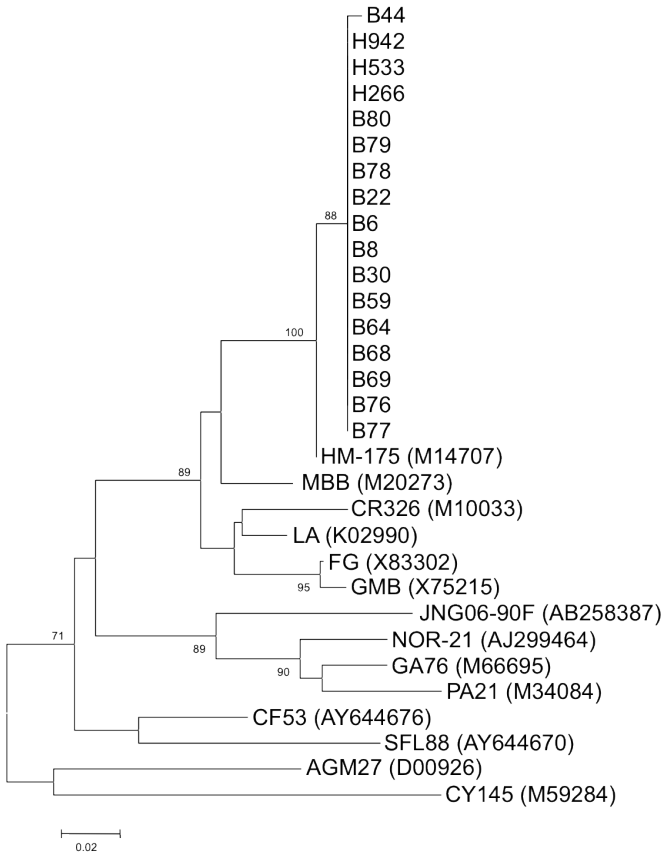


Figura 8.1: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias del concatenado de las regiones VP1-P2A y VP3-VP1 y cepas de referencia de distintos genotipos. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).



Figura 8.2: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias parciales de la cápside de NoV GII.4 2006b y 2010 (de acuerdo con la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*), cepas de referencia de estas variantes y cepas de referencia de distintos genotipos. Las cepas pertenecientes a NoV GII.4 se encuentran señaladas en negrita. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

Las 7 cepas procedentes de muestras clínicas, fueron detectadas durante el mes de agosto de 2010. Dos de estas muestras pertenecían al grupo de edad de 0-2 años. Una al de 13-18 años, 3 al de 19-59 años y 1 al grupo de edad >60 años. Las cepas procedentes de moluscos pertenecían a muestras recolectadas durante el mes de marzo de 2011.

La secuencia de la otra cepa detectada en mejillón, caracterizada como variante 2010, se localizó en el mismo grupo monofilético que 47 de las cepas detectadas en muestras clínicas. Sin embargo, esta cepa se situó en una rama independiente, agrupada junto con la cepa de referencia GII.4 2009 (Nº acceso Genebank JN595867).

Para NoV GII.6, se construyó también un árbol filogenético empleando el algoritmos de NJ. En el análisis se incluyeron las 2 secuencias de las cepas detectadas en muestras de moluscos y las 4 de las cepas detectadas en muestras clínicas (Figura 8.3). Todas las cepas formaron un grupo monofilético robusto junto con la cepa de referencia, con un valor de bootstrap del 100%. Las cepas analizadas se encontraron localizadas en dos ramas diferenciadas. Dos de las cepas detectadas en muestras clínicas se agruparon en una misma rama, con un valor de bootstrap del 100%. El porcentaje de similitud entre las secuencias de ambas cepas fue del 100%. Las otras 2 cepas detectadas en muestras clínicas y las 2 detectadas en moluscos se localizaron en la segunda rama, con un valor de bootstrap del 70%. Las dos cepas detectadas en moluscos se encontraron agrupadas junto con una de las cepas detectadas en muestras clínicas, con un valor de bootstrap del 97%.

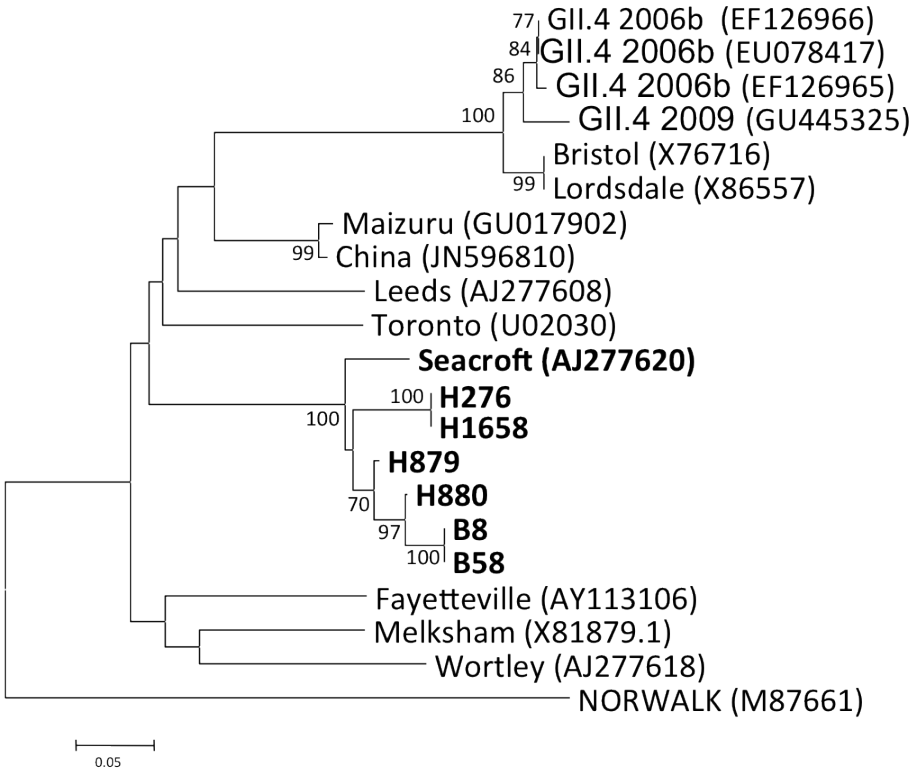


Figura 8.3: Reconstrucción filogenética mediante el algoritmo de NJ basada en secuencias parciales de la cápside de NoV GII.6 (de acuerdo con la herramienta de genotipado *Norovirus Genotyping Tool Version 1.0*) y cepas de referencia de distintos genotipos. Las cepas pertenecientes a NoV GII.6 se encuentran señaladas en negrita. Código de cepas: B, cepas detectadas en muestras de mejillón: H, cepas detectadas en muestras clínicas. La barra representa el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En cada nodo, se encuentran los valores de bootstrap superiores al 70% (1000 remuestreos).

El porcentaje de similitud observado entre las secuencias de las cepas detectadas en muestras clínicas varió entre el 92,4% y el 100%. El porcentaje de similitud entre las secuencias de las 2 cepas detectadas en muestras de moluscos fue del 100% y entre estas y la cepa detectada en muestras clínicas con la que se encuentran agrupada fue del 97,8%.

La cepa H880 se detectó en una muestra clínica durante noviembre de 2010. Las cepas B8 y B58 se detectaron en muestras de moluscos en noviembre de 2010 y en diciembre de 2011, respectivamente.

Tres de las 4 cepas detectadas en muestras clínicas procedían de pacientes del grupo de edad 0-2 años. La cepa restante se detectó en una muestra de un paciente del grupo de edad 6-12 años.

Se realizó también un análisis de coalescencia bayesiana, llevado a cabo asumiendo un reloj molecular relajado, incluyendo las secuencias de la región parcial de la cápside de las cepas de NoV GII.4 detectadas en muestras clínicas y de moluscos. En total, se analizaron 224 secuencias de cepas detectadas durante un periodo de 38 años. El árbol MCCT inferido (Figura 8.4) mostró que las cepas de moluscos de la ría do Burgo caracterizadas como 2006b evolucionaron junto con las cepas detectadas en muestras clínicas asignadas a estas mismas variantes, compartiendo un TMRCA con la cepa H115 datado del año 2010 (95% HPD 0,5-0,5).

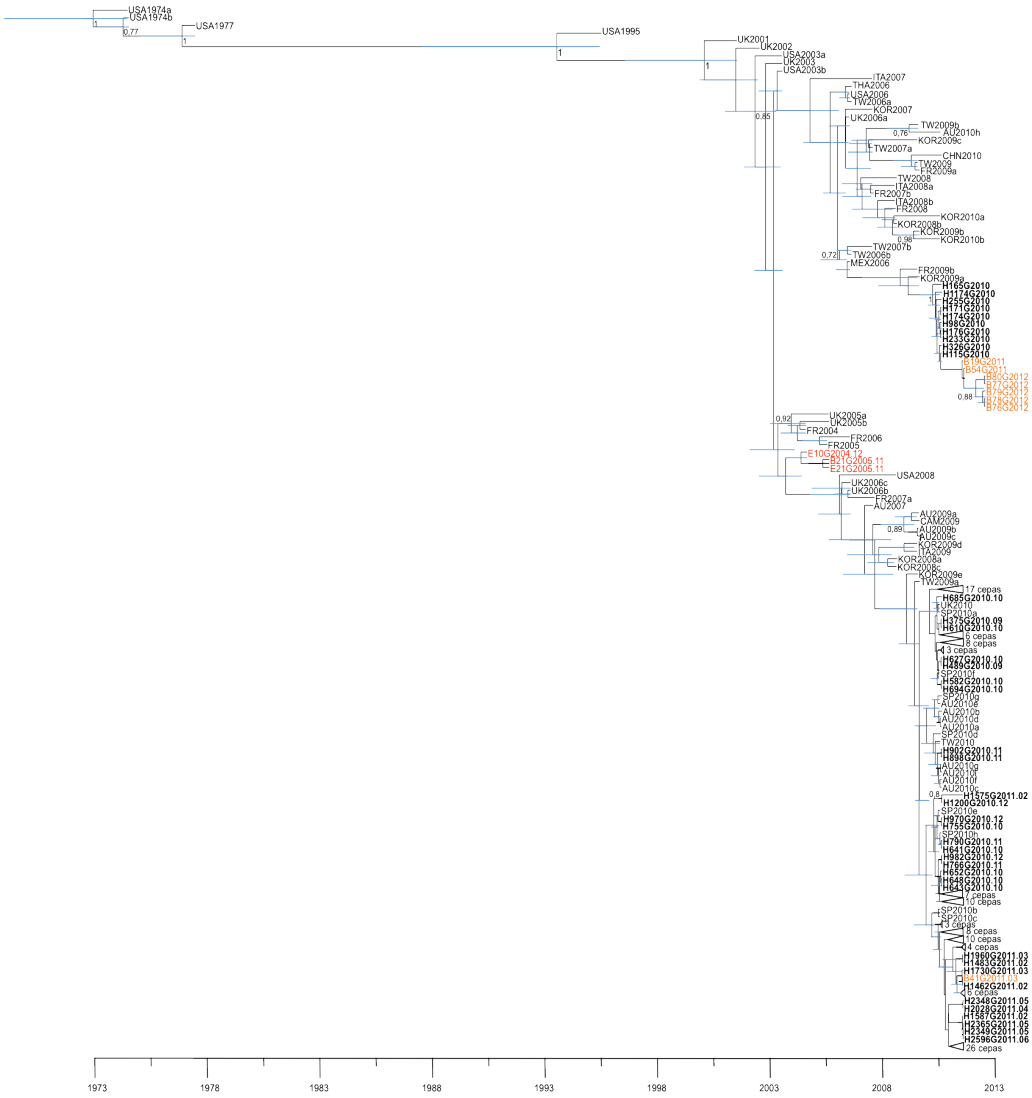


Figura 8.4: MCCT (*Maximun clade credibility tree*) de 224 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas detectadas en muestras clínicas se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Las cepas detectadas en moluscos de la ría do Burgo se encuentran representadas en naranja, y las detectadas en moluscos de la ría de Vigo en rojo. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado. (Ampliación de la figura disponible en Anexo 2).

8.2. Discusión

El análisis filogenético de las secuencias de HAV reveló que las cepas detectadas en muestras clínicas y las detectadas en moluscos formaban un único grupo de secuencias idénticas entre sí (excepto una de moluscos). Dos de las 3 cepas de muestras clínicas se detectaron en niños de 1 y 3 años, los cuales no son consumidores de moluscos. Sin embargo, y como ya se ha mencionado, las guarderías tienen un papel importante en la transmisión del virus de la hepatitis A. La cepa de HAV restante se detectó en un paciente de 29 años en noviembre de 2010. Durante este mismo mes, dos de las muestras de moluscos analizadas resultaron positivas para la presencia del virus. Estas tres cepas mostraron un porcentaje de similitud del 100%. Aunque los casos de hepatitis A son de declaración obligatoria y se realiza un cuestionario epidemiológico a los pacientes afectados, no disponemos de dicha información, lo que imposibilita asociar el caso de enfermedad al consumo de moluscos procedentes de la ría do Burgo o determinar cualquier otra vía de transmisión.

El análisis filogenético de las secuencias de NoV GII.4 reveló que las cepas pertenecientes a la variante 2006b detectadas en muestras clínicas y las detectadas en moluscos se agrupaban en una única rama. Las secuencias de cepas de moluscos presentaron un porcentaje de similitud del 100% con la mayoría de secuencias de las cepas de esta variante detectadas en muestras clínicas. La detección de las cepas de NoV pertenecientes a la variante 2006b en moluscos se observó con un retraso de 6-8 meses respecto a la detección en las muestras de pacientes, lo cual puede indicar cómo las cepas que se encuentran en la población pueden

alcanzar las zonas de cultivo de moluscos, que concentran y retienen esos patógenos.

Si bien el análisis de secuencias de las cepas de NoV puede indicar la relación existente entre el consumo de moluscos y el desarrollo de la enfermedad (Duizer y Koopmans, 2006), en nuestro estudio la ausencia de datos epidemiológicos recogidos sobre estos pacientes impide establecer de modo fehaciente dicha relación.

El análisis filogenético demuestra como la diversidad de cepas presentes en moluscos refleja la diversidad presente en la población en una misma área geográfica. Esta afirmación se basa en los resultados obtenidos en el análisis de coalescencia mediante inferencia bayesiana, el cual muestra cómo las cepas detectadas en moluscos evolucionaron junto con las cepas detectadas en la población de esa misma región. Por otro lado, apoya la inefectividad de los tratamientos de las plantas de aguas residuales en la eliminación viral. Los resultados obtenidos se ajustan al modelo de transmisión fecal-oral de los virus entéricos.

Dado que los análisis rutinarios realizados en muestras de pacientes afectados por gastroenteritis no incluyen la detección de NoV, las infecciones causadas por este patógeno en casos individuales no son notificadas a los organismos competentes. Como se ha mencionado en el Capitulo 1 de esta memoria, la inclusión de NoV en los análisis rutinarios realizados en pacientes afectados de gastroenteritis, así como la realización de encuestas epidemiológicas, permitiría no sólo establecer las principales vías de transmisión de la enfermedad en una comunidad determinada, sino informar a los organismos competentes de las infecciones por este patógeno en casos individuales, proporcionando más información sobre morbimortalidad, distribución en la población y características epidemiológicas de la enfermedad.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9. DISCUSIÓN GENERAL

Los virus entéricos están considerados como la principal causa de enfermedades asociadas al consumo de alimentos (Lees, 2000). Dentro de los virus entéricos, NoV y HAV son los más relevantes en términos epidemiológicos y en cuanto a gravedad de la enfermedad, respectivamente (Koopmans y Duzier, 2004).

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores que pueden concentrar y retener patógenos humanos que se encuentran en ecosistemas acuáticos contaminados con aguas residuales (Lees, 2000). Con el fin de producir moluscos bivalvos aptos para el consumo humano, la legislación europea recoge normativas según las cuales las zonas de crecimiento de los moluscos se clasifican en función de indicadores bacterianos de contaminación fecal. Se ha detectado la presencia de diferentes virus entéricos en moluscos bivalvos, aunque únicamente en el caso de NoV y HAV se ha podido asociar el desarrollo de brotes de enfermedad con el consumo de moluscos, los cuales en muchas ocasiones cumplían con los estándares establecidos para su comercialización (Le Guyader y col., 1996; Lees 2000; Shieh y col., 2000).

Mediante la técnica de RT-qPCR se evaluó la presencia de NoV y HAV en moluscos recolectados en siete zonas de muestreo de la ría do Burgo con diferente clasificación de la calidad de las aguas. El 18,5% de las muestras de mejillón analizadas resultaron positivas para la presencia de HAV y el 49,4%, resultaron positivas para la presencia de NoV. No se observó una correlación estadísticamente significativa entre el número de muestras de moluscos positivas para HAV y NoV y la clasificación de las zonas de moluscos en base a estándares bacterianos, por lo que el resultado obtenido apoya estudios previos que afirman que, al menos en los muestreos

realizados en estudios de duración limitada, no se observa una asociación entre los actuales sistemas de clasificación de las áreas de cultivo y la presencia de virus entéricos (Le Guyader y col., 2000; Formiga-Cruz y col., 2002; Romalde y col., 2002; Myrmel y col, 2004; Le Guyader y col., 2006a; Croci y col., 2007; Svraka y col., 2007; Le Guyader y col., 2008; Lowther y col., 2008; Vilariño y col., 2009). Este hecho, unido a la ineficacia de los métodos de depuración para eliminar la carga viral de los moluscos (Baggi y col., 2001; Kingsley y Ricahrds, 2003; Polo, 2013), evidencian la necesidad de incluir análisis para la detección de estos virus en este tipo de alimentos (Romalde, 1996; Lees, 2000). Actualmente se dispone de un protocolo estandarizado para la detección de NoV y HAV en alimentos mediante RT-qPCR (ISO/TS 15216), que permitirá incluir los controles virológicos en la legislación una vez que se hayan establecidos los límites de cuantificación viral que se consideren adecuados para determinar que el producto es apto para el consumo.

El análisis filogenético de las cepas de HAV detectadas en moluscos procedentes de la ría de Vigo y de la ría do Burgo mostró que todas ellas pertenecían al subgenotipo IB. Este resultado coincide con los obtenidos por Mesquita y col. (2011b) para la caracterización de cepas de HAV detectadas en moluscos procedentes del norte y centro de Portugal. La existencia de un único genotipo o subgenotipo de HAV en una región geográfica determinada se asocia con una circulación endémica de HAV en la población (Mbayed y col., 2002), por lo que estos resultados podrían estar indicando una circulación endémica del subgenotipo IB en la Península Ibérica.

La caracterización de las cepas de NoV detectadas en moluscos procedentes de la ría de Vigo mostró que todas ellas pertenecían al genogrupo GII. En el caso de las cepas detectadas en la ría do Burgo, el

37,5% se caracterizó como NoV GI y el 62,5% como NoV GII. Dentro del genogrupo GII, la mayoría de las cepas pertenecían al genotipo GII.4. Esta mayor tasa de detección de NoV GII.4 en las muestras de moluscos analizadas coincide con la situación observada en la población, en la que NoV GII.4 ha sido el genogrupo predominante durante los últimos años a nivel mundial (Kanerva y col., 2009; Le Guyader y col., 2009).

Las cepas de NoV son extremadamente variables, por lo que se recomienda realizar la detección de los genogrupos GI y GII en dos ensayos separados, empleando cebadores y sondas específicos para cada uno de los genotipos, diseñados en el extremo 5' del gen de la capside (Lees, 2010). Esta región es relativamente poco variable y permite el uso de cebadores conservados para la amplificación de un amplio rango de genotipos de NoV GI y GII (Kageyama y col., 2003). Sin embargo, la caracterización molecular de las cepas de NoV detectadas en moluscos reveló que no en todos los casos el genotipo asignado mediante la detección por RT-qPCR coincidía con el obtenido mediante el análisis de secuencias, poniendo de manifiesto que este protocolo resulta específico para la detección de NoV pero que la asignación de las cepas detectadas a los genogrupo GI y GII ha de ser comprobada mediante secuenciación.

Los NoV son la principal causa de brotes de gastroenteritis aguda en todo el mundo (Patel y col., 2009). Desde finales de la década de los noventa y debido al desarrollo de la PCR, se ha demostrado que los NoV son también una de las causas más comunes de casos esporádicos de gastroenteritis en personas de todas las edades en todo el mundo. Sin embargo, la prevalencia de NoV como causa de casos esporádicos de gastroenteritis aguda está mucho menos documentada y probablemente se encuentra infraestimada (Parashar y col*.,* 2004a; Kirkwood y col., 2005; Patel y col., 2008; Hall y col., 2011).

En este estudio se han analizado muestras de pacientes afectados de gastroenteritis procedentes del área sanitaria de A Coruña, con el fin de determinar el papel relativo de distintos patógenos, incluyendo bacterias y virus, en el desarrollo de la enfermedad y determinar por primera vez la incidencia de NoV como agente causal de la gastroenteritis aguda en esta región geográfica.

Los resultados obtenidos de los análisis bacterianos realizados mostraron que *Campylobacter* spp. es el agente bacteriano que se detecta con más frecuencia en pacientes con gastroenteritis, seguido de *Salmonella* spp. Este resultado coincide con los obtenidos en numerosos estudios llevados a cabo en países industrializados (Jewkes y col., 1981; Watson y col., 1986; Petersen y col., 1996; Prats y col., 1997; Jansen y col., 2008; Huhulescu y col., 2009).

Los análisis virológicos realizados en el hospital de forma rutinaria incluían la detección de RV y AdV mediante EIA. Estos análisis se realizaron únicamente cuando fue requerido por la Unidad de Pediatría. RV fue detectado en un 27,2% de las muestras analizadas, todas ellas procedentes de niños menores de 2 años. Este virus se ha descrito como el agente etiológico más común en casos de gastroenteritis en niños menores de esa edad (Parashar y col., 2003a). Sin embargo, desde la inclusión de la vacuna contra RV en el calendario de vacunación, en calidad de vacuna recomendada, se ha observado en nuestro país la tendencia a una reducción significativa de las hospitalizaciones debidas a infecciones por este patógeno, con una relación directa entre el grado de cobertura y la reducción de los ingresos hospitalarios (Martinón-Torres y col., 2012; Castilla y col., 2012). AdV, también asociado a casos de gastroenteritis en niños (Farkas y Jiang, 2007), fue detectado únicamente en el 4% de las muestras analizadas.

En el laboratorio del CIBUS se llevó a cabo la detección de HAV y

NoV mediante RT-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que el 0,2% de las muestras analizadas eran positivas para la presencia de HAV. Este resultado puede deberse a la baja tasa de incidencia de la hepatitis A en España (ECDC, 2011) y a las estrategias de vacunación de los principales grupos de riesgo. Además, las muestras de heces incluidas en este estudio pertenecen a pacientes afectados de gastroenteritis. Estas muestras se analizaron para determinar la presencia de HAV, debido a que, ocasionalmente, la infección por este virus produce diarrea. Dada a la baja tasa de detección observada durante los 6 primeros meses del estudio, no se continuó realizando los análisis para HAV durante los 6 meses posteriores.

En el 28,3% de las muestras, se observó la presencia de NoV, siendo el el patógeno detectado con más frecuencia en todos los grupos de edad, incluidos niños menores de 2 años, en los que la presencia de NoV observó más frecuentemente que la de RV. Se observaron infecciones mixtas con NoV en el 20% de las muestras en las que previamente se había detectado algún patógeno bacteriano. Aunque existen estudios que enfatizan la importancia de las infecciones concomitantes en niños con gastroenteritis, los datos sobre coinfecciones en adultos hospitalizados por esta enfermedad son escasos (Jansen y col., 2008). Sin embargo, se ha sugerido que en los casos en los que ambos patógenos contribuyen al desarrollo de la gastroenteritis en adultos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían ser más severas (Jansen y col. 2008).

Teniendo en cuenta las infecciones mixtas, el posible agente etiológico de la enfermedad pudo ser determinado en el 39,5% de los casos de gastroenteritis analizados. Este resultado coincide con los obtenidos en estudios previos realizados por Karsten y col. (2009) y Hall y col. (2011). El porcentaje de pacientes en los que no se detectó la presencia de ningún patógeno fue del 60,5%. Es importante destacar que es muy probable que

algunos de estos casos fuesen de naturaleza no infecciosa, dado que, clínicamente, no se puede diferenciar entre la gastroenteritis infecciosa y la no infecciosa. Además, la gastroenteritis podría estar producida por otros microorganismos no incluidos en este estudio o por una infección causada por otro tipo de patógeno distinto de los enteropatógenos como, por ejemplo, el virus de la gripe (de Wit y col., 2001b). La presencia en las muestras de otros virus entéricos causantes de gastroenteritis, como astrovirus o sapovirus, está siendo actualmente analizada en nuestro laboratorio.

De los genogrupos de NoV que afectan a humanos, el genogrupo GII es clínicamente el más significativo. Este genogrupo es el de mayor prevalencia y, en comparación con otros, el que más frecuentemente se encuentra asociado a brotes de la enfermedad (Bull y col., 2010). El genotipo GII.4 es el más relevante, causando el 62% de los brotes de gastroenteritis a nivel mundial (Tan y Jiang, 2005; Siebenga y col., 2007a). La elevada incidencia de las infecciones por NoV GII.4 parece estar relacionada con la aparición secuencial y la rápida expansión de nuevas variantes que evolucionan por deriva génica del gen de la cápside o por eventos de recombinación (Bull y col., 2005, 2007, 2010; Siebenga y col., 2007b). Las diferencias antigénicas de las nuevas cepas supondrían un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedador, contribuyendo a la persistencia de GII.4 en la población (Lindesmith y col., 2008; Cannon y col., 2009).

A pesar de que todas las cepas de NoV detectadas en Galicia se sometieron a la amplificación del dominio N-terminal de la cápside, solamente en el 41% de los casos se obtuvo un amplímero y una secuencia óptima del mismo para el posterior genotipado de las cepas. Estudios previos realizados por McAllister y col. (2012) y Mans y col. (2013)

muestran resultados similares. Probablemente estos resultados sean debidos a que la diversidad existente en las cepas de NoV es extremadamente alta e, incluso en las regiones más conservadas del genoma, se encuentra una amplia variedad de SNPs que dificultan el diseño de cebadores adecuados para la amplificación de todas las cepas de NoV pertenecientes a los distintos genotipos (Kageyama y col., 2003; Loisy y col., 2005a).

Las cepas de NoV detectadas en muestras clínicas de Galicia se clasificaron en ocho genotipos diferentes, indicando la elevada diversidad de NoV incluso en una región geográfica limitada. Esta diversidad es similar a la observada por otros autores (Ferreira y col., 2010; Mahar y Kirkwood, 2011; McAllister y col., 2012). El genotipo GII.4 fue el mayoritario (45,4%) durante todo el periodo de tiempo y en todos los grupos de edad analizados. Este resultado coincide con el obtenido en numerosos estudios epidemiológicos y de vigilancia llevados a cabo recientemente en brotes de la enfermedad en distintas zonas geográficas (Lopman y col., 2004b; Kroneman y col., 2008; Siebenga y col 2009; Bull y col., 2010). Se observó también una elevada incidencia del genotipo GII.14 (34,9%). Los otros genotipos detectados fueron GII.1 (0,6%), GII.3 (1,6%), GII.6 (1,3%), GII.7 (6,9%), GII.12 (1,9%) y GII.13 (7,2%).

El 7,2% de las cepas de NoV GII.4 se caracterizaron como variante 2006b y el 50,3% como variante 2010. Los resultados obtenidos mostraron que, en Galicia, la variante 2010 reemplazó a la variante 2006b durante los meses de verano del año 2010. Diversos autores informan de resultados similares obtenidos de estudios realizados en Europa, Asia y América (Kroneman y col., 2008; Kaplan y col., 2011; McAllister y col., 2011; Vega y col., 2011; Payne y col., 2013). El 35,2% de las cepas de NoV GII.4 analizadas se caracterizaron como pertenecientes a la nueva variante emergente Sydney 2012. Esta nueva variante ha sido descrita como la

responsable de un elevado número de brotes de gastroenteritis durante los últimos meses de 2012 (Bennett y col., 2013; Fonager y col., 2013; van Beek y col., 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos del genotipado de las cepas de NoV detectadas en Galicia revelan que esta nueva variante podría haber estado circulando desde el invierno de 2010/2011, al menos en el suroeste europeo.

El 7,4% de las cepas de NoV GII.4 no pudieron ser asignadas a ninguna variante específica. Estas cepas podrían constituir nuevas variantes emergentes originadas por deriva génica del gen de la capside o bien ser cepas recombinantes. Aunque la secuenciación de la región N-terminal del gen de la cápside está descrita como una buena herramienta para el genotipado de las cepas de NoV (Kojima y col., 2002), la secuenciación del gen VP1 completo podría incrementar la señal filogenética, proporcionando así una asignación de las variantes más exacta (Kroneman y col., 2011). Por este motivo, se necesitan más estudios analizando la región completa del genoma que codifica para la proteína de la cápside VP1, así como la región de unión completa de las ORF1/ORF2, debido a su condición de punto frecuente de recombinación.

Ocasionalmente se han detectado incrementos en la prevalencia de otros genotipos de NoV a parte de GII.4 (Lewis y col., 1997; Iritani y col., 2000; Koopmans y col., 2000). De acuerdo con diversos estudios, estos genotipos podrían evolucionar de forma similar a GII.4, lo cual sugiere la posibilidad de que emerjan y se expandan nuevas variantes (Iritani y col., 2008). Durante los meses de estudio, se detectaron cepas de NoV pertenecientes a otros 7 genotipos además de GII.4. De estos 7 genotipos, el mayoritario fue el GII.14, aunque también se detectó un número considerable de cepas pertenecientes a GII.7 y GII.13. En el caso de NoV GII.14, se observó un patrón de detección opuesto al de NoV GII.4. Este

comportamiento podría atribuirse a la inmunidad adquirida en la población tras la infección por una determinada cepa hasta ese momento predominante, fomentando la expansión de otras cepas distintas, bien pertenecientes al mismo genotipo, o a genotipos distintos (Iritani y col., 2008). Esta es la primera vez que se detecta una alta prevalencia del genotipo GII.14 en España. Estudios previos realizados en otras regiones del país en los que se analizaron brotes de gastroenteritis, describen el genotipo GII.4 como la causa mayoritaria de la enfermedad, aunque también se han detectado brotes de gastroenteritis asociados a los genotipos GII.1, GII.2 y GII.6 (Dominguez y col., 2008; Martinez y col., 2008; Barrabeig y col., 2010). Al igual que en el caso de las cepas de GII.4, se necesitan análisis de regiones mayores del genoma con el fin de confirmar la posibilidad de la emergencia de nuevas variantes o cepas recombinantes.

Con el fin de obtener una visión de los mecanismos evolutivos de diferentes genotipos de NoV y, en particular, de la población de NoV GII detectada en Galicia, se realizó un estudio de coalescencia mediante inferencia bayesiana. Mediante esta metodología se infirió la tasa evolutiva y la dinámica poblacional en el tiempo de diferentes genotipos de NoV, así como el TMRCA de las cepas gallegas.

La tasa de sustitución nucleotídica observada para NoV GII.4 fue de 10^{-2} sustituciones nucleotídicas por sitio por año. Este valor es similar al obtenido en otros estudios (Victoria y col., 2009a). La tasa evolutiva para NoV GII.14, calculada por primera vez en este estudio, fue también de 10^{-2} sustituciones nucleotídicas por sitio por año. En el caso de NoV GII.3, GII.7 y GII.13, la tasa evolutiva observada fue de 10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año, al igual que la descrita para la mayoría de virus RNA (Duffy y col., 2008). Se ha sugerido que genotipos como GII.3 o GII.7 podrían tener una desventaja evolutiva en comparación con GII.4, debido a

una tasa de evolución menor y a una polimerasa con una menor capacidad de procesamiento (Bull y col., 2010). El resultado obtenido para el genotipo GII.3 coincide con lo establecido en estudios previos realizados por Boon y col. (2011).

Las altas tasas evolutivas de determinados genotipos de NoV permitirían la generación de grupos de cepas que reemplazasen a las ya existentes dentro del mismo genotipo, evadiendo así la respuesta inmune del huésped constantemente (Siebenga y col., 2007b). De acuerdo con esto, NoV GII.4, el cual tiene una tasa evolutiva más alta que otros genotipos del virus, es normalmente el más detectado en la población (Lopman y col., 2004b; Kroneman y col., 2008; Siebenga y col., 2009; Bull y col., 2010). Sin embargo y, como ya se ha mencionado, los datos obtenidos del análisis de las cepas de NoV GII.14 revelaron que la tasa evolutiva observada para este genotipo es también muy elevada. Al igual que ocurre en el caso de NoV GII.4, este hecho podría estar relacionado con la alta tasa de detección de NoV GII.14 observada en la población de Galicia durante el periodo de tiempo analizado, debido a la emergencia y propagación de nuevas variantes de este genotipo. Cabe destacar que NoV GII.4 y GII.14 son, tal y como mostró el árbol MCCT obtenido del análisis conjunto de todos los genotipos, los primeros en divergir hace 83 y 54 años, respectivamente.

El análisis de la gráfica BSP obtenida para NoV GII.4 reveló que los incrementos observados en el valor de $N_e\tau$ concuerdan con la emergencia de las variantes epidémicas 2006a, 2006b y 2010. Por su parte, este mismo análisis para GII.14, indicó que se produjo un notable aumento en el valor de $N_e\tau$ a finales del año 2009. A partir de ese momento, y como ocurría con la tasa de detección, se puede observar un patrón alterno de los valores de $N_e\tau$ en los genotipos GII.4 y GII.14. Este patrón alterno podría ser debido a que tras la emergencia a nivel mundial de las variantes epidémicas GII.4

2006a y 2006b, la respuesta inmune producida en los individuos fomentaría la aparición en esta región geográfica de nuevas variantes no sólo dentro de este genotipo, sino también de otros genotipos, como es el caso de GII.14.

El análisis de la BSP obtenida para NoV GII.7 mostró una dinámica evolutiva para este genotipo similar a la de GII.4. Sin embargo, la tasa de sustitución nucleotídica en este genotipo es más baja, lo que supondría una desventaja evolutiva (Bull y col., 2010). En el caso de NoV GII.3 y NoV GII.13, la desventaja evolutiva respecto a otros genotipos del virus viene dada tanto por una tasa de sustitución nucleotídica más baja como por un número de replicaciones efectivas del virus ($N_e\tau$) que permanece constante o disminuye durante un largo periodo de tiempo.

La *fitness* epidemiológica de NoV GII.4 es una consecuencia de la habilidad del virus para generar diversidad genética, ya que las cepas pandémicas de NoV GII.4 están asociadas con un aumento en las tasas de replicación y mutación (Bull y col., 2010). Los resultados obtenidos para el análisis de NoV GII.14 muestran una tasa de sustitución núcleotidica y una dinámica poblacional similar a la de GII.4, lo cual apoya la hipótesis de que existen otros genotipos de NoV que evolucionan de una forma similar a GII.4, sugiriendo la futura emergencia y dispersión de variantes epidémicas de estos genotipos (Iritani y col., 2008).

La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica fue creada de acuerdo con el Real Decreto 2210/1995, con la finalidad de enmarcar un programa nacional de vigilancia de las enfermedades transmisibles (Anónimo, 1996). La hepatitis A y las infecciones gastrointestinales causadas por *Shigella* spp. se encuentran incluidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (Centro Nacional de Epidemiología, 1996). Otros casos de gastroenteritis causados por diversos patógenos son también notificados, aunque de forma exclusivamente numérica. La vigilancia de NoV se realiza

únicamente a través del Sistema de Brotes, mediante el cual se notifican al Centro Nacional de Epidemiología los brotes de NoV ocurridos en cada Comunidad Autónoma.

Con el fin de establecer la posible relación epidemiológica existente entre los casos de hepatitis A o gastroenteritis causada por NoV y el consumo de moluscos, se realizaron análisis filogenéticos incluyendo las cepas de HAV y NoV detectadas en muestras clínicas y en muestras de moluscos procedentes de la ría do Burgo.

La detección de las cepas de NoV pertenecientes a la variante 2006b en moluscos se observó con un retraso de 6-8 meses respecto a la detección en las muestras de pacientes. El análisis filogenético demuestra cómo la diversidad de cepas presentes en moluscos refleja la diversidad presente en la población en una misma área geográfica. Por otro lado, apoya la inefectividad de los tratamientos de las plantas de aguas residuales en la eliminación viral. Los resultados obtenidos se ajustan al modelo de transmisión fecal-oral de los virus entéricos.

Se ha demostrado que el análisis de secuencias de las cepas de NoV puede ayudar a determinar la relación existente entre el consumo de moluscos y el desarrollo de la enfermedad (Duizer y Koopmans, 2006). No obstante, es necesario contar con información epidemiológica de los casos en cuestión para poder establecer de forma fehaciente dicha relación. En el caso de hepatitis A incluido en este estudio, no disponemos de la información epidemiológica recogida en el hospital, lo que imposibilita asociar los casos de enfermedad al consumo de moluscos procedentes de la ría do Burgo o determinar cualquier otra vía de transmisión. Asimismo, el análisis de NoV de forma rutinaria en casos de gastroenteritis y la realización de encuestas epidemiológicas a los pacientes ayudaría a conocer las principales vías de transmisión de la enfermedad en una comunidad

determinada y proporcionaría más información sobre morbimortalidad, distribución en la población y características epidemiológicas de la enfermedad.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La tasa de detección y los niveles de contaminación observados para NoV y HAV en muestras de moluscos apoya la falta de asociación existente entre los actuales sistemas de clasificación de las áreas de cultivo de moluscos basados en estándares bacterianos y la presencia de virus entéricos.

2. Debido a la elevada diversidad existente en las cepas de NoV, el protocolo de RT-qPCR resulta específico para la detección de NoV, pero la asignación de las cepas detectadas a los genogrupos GI y GII ha de ser comprobada mediante secuenciación.

3. Al menos en el área sanitaria de A Coruña, NoV es el principal agente etiológico de casos esporádicos de gastroenteritis en todos los grupos de edad, incluyendo niños, en los que este patógeno se detecta más frecuentemente que RV.

4. La caracterización de todas las cepas de HAV detectadas en moluscos de Galicia como subgenotipo IB, junto con los resultados obtenidos por otros autores en el norte y centro de Portugal, podría estar indicando una circulación endémica de este subgenotipo en el Noroeste de la Península Ibérica.

5. El genotipo mayoritario en muestras clínicas fue GII.4. Además de cepas pertenecientes a las variantes 2006b y 2010, se detectaron cepas pertenecientes a la nueva variante emergente Sydney 2012, la cual parece haber estado circulando desde el invierno de 2010/2011, al menos en el suroeste europeo.

6. Se observó también una alta prevalencia del genotipo GII.14. La tasa de sustitución nucleotídica y la dinámica poblacional observada para GII.14 es similar a la de GII.4, apoyando la hipótesis de que otros genotipos de NoV evolucionan de una forma similar a GII.4, sugiriendo la probavilidad de emergencia y dispersión de nuevas variantes epidémicas de estos genotipos.

7. Los análisis filogenéticos de las cepas de NoV detectadas en muestras clínicas y de moluscos demuestran cómo la diversidad de cepas presentes en moluscos refleja la diversidad presente en la población en una misma área geográfica, poniendo de manifiesto la inefectividad de los tratamientos de las plantas de aguas residuales en la eliminación viral.

11. BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

Abad, F.X., Pintó, R.M., Bosch, A. (1994) Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:3704-3710.

Adamson, W.E., Gunson, R.N., Maclean, A., Carman. W.F. (2007) Emergence of a new norovirus variant in Scotland in 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:4058-4060.

Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, AEMPS (2010) Nota informativa: Liberación de lotes de la vacuna Rotateq®. http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/calidad/2010/NI-circovirus-rotateq noviembre-2010.htm

Altmeyer, R., Girard, M., van der Werf, S., Mimic, V., Seigneur, L., Saron, M.F. (1995) Attenuated Mengo Virus: a new vector for live recombinant vaccines. *Journal of Virology,* 5:3193-3196.

Anderson, D.A., Ross, B.C. (1990) Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *Journal of Virology,* 64:5284-5289.

Ando, T., Noel, J.S., Fankhauser, R.L. (2000) Genetic classification of ‘‘Norwalk-like viruses’’. *Journal of Infectious Disease*, 181:336-348.

Ang, L.H. (1998) An outbreak of viral gastroenteritis associated with eating raw oysters. *Communicanle Disease and Pulic Health,* 1:38-40.

Anónimo (1991) Directiva del Consejo del 15 de julio de 1991 acerca de las condiciones sanitarias para la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos (91/942/EEC). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268:1-14.

Anónimo (1996) Real Decreto 2210/1995 de 28 de diciembre de creación de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Boletín Oficial del Estado,* 21: 2153-2158.

Anónimo (2003) Real decreto 140/2003 del 7 de febrero de 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consume humano. *Boletín Oficial del Estado*, 45:7228-7245.

Anónimo (2004a) Directiva 2004/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de Abril de 2004, por la que se derogan determinadas directivas que establecen las condiciones de higiene de los productos alimenticios y las condiciones sanitarias para la producción y comercialización de determinados productos de origen animal destinados al consumo humano y se modifican las Directivas 89/662/CEE y 92/118/CEE del Consejo y la Decisión 95/408/CE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L195:12-15.

Anónimo (2004b) Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L226: 3-21.

Anónimo (2004c) Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L226:22-82.

Anónimo (2004d) Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L226:83-127.

Anónimo (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucoronidase-positive *Escherichia coli*. Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. ISO/TS16649-3. *International Organization for Standardisation*. Geneva. Switzerland.

Anónimo (2006a) Directiva 2006/113/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de Diciembre de 2006, relativa a la calidad exigida a las aguas para cría de moluscos. *Diario Oficial de la Unión Europea,* L376:14-20.

Anónimo (2006b) Orden del 8 de septiembre de 2006 por la que se declaran y clasifican las zonas de producción de loluscos bivalvos y otros invertebrados marinos en aguas de la competencia de la Comunidad Autónoma de Galicia. *Diario Oficial de Galicia*, 177:13991-14000.

Anónimo (2006c) Corrección de los errores de la Orden del 8 de septiembre de 2006 por la que se declaran y clasifican las zonas de producción de loluscos bivalvos y otros invertebrados marinos en aguas de la competencia de la Comunidad Autónoma de Galicia. *Diario Oficial de Galicia,* 235:17955-17963.

Anónimo (2008a) Commission regulation (EC) No 1021/2008 of 17 October 2008 amending Annexes I, II and III to Regulation (EC) No 854/2004 laying down specific rules for the organization of official controls on products of animal origin intended for human consumption and Regulation (EC) No 2076/2005 as regards live bivalve molluscs, certain fishery products and staff assisting with official controls in slaughterhouses. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L277:15-17.

Anónimo (2008b) Norovirus outbreak in an elementary school-District of Columbia, February 2007. *Morbility and Mortality Weakly Report*, 56:1340-1343.

Apairemarchais, V., Robertson, B.H., Aubineauferre, V., Leroux, M.G., Leveque, F., Schwartbrod, L., Billaudel, S. (1995) Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Applied Enviromental Microbiol*ogy, 61:3977-3980.

Appleton, H., Palmer, S.R., Gilbert, R.J. (1981) Foodborne gastroenteritis of unknown aetiology: a virus infection?. *British Medical Journal (Clinical Research Ed)*, 282:1801-1802.

Appleton, H., Pereira, M.S. (1977) A possible virus aetiology in outbreaks of food poisoning from cockles. *Lancet*, 1:780-781.

Atmar, R.L., Estes, M.K. (2001) Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:15-37.

Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G., Estes, M.K. (1995) Detection of norwalk virus and hepatitis a virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology,* 61:3014-3018.

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y. (2008) Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging Infectious Disease,* 14:1553-1557.

Baggi, F., Demarta, A., Peduzzi, R. (2001) Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research in Microbiology*, 152:743-751.

Balayan, M.S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketilazde, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A. P., Poleschuk, V. F. (1983) Evidence for a virus in non-A, non- B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Intervirology,* 20:23-31.

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 Infectious Disease*, 10:269.

Barreira, D.M., Ferreira, M.S., Fumian, T.M., Checon, R., de Sadovsky, A.D., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Spano, L.C. (2010) Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Virology,* 47:60-64.

Barry, A.F., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A. (2008) Calicivirus animal. *Ciencias Agrárias*, 29:933-946.

Bayer, M.E., Blumberg, B.S., Werner, B. (1968) Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*, 218:1057-1059.

Bedford, A.J., Williams, G., Bellamy, A.R. (1978) Virus accumulation by the rock oyster Crassotrea glomerata. *Applied and Environmental Microbiol*ogy, 35:1012-1018.

Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, K.Y. (2003) In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *Journal of Virology*, 77:10957-10974.

Bennett, S., Maclean, A., Miller, R., Aitken, C., Gunson, R. (2013) Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveillance*, 18:20349

Berg, D.E., Kohn, M.A., Farley, T.A., McFarland, L.M. (2000) Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *Journal of Infectious Disease*, 181:381-386.

Berg, G., Metcalf, T.G. (1978) Indicator of virus. In: Indicators of virus in water and food. Berg, G. (Ed.) Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, USA, 267-296.

Berg, O., Børsheim, K.Y., Bratbak, G., Hendal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340:467-468.

Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M., Estes, M.K. (2003) The 3V end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the capsid protein VP1: a novel function for theVP2 protein. *Journal of Virology*, 77:11603-11615.

Binn, L.N., Bancroft, W.H., Lemon, S.M., Marchwicki, R.H., LeDuc J.W., Trahan, C.J., Staley, E.C., Keenan, C.M. (1986) Preparation of a prototype inactivated hepatitis A virus vaccine from infected cell cultures. *Journal of Infectious Disease*, 153:749-756.

Blacklow, N.R.,Dolin, R., Fedson, D.S., DuPont, H., Northrup, R.S., Hornick, R.B., Chanock, R.M. (1972) Acute infectious noubacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff conference at the Clinical Center of the National Institutes of Health. *Annals of International Medicine*, 76:993-1008.

Blanton, L.H., Adams, S.M., Beard, R.S., Wei, G., Bulens, S.N., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Monroe, S.S. (2006) Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *Journal of Infectious Disease*, 193:413-421.

Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., Kapikian, A.Z., Green, K.Y. (2009) Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *Journal of Virology*, 83:11890-11901.

Boon, D., Mahar, J.E., Abente, E.J., Kirkwood, C.D., Purcell, R.H., Kapikian, A.Z., Green, K.Y., Bok, K. (2011) Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *Journal of Virology*, 85:8656-8666.

Børsheim, K.Y. (1993) Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiology Ecology*, 102:141-159.

Bosch, A. (1986) Virus entéricos contaminados en aguas contaminadas. *Mundo científico*, 88:156-161.

Bosch, A. (1998) Human enteric viruses in the water environment: A minireview. *International Microbiol*ogy, 1:191-196.

Bosch, A., Abad, F.X., Gajardo, R., Pintó, R.M. (1994) Should shellfish be purified before public consumption? *Lancet*, 344:1024-1025.

Bosch, A., Sanchez, G., Le Guyader, F., Vanaclocha, H., Haugarreau, L., Pinto, R. M. (2001) Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology*, 43:61-65.

Bostock, A.D., Mepham, P., Phillips, S. (1979) Hepatitis A infection associated with the consumption of mussels. *Journal of Infection,* 1:171-177.

Bower, W.A., Nainan, O.V., Han, X., Margolis, H.S. (2000) Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *The Journal of Infectious Diseases,* 182:12-17.

Brown, E.A., Zajac, A.J., Lemon, S.M. (1994) In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *Journal of Virology*, 68:1066-1074.

Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Rodríguez Díaz, J., García Díaz, A., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., Bosch, A. (2002) Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *Journal of Clinical Microbiology,* 40:2854-2859.

Buesa, J., Montava, R., Abu-Mallouh, R., Fos, M., Ribes, J.M., Bartolomé, R., Vanaclocha, H., Torner, N., Domínguez, A. (2008) Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *Journal of Medical Virology*, 80:1288-1295.

Bull, R.A., Eden, J.S., Rawlinson, W.D., White, P.A. (2010) Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathogens,* 6:e1000831.

Bull, R.A., Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A. (2005) Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infectious Disease*, 11:1079-1085.

Bull, R.A., Tanaka, M.M., White, P.A. (2007) Norovirus recombination. *Journal of General Virology,* 88:3347-3359.

Bull, R.A., Tu, E.T., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A. (2006) Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:327-333.

Burroughs, J.N., Brown, E. (1974) Physico-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses. *Journal of General Virology*, 22:281-286.

Callahan, K.M., Taylor, D.J., Sobsey, M.D. (1995) Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water science and Technology*, 31:189-193.

Cannon, J. L., Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Saxe, L., Baric, R.S., Vinje, J. (2009) Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *Journal of Virology*, 83:5363-5374.

Castilla, J., Beristain, X., Martínez-Artola, V., Navascués, A., García Cenoz, M., Alvarez, N., Polo, I., Mazón, A., Gil-Setas, A., Barricarte, A. (2012) Effectiveness of rotavirus vaccines in preventing cases and hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Navarre, Spain. *Vaccine,* 30:539-543.

Centro Nacional de Epidemiología. (1996) Protocolos de las enfermedades de declaraciónobligatoria. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

Chakravarty, S., Hutson, A.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V. (2005) Evolutionary trace residues in Noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *Journal of Virology*, 79:554-568.

Chalmers, J.W.T., Mcmillan, J.H. (1995) An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiology and Infect*ion, 115:163-167.

Charles, K.J., Souter, F.C., Baker, D.L., Davies, C.M., Schijven, J.F., Roser, D.J., Deere, D.A., Priscott, P.K., Ashbolt, N.J. (2008) Fate and transport of viruses during sewage treatment in a mound system. *Water Research*, 42:3047-3056.

Choo, Q.L, Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D. W., Houghton, M. (1989) Isolation of cDNA clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science,* 244:359-362.

Clarke, I.N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S., Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G., Neill, J.D., Radford, A., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.J., Vinjé, J. (2012) Caliciviridae. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. In: The ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Ed.). Springer-Verlag, Walham, MA, USA, 977-986.

Clarke, S.K.R., Cook, G.T., Egglestone, S.I., Hall, T.S., Miller, D.L., Reed, S.E., Rubenstein, D., Smith, A.J., Tyrrell, D.A.J. (1972) A virus from epidemic vomiting disease. *British Medical Journal*, 3:86-89.

Cohen, J.I., Rosenblum, B., Ticehurst, J.R., Daemer, R.J., Feinstone, S.M., Purcell, R.H. (1987) Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA*, 84:2497-2501.

Comité Asesor de Vacunas de la AEP, grupo de expertos de la AEEH. (1998) Recomendaciones para el uso de la vacuna de la hepatitis A en guarderías. *Gastroenterología y Hepatología,* 21:346-351.

Conaty, S., Bird, P., Bell, G., Kraa, E., Grohmann, G., McAnulty, J.M. (2000) Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiology and Infection*, 124:121-130.

Costa-Mattioli, M., Di Napoli, A., Ferré, V., Billaudel, s., Perez-Bercoff, R., Cristina, J. (2003) Genetic variability of Hepatitis A Virus. *Journal of General Virology,* 84:3191-3201.

Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M. (2006) Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied Environmental Microbiology,* 72:3846-3855.

Cristina, J., Costa-Mattioli, M. (2007) Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A Virus. *Virus Research,* 127:151-157.

Croci, L., Nadia, M., Suffredini, E., Pavoni, E., Di Pasquale, S., Fallacara, F., Arcangeli, C. (2007) Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *International Journal of Food Microbiology*, 114:252-257.

Cromeans, T., Sobsey, M.D., Fields, H.A. (1987) Development of a plaque assay for a cythopatic, rapidly replicatingisolate of hepatitis A virus. *Journal of Medical Virology,* 22:45-46.

Cubitt, D., Bradley, D.W., Carter, M.J., Chiba, D., Estes, M.K., Saif, L.J., Schaffer, F.L., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.J. (2003) Caliciviridae. www.ncbi.nlm.nih.gov./ICTVdb.

Cumming, J.D., McEvedy, C.P. (1969) An outbreak of 'winter vomiting disease' in a university hall of residence. Journal of Hygiene, 67:147-152.

Cuthbert, J.A. (2001) Hepatitis A: old and new. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:38-58.

da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S. (2007) Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Applied Environmental Microbiology,* 24:7891-7897.

de Paula, V. S., Villar, L .M., Coimbra Gaspar, A. M. (2003) Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. *Brazilian Journal Infection Disease,* 7:135-141.

de Wit, M.A., Koopmans, M.P., Kortbeek, L.M., van Leeuwen, N.J., Bartelds, A.I., van Duynhoven, Y.T. (2001b) Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerging Infectious Disease*, 7:82-91.

de Wit, M.A., Koopmans, M.P., Kortbeek, L.M., Wannet, W.J., Vinje, J., van Leusden, F., Bartelds, A.I., van Duynhoven, Y.T. (2001a) Sensor, a population based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *American Journal of Epidemiology*, 154:666-674.

de Wit, M.A., Koopmans, M.P., van Duynhoven, Y.T. (2003) Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Disease*, 9:1563-1570.

Dedman, D., Laurichesse, H., Caul, E.O., Wall, P.G. (1998) Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiology and Infection*, 121:139-149.

Deng, M.Y., Day, S.P., Cliver, D.O. (1994) Detection of hepatitis A virus in envirtonmetal samples by antigen-capture PCR. *Applied Environmental Microbiology,* 60:1927-1933.

Desenclos, J.C.A., Klontz, K.C., Wilder, M.H., Nainan, O.V., Margolis, H.S., Gunn, R.A. (1991) A multistate outbreaak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *American Journal of Public Health,* 81:1268-1272.

Dey, S.K., Phathammavong, O., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ohta, Y., Ushijima, H. (2010) Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29:e32-4.

Di Girolamo, R., Liston, J., Matches, J. (1977) Ionic binding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 33:19-25.

Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Buscho, R.F., Wyatt, R.G., Kasel, J.A., Hornick, R., Chanock, R.M. (1972) Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140:578-583.

Domínguez, A., Torner, N., Ruíz, L., Martínez, A., Barrabeig, I., Camps, N., Godoy, P., Minguell, S., Parrón, I., Pumarés, A., Sala, M.R., Bartolomé, R., Pérez, U., de Simón, M., Montava, R., Buesa, J. Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. (2008) Etiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *Journal of Clinical Virology,* 43:126-131.

Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E., Manrubia, S.C. (2005) Quasispecies dynamics and RNA virus extinction.*Virus Research*, 107:129-139.

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., Baric, R.S. (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews,* 225:190-211.

Doré, W.J., Henshilwood, K., Lees, D.N. (2000) Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Applied and Environmental Microbiology,* 66:1280-1285.

Doré, W.J., Mackie, M., Lees, D.N. (2003) Levels of Male-Specific Rna Bacteriophage and Escherichia Coli in Molluscan Bivalve Shellfish From Commercial Harvesting Areas. *Letters in Applied Microbiology*, 36:92-96.

Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U., Vallbracht, A. (2005) IgA-coated particles of hepatitis A virus are translocalized antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of General Virology*, 86:2747-2751.

Dove, W., Cunliffe, N.A., Gondwe, J.S., Broadhead, R.L., Molyneux, M.E., Nakagomi, O., Hart, C.A. (2005) Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *Journal of Medical Virology*, 77:522-527.

Drummond, A.J., Ho, S.Y., Phillips, M.J., Rambaut, A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4:88.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution,* 22:1185-1192.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29:1969-1973.

Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C. (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9:267-276.

Duizer, E., Koopmans, M. (2006) Tracking emerging pathogens: The case of Norovirus. In: Emerging Foodborne pathogens. Motarjemi, Y., Adams, M. (Eds) Woodhead Publising Ltd, Cambridge, England, 70-110.

Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P., Estes, M.K. (2004) Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85:79-87.

Duke, G.M., Osorio, J.E., Palmenberg, A.C. (1990) Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5´noncoding poly(C) tract. *Nature*, 343:474-476.

Dunbar, S.A. (2006) Applications of Luminex xMAP technology for rapid, highthroughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chemica Acta,* 363:71-82.

Dutka, B.J., Chau, A.S., Coburn, J. (1974) Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. *Water Research,* 8:1047-1055.

ECDC, European Center for Disease Prevention and Control (2011) Annual epidemiological reportReporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data 2011. www.ecdc.europa.eu

Eden, J.S., Tanaka, M.M., Boni, M.F., Rawlinson, W.D., White, P.A. (2013) Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *Journal of Virology,* 87:6270-6282.

Ehrenfeld, E., Teterina, N.L. (2002) Initiation of translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosome entry site. In: Molecular Biology of Picornaviruses. Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 159-169.

El Senousy, W.M., Guix, S., Abid, I., Pintó, R.M., Bosch, A. (2007) Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Applied Environmental Microbiology,* 73:164-167.

Farkas, T., Jiang, X.I. (2007) Rotaviruses, calicivruses, astroviruses, enteric adenoviruses; and other diarrheic viruses. In: Manual of clinical microbiology9th ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds) ASM Press, Washington, DC, USA, 999-1004.

Feistone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H. (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associate with acute illness. *Science,* 182:1026-1028.

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

Foley, J.F., Chin, T.D. (1959) Outbreak of Nonbacterial Gastroenteritis at a Boy Scout Ranch. *Public Health Reports*, 74:1015-1023.

Fonager, J., Hindbæk, L.S., Fischer, T.K. (2013) Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveillance*, 18:20413.

Formiga-Cruz, M., Tofiño-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D., Girones, R. (2002) Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Applied Environmental Microbiology,* 68:5990-5998.

Froggatt, P.C., Barry Vipond, I., Ashley, C.R., Lambden, P.R., Clarke, I.N., Caul, E.O. (2004) Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales, during one winter season (1999-2000). *Journal of Medical Virology*, 72:307-311.

Fujiyama, S., Akahoshi, M., Sagara, K., Sato, T., Tsurusaki, R. (1985) An epidemic hepatitis A related to ingestion of raw oysters. *Gastroenterology Japanese*, 20:6-13.

Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J. (2007) Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Archieves of Virology*, 152:1295-1303.

Galtsoff, P. S. (1964) The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin,* 64:1-480.

Gill, O.N., Cubitt, W.D., Mcswiggan, D.A., Watney, B.M., Bartlett, C.L.R. (1983) Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. *British Medical Journal,* 287:1532-1534.

Glass, R.I. (2012) Unexpected benefits of rotavirus vaccination in theUnited States. *Journal of Infectious Disease*, 204:975-977.

Glass, R.I., Gentsch, J.R., Ivanoff, B. (1996) New lessons for rotavirusvaccines. *Science*, 272:46-48.

Gordon, I., Ingraham, H.S., Korns, R.F. (1947) Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *Journal of Experimental Medicine,* 86: 409- 422.

Gordon, L. (1955) The nonamebic nonbacillary diarrheal disorders. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4:739-755.

Gosert, R., Egger, D., Bienz, K.A. (2000) A cytopathic and a cell culture adapted Hepatitis A Virus strain differ in cell killing but not in intracelular membrane rearrangements. *Virology,* 266:157-159.

Gray, J.J., Kohli, E., Ruggeri, F.M., Vennema, H., Sánchez-Fauquier, A., Schreier, E., Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Giraudon, H., Pothier, P., Di Bartolo, I., Inglese, N., de Bruin, E., van der Veer, B., Moreno, S., Montero, V., de Llano, M.C., Höhne, M., Diedrich, S.M. (2007) European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14:1349-1355

Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Lees, D.N. (1998). A nested reverse transcriptase pcr assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:858-863.

Green, K.Y. (2007) *Caliciviridae*: the noroviruses. In: Fields virology. Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.) Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 949-979.

Green, S.M., Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R., Clarke, I.N. (1995) Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Research*, 37: 271-283.

Greening, G.L. (2006). Human and animal virus in food (including taxonomy of enteric virus). In: Viruses in Food. Goyal, S.M. (Ed.) Springer, New York, USA, 5-42.

Greninger, A.L., Runckel, C., Chiu, C.Y., Haggerty, T., Parsonnet, J., Ganem, D., DeRisi, J.L. (2009) The complete genome of klassevirus. A novel picornavirus in pediatric stool. *Virology,* 18:82.

Grohmann, G.S., Murphy, A.M., Christopher, P.J., Auty, E., Grennberg, H.B. (1981) Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters *Crassostrea commercialis*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science,* 59:219-228.

Guillois-Bécel, Y., Couturier, E., Le Saux, J. C., Roque-Afonso, A. M., Le Guyader, F. S., Le Goas, A., Pernès, J., Le Bechec, S., Briand, A., Robert, C., Dussaix, E., Pommepuy, M., Vaillant, V. (2009) An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. *Eurosurveillance,* 14:1-6.

Gunn, R.A., Janowski, H.T., Lieb, S., Prather, E.C., Greenberg, H.B. (1982) Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *American Journal of Epidemiol*ogy, 115:348-351.

Hall, A.J., Rosenthal, M., Gregoricus, N., Greene, S.A., Ferguson, J., Henao, O.L., Vinjé, J., Lopman, B.A., Parashar, U.D., Widdowson, M.A. (2011) Incidence of Acute Gastroenteritis and Role of Norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerging Infectious Disease,* 17:1381-1388.

Halliday, M.L., Kang, L.-Y., Zhou, T.K., Hu, M.D., Pan, Q.C., Fu, T.Y., Huang, Y.S., Hu, S.L. (1991) An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *Journal of Infectious Disease,* 164:852-859.

Harris, J.P., Edmunds, W.J., Pebody, R., Brown, D.W., Lopman, B.A. (2008) Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerging Infectious Disease*, 14:1546-1552.

Hato, S.V., Ricour, C., Schulte, B.M., Lanke, K.H.W., Bruijni, M., Zoll, J., Melchers, W.J.G., Michiels, T., van Kuppeveld, F.J.M. (2007) The Mengo virus leader protein blocks interferon-α/β gene transcription and inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Cellular Microbiology,* 9:2921-2930.

Hedberg, C.W., Osterholm, M.T. (1993) Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clinical Microbiology Reviews*, 6:199-210.

Heller, D., Gill, O.N., Raynham, E., Kirkland, T., Zadick, P.M., Stabwell-Smith, R. (1986) An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters. *British Medical Journal,* 292:1726-1727.

Hoehne, M., Schreier, E. (2006) Detection of norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*, 6:69.

Hoffmann, D., Seebach, J., Foley, B.T., Frösner, G., Nadas, K., Protzer, U., Schätzl, H.M. (2010) Isolated norovirus GII.7 strain within an extended GII.4 outbreak. *Journal of Medical Virology*, 82:1058-1064.

Hollinger, F.B., Emerson, S.U. (2007) Hepatitis A virus. In: Fields' Virology. Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 911-947.

Holmes, E.C. (2004) The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology*, 13:745-756.

Hopkins, E.J. (1958) Epidemic winter vomiting in a general practice. *Medical Officer*, 100:181.

Huhulescu, S., Kiss, R., Brettlecker, M., Cerny, R.J., Hess, C., Wewalka, G., Allerberger, F. (2009) Etiology of acute gastroenteritis in three sentinel general practices, Austria 2007. *Infection*, 37:103-108.

Iizuka, S., Oka, T., Tabara, K., Omura, T., Katayama, K., Takeda, N., Noda, M. (2010) Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *Journal of Medical Virology*, 82:1247-1254.

Ingalls, T.H., Britten, S.A. (1951) Epidemic diarrhea in a school for boys. *Journal of American Medical Association*, 146:710-712.

Iritani, N., Kaida, A., Kubo, H., Abe, N., Goto, K., Ogura, H., et al. (2010) Molecular epidemiology of noroviruses detected in seasonal outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, from 1996-1997 to 2008-2009. *Journal of Medical Virology*, 82:2097-2105.

Iritani, N., Seto, Y., Haruki, K., Kimura, M., Ayata, M., Ogura, H. (2000) Major change in the predominant type of ''Norwalk-like viruses'' in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City Japan, between April 1996 and March 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:2649-2654.

Iritani, N., Vennema, H., Siebenga, J.J., Siezen, R.J., Renckens, B., Seto, Y., Kaida, A., Koopmans, M. (2008) Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *Journal of Virology*, 82:7336-7345.

Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Gallimore, C.I., Dockery, C., Gray, J. (2008) Evaluation of the Loopamp (loop-mediated isothermal amplification) kit for detecting norovirus RNA in faecal samples. *Journal of Clinical Virology*, 42:389-393.

Jacobsen, K.H., Koopman, J.S. (2004) Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiology and Infection*, 132:1005-1022.

Jacobsen, K.H., Koopman, J.S. (2005) The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *International Journal of Epidemiology*, 34:600-609.

Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T. (2010) Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, 28:6653-6657.

Jansen, A., Stark, K., Kunkel, J., Schreier, E., Ignatius, R., Liesenfeld, O., Werber, D., Göbel, U.B., Zeitz, M., Schneider, T. (2008) Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infectious Disease*, 8:143.

Jansen, R. W., Siegl, G., Lemon, S. M. (1990) Molecular epidemiology of human Hepatitis A Virus defined by antigen- capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 87:2867-2871.

Jansen, R.W., Newbold, J.E., Lemon, S.M. (1988) Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology,* 163:299-307.

Jaykus, L.A., Hemard, M.T., Sobsey, M.D. (1994) Human enteric pathogenic viruses. In: Environmental Indicators and Shellfish Safety. Hackney, C.R., Pierson, M.D. (Eds) Chapman and Hall, Nueva York, USA, 92-153.

Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C. (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 54:152-161.

Jewkes, J., Larson, H.E., Price, A.B., Sanderson, P.J., Davies, H.A. (1981) Etiology of acute diarrhea in adults. *Gut*, 22:388-392.

Johansen, K., K. Mannerqvist, A. Allard, Y. Andersson, L. G. Burman, L. Dillner, K. O. Hedlund, K. Jonsson, U. Kumlin, T. Leitner, M. Lysen, M. Thorhagen, A. Tiveljung-Lindell, C. Wahlstrom, B. Zweygberg-Wirgart, and A. Widell. (2008) Norovirus strains belonging to the GII.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997-2005. Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *Journal of Clinical Virology*, 42:129-134.

Johnson, P.C., Mathewson, J.J., DuPont, H.L., Greenberg, H.B. (1990) Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *Journal of Infectious Disease*, 161:18-21.

Jordan, W. S., Gordon, I.Jr., Dorrance, W.R. (1953) A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute non-bacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiologic agents. *Journal of Experimental Medicine*, 98:461-475.

Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R., Vinjé, J. (2005) Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:1870-1875.

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K. (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:548-1557.

Kallinowski, B., Gmelin, K., Kommerell, B., Bock, H.L., Clemens, R., Scheiermann, N., Wohland, B., Hofmann, F., Theilmann, L. (1992) Immunogenicity, reactogenicity and consistency of a new, inactivated hepatitis A vaccine. A randomized multicentre study with three consecutive vaccine lots. *Vaccine*, 10:500-5001.

Kanerva, M., Maunula, L., Lappalainen, M., Mannonen, L., von Bonsdorff, C.H., Anttila, V.J. (2009) Prolonged norovirus outbreak in a Finnish tertiary care hospital caused by GII.4-2006b subvariants. *Journal of Hospital Infection,* 71:206-213.

Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10:1075-1081.

Kaplan, J.E., Gary, G.W., Baron, R.C., Singh, N., Schonberger, L.B., Feldman, R., Greenberg, H.B. (1982) Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Annals of International Medicine*, 96:756-761.

Kaplan, N.M., Kirby, A., Abd-Eldayem, S.A., Dove, W., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Nakagomi O., Cunliffe, N.A. (2011) Detection and molecular characterisation of rotavirus and norovirus infections in Jordanian children with acute gastroenteritis. *Archives of Virology*, 156:1477-1480.

Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin IV, H.W. (2003) STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299:1575-1578.

Karsten, C., Baumgarte, S., Friedrich, A.W., von Eiff, C., Becker, K., Wosniok, W., Ammon, A., Bockemuhl, J., Karch, H., Huppertz, H.I. (2009) Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease,* 28:935-943.

Kass, R.E., Raftery, A.E. (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Associa,* 773:795.

Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F.B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y.,Gojobori, T., Takeda, N. (2002) Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, 299:225-239.

Khamrin, P., Okame, M., Thongprachum, A., Nantachit, N., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H. (2011) A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *Journal of Virological Methods,* 173:390-339.

Kemmeren, J.M., Mangen, M.J.J., van Duynhoven, Y.T.H.P., Havelaar, A.H. (2006) Priority setting of foodborne pathogens Disease burden and costs of selected enteric pathogens *RIVM report*: 330080001.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.

Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Kingman, J.F.C. (1982) The Coalescent. *Stochastic Process and their Applications,* 13:235-248.

Kingsley, D.H., Richards, G.P. (2003) Persistence of hepatitis A virus in oysters. *Journal of Food Protection*, 66:331-334.

Kirby, A., Gurgel, R.Q., Dove, W., Vieira, S.C., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E. (2010) An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *Journal of Clinical Virology*, 49:254-257.

Kirby, A., Iturriza-Gómara, M. (2012) Norovirus diagnostics: options, applications and interpretations. *Expert Review of Anti-infective Therapy,* 10:423-433.

Kirkwood, C.D., Clark, R., Bogdanovic-Sakran, N., Bishop, R.F. (2005) A 5-year study of the revalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998–2002). *Journal of Medical Virology,* 77:96-101.

Kobasa, D., Mulvey, M., Lee, J.S., Scraba, D.G. (1995) Characterization of Mengo virus neutralization epitopes. *Virology*, 214:118-127.

Kojima, S., Fukuniii, H., Kusaniia, H., Yamamoto, S., Suzuki, S., Uchida, T., lshiiimaru, T., Oki, T., Kuretzanii, S., Ohmura, K., Nishikawa, F., Fujimoto, S., Fujita, K., Nakano, A., Sunakawa, S. (1948) Studies on the causative agent of the infectious diarrhoe. Records of the experiments on human volunteers. *Japan Medical Journal*, 1:467-476.

Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K.J. (2002) Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods*, 100:107-114.

Koopmans, M., Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *Journal of Food Microbioogy,* 90:23-41.

Koopmans, M., Vinjé, J., de Wit, M., Leenen, I., van der Poel, W., van Duynhoven, Y. (2000) Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 18:262-269.

Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H.V., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, J., Koopmans, M. (2011) An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of Clinical Virology*, 51:121-125.

Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szücs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandéz-Pezzi, G., Hedlund, K.O., Koopmans, M. (2008) Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:2956-2965.

Le Guyader, F.S, Loisy, F., Atmar, R.L, Hutson, A.M, Estes, M.K., Ruvoen-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J. (2006a) Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Disease*, 12:931-936.

Le Guyader, F.S., Bon,F., DeMedici,D., Parnaudeau,S., Bertome, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M. (2006b) Detection of noroviruses in an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:3878-3882.

Le Guyader, F.S., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M. (2000) Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3241-3248.

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

Le Guyader, F.S., Le Saux, J.C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L. (2008) Aichi virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus and Rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology,* 46: 4011-4017.

Le Guyader, F.S., Neill, F. H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M., Atmar, R.L. (2003) A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 87:107-112.

Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Estes, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., Atmar, R.L. (1996) Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Applied Environmental Microbiology*, 62:4268-4272.

Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L. (2009) Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology,* 75:618-624.

Lees, D. N. (2000) Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59:81-116.

Lees, D., Younger, A. Doré, B. (2010) Depuration and relaying. In: Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. Rees, G., Pond, K., Kay, D., Bartram, J., Santo Domingo, J. (Eds). WHO. IWA Publishing, London, UK, 145-181.

Lees, D.N. (2010) International Standardisation of a Method for Detection of Human Pathogenic Viruses in Molluscan Shellfish. *Food and Environmental Virology*, 2:146-155

Lemon, S.M., Binn, L.N. (1983) Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *Journal of Infectious Disease*, 148:1033-1039.

Lemon, S.M., Murphy, P.C., Shields, P.A., Pung, L.H., Feinstone, S.M., Cromeans, T., Jansen, R.W. (1991) Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *Journal of Virology,* 65:2056-2065.

Leong, L.E.C., Cornell, C.T., Semler, B.L. (2002) Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: Molecular Biology of Picornaviruses. Semler B.L., Wimmer, E. (Eds.) ASM Press, Washington, DC, USA, 301-312.

Levitt, L.P., Wolfe, V., Bond, J.O. (1970) Winter vomiting disease in Florida students. *Journal of Hygiene*, 68:1-11

Lewis, D., Ando, T., Humphrey, C.D., Monroe, S.S., Glass, R.I. (1995) Use of solid-phase immune electron microscopy for classification of Norwalk-like viruses into six antigenic groups from 10 outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:501-504.

Lewis, D.C., Hale, A., Jiang, X., Eglin, R., Brown, D.W. (1997) Epidemiology of Mexico virus, a small round-structured virus in Yorkshire, United Kingdom, between January 1992 and March 1995. *Journal of Infectious Disease*, 175:951-954.

Li, Z., Wang, Y., Wang, J., Ju, L., Zhan, Y., Xu, Z. (1992) Experimental HAV infection of marmoset an epidemic in Shanghai 1988 contaminated clams. *Acta Academiae Medicinae Shanghai,* 19:129-134.

Linco, S.J., Grohmann, G.S. (1980) The Darwin outbreak of oyster-associated viral gastroenteritis. *Medical Journal of Australia*, 1:211-213.

Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J., Baric, R.S. (2008) Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Medicine*, 5:31.

Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123:1-7.

Lopman, B.A., Adak, G.K., Reacher, M.H., Brown, D.W. (2003) Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and wales, 1992–2000. *Emerging Infectious Disease*, 9:71-77.

Lopman, B.A., Gastañaduy, P., Park, G.W., Hall, A.J., Parashar, U.D., Vinjé, J. (2012a) Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current Opinion in Virology*, 2:96-102.

Lopman, B.A., Hall, A.J., Curns, A.T., Parashar, U.D. (2011) Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996–2007. *Clinical Infectious Disease*, 52:466-474.

Lopman, B.A., Payne, D.C., Tate, J.E., Patel, M.M., Cortese, M.M., Parashar, U.D. (2012b) Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Current Opinion in Virology*, 2:434-442.

Lopman, B.A., Reacher, M.H., Vipond, I.B., Sarangi, J., Brown, D.W. (2004a) Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clinical Infectious Disease*, 39:318-24.

Lopman, B.A., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torvén, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duijnhoven, Y., Koopmans, M. (2004b) Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 363:682-688.

Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D.N. (2008) Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *Journal of Food Protion,* 71:1427-1433.

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N. (2012) Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology,* 78:5812-5817.

Mahar, J.E., Kirkwood, C.D. (2011) Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *Journal of Medical Virology*, 83:2213-2219.

Malfait, P., Lopalco, P.L., Salmaso, S., Germinario, C., Salamina, G., Quarto, M., Barbuti, S., Cipriati, R., Mundo, A., Pesone, G. (1996) An outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy. *Eurosurveillance,* 1:33-35.

Mans, J., Netshikwet, R., Magwalivha, M., Van Zyl, W.B., Taylor, B. (2013) Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiology and Infection*, 141:303-313.

Mao, J.S. (1990) Development of live, attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain). *Vaccine*, 8:523-524.

Maranger, R., Bird, D. (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*, 121:217-226.

Marks, P.J., Vipond, I.B., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R.E., Caul, E.O. (2000) Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection*, 124:481-487.

Marks, P.J., Vipond, I.B., Regan, F.M., Wedgwood, K., Fey, R.E., Caul, E.O. (2003) A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and Infection*, 131:727-736.

Martella, V., Campolo, M., Lorusso, E., Cavicchio, P., Camero, M., Bellacicco, A.L., Decaro, N., Elia, G., Greco, G., Corrente, M., Desario, C., Arista, S., Banyai, K., Koopmans, M., Buonavoglia, C. (2007) Norovirus in captive lion cub. *Emerging Infectious Disease,* 13:1071-1073.

Martin, A., Escriou, N., Chao, S.F., Lemon, S.M., Girard, M., Wychowaski, C. (1995) Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) clavage site of Hepatitia A Virus capside protein VP1 is not depended on procesin by the 3Cpro proteinase. *Journal of Virology,* 73:6220-6227.

Martin, A., Lemon, S.M. (2006) Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*. 43:164-172.

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

Martinez, A., Dominguez, A., Torner, N., Ruiz, L., Camps, N., Barrabeig, I., Arias, C., Alvarez, J., Godoy, P., Balaña, P.J., Pumares, A., Bartolome, R., Ferrer, D., Perez, U., Pinto, R., Buesa, J, The Catalan Viral Gastroenteritits Study Group. (2008) Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks in Catalonia, Spain. *BMC Infectious Disease*, 8:47.

Martinón-Torres, F., Bouzón Alejandro, M.B., Redondo Collazo, L.R., Sánchez Lastres, J.M., Pértega Díaz, S.P., Seoane Pillado, M.T., Martinón Sánchez, J.M. (2011) Effectiveness of rotavirus vaccination in Spain. *Human Vaccines*, 7:757-761.

Mattner, F., Sohr, D., Heim, A., Gastmeier, P., Vennema, H., Koopmans, M. (2006) Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clinical Microbiology and Infection*, 12:69-74.

Mbayed, V. A., Sookoian, S., Alfonso, V., Campos, R. H. (2002) Genetic caracterization of Hepatitis A virus isolated from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Medical Virology*, 68:168-174.

McAllister, G., Holmes, A., Garcia, L., Cameron, F., Cloy, K., Danial, J., Cepeda, J.A., Simmonds, P., Templeton, K.E. (2012) Molecular epidemiology of norovirus in Edinburgh healthcare facilities, Scotland 2007-2011. *Epidemiology and Infection*, 140:2273-2281.

McLeod, C., Hay, B., Grant, C., Greening, G., Day, D. (2009) Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *Joural of Applied Microbiology*, 106:1220-1230.

Mead, P.S., Sluysker, L., Dietz, V., McCaig, L.F, Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999) Food-borne illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease,* 5:607-625.

Mele, A., Rosmini, F., Zampieri, A., Gill, O.N. (1986) Integrate epidemiological system for acute viral hepatitis in Italy (SEIEVA): description and preliminary results. *European Journal of Epidemiol*ogy, 2:300-304.

Mesquita, J.R. (2011) Epidemiology, clinical features and the zoonotic potential of canine norovirus. Tesis Doctoral. Universidade do Porto.

Mesquita, J.R., Vaz, L., Cerqueira, S., Castilho, F., Santos, R., Monteiro, S., Manso, C.F., Romalde, J.L., Nascimento, M.S. (2011) Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology*, 28:936-941.

Metcalf, T. G., Moulton, E., Eckerson, D. (1980) Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 39:141-152.

Midthun, K., Ellerbeck, E., Gershman, K., Calandra, G., Krah, D., McCaughtry, M., Nalin, D., Provost, P. (1991) Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers. *Journal of Infectious Disease*. 163:735-739.

Miller, R., Raven, M. (1936) Epidemic nausea and vomiting. *British Medical Journal,* 1:1242-1244.

Minor, P.D. (1991) Classification and Nomenclature of viruses: The Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Spinger Verlag, Viena.

Mitchell, J.R., Presnell, M.W., Akin, E., Cummins, J.M., Liu, O.C. (1966) Accumulation and elimination of poliovirus by eastern oyster. *American Journal of Epidemiology,* 84:40-50.

Morace, G., Kuso, Y., Dzagurov, G., Beneduce, F., Gaus-Müller. (2008) The unique role of domain 2ª of the hepatitis A virus precursor polypeptide P1-2A in viral morphogenesis. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 41:678-683.

Moreno-Espinosa, S., Farkas, T., Jiang, X. (2004) Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semininars in Pediatrics Infectious Disease* 15:237-245.

Moreno-Pérez, D., Álvarez García, F.J., Arístegui Fernández, J., Barrio Corrales, F., Cilleruelo Ortega, M.J., Corretger Rauet, J.M., González-Hachero, J., Hernández-Sampelayo Matos, T., Merino Moína, M., Ortigosa del Castillo, L., Ruiz-Contreras, J., en representación del Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría, España. (2013) Calendario de vacunaciones de la Asociación Española de Pediatría: recomendaciones 2013. *Anales de Pediatría*, 78:1-27.

Morse, D.L., Guzewich, J.J., Hanrahan, J.P., Stricof, R., Shayegani, M., Deibel, R., Grabau, J.C., Nowak, N.A., Herrmann, J.E., Cukor, G., Blacklow, N.R. (1986) Widespread outbreaks of clam- and oyster-associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus. *New England Journal of Medicine*, 314:678-681.

Motomura, K., Oka, T., Yokoyama, M., Nakamura, H., Mori, H., Ode, H., Hansman, G.S., Katayama, K., Kanda, T., Tanaka, T., Takeda, N., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. (2008) Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *Journal of Virology*, 82:11247-11262.

Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J., Glass, R.I. (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Disease*, 181:284-287.

Moya, A., Holmes, E.C., González-Candelas, F. (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2:279-287.

Murphy, A.M., Grohmann, G.S., Christopher, R.J., López, W.A., Davey, G.R., Millsom, R.H. (1979) An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Medical Journal of Australia*, 2:329-333.

Murray P,R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (Eds) (2007) Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC, USA.

Myrmel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E., Grinde, B. (2004) Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2678-2684.

Nainan, O. V., Margolis, H. S., Robertson, B. H., Balayan, M., Brinton, M.A. (1991) Secuence analysis of a new Hepatitis A Virus naturally infecting Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis). *Journal of General Virology*, 72:1685- 1689.

Nainan, O.V., Xia, G., Vaughan, G., Margolis, H.S. (2006) Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews,* 19:63-79.

Nappier, S.P., Graczyk, T.K., Schwab, K.J. (2008) Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by Crassostrea virginica and Crassostrea ariakensis oysters. *Applied and Environmental Microbiology,* 74:6825-6831.

Nasser, A. M. (1994) Prevalence and fate of hepatitis A virus in water. Crit. Rev. *Environmental Science and Technology*, 24:281-323.

Nei, M., Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York, USA, pp333.

Nenonen, N.P., Hannoun, C., Olsson, M.B., Bergström, T. (2009) Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *Journal of Clinical Virology*, 45:105-108.

Noble, R.C., Kane, E.M., Reeves, S.A., Roeckle, I. (1984) Posttransfusional hepatitis A in a neonatal intensive care unit. *Journal of the American Medical Association*, 252:2711-2715.

Noel, J.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Monroe, S.S., Glass, R.I. (1999) Identification of a distinct common strain of ‘‘Norwalk-like viruses’’ having a global distribution. *Journal of Infectious Disease*, 179:1334-1344.

O’Ryan, M., Prado, V., Pickering, L.K. (2005) A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semininars in Pediatric Infections Disease*, 16:125-136.

Ogilvie, I., Khoury, H., Goetghebeur, M.M., El Khoury, A.C., Giaquinto, C. (2012) Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infectious Disease,* 12:62.

Ohta, T., Basten, C.J. (1992) Gene conversion generates hypervariability at the variable regions of kallikerins and their inhibitors. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1:87-90.

Okada, M., Ogawa, T., Kaiho, I., Shinozaki, K. (2005) Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology,* 43:4391-4401.

Okada, M, Ogawa, T., Yoshizum,i H., Kubonoya, H., Shinozaki, K. (2007) Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Archives of Virology*, 152:2249-2252.

Okada, S., Sekine, S., Ando, T., Hayashi, Y., Murao, M., Yabuuchi, K., Miki, T., Ohashi, M., (1990) Antigenic characterization of small, roundstructured viruses by immune electron microscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:1244-1248.

Oliver, S.L., Dastjerdi, A.M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D.W., Green, J., Bridger, J.C. (2003) Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *Journal of Virology*, 77:2789-2798.

OMS, Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) (2008) The global burden of disease: 2004 update. Geneva.

OMS, Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) (2000) Hepatitis Avaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record,* 75:38-44.

Otter, J.A., Yezli, S., French, G.L. (2011) The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32:687-699.

Ouzilou, L., Caliot, E., Pelletier, I., Prévost, M.C., Pringault, E., Colbère-Garapin, F. (2002) Poliovirus transcytosis through M-like cells. *Journal of General Virology,* 83:2177-2182.

Palmenberg, A.C. (1989) Sequence alignments of picornaviral capsid proteins. In: Molecular Aspects of Picornaviral Infection and Detection. Semler, B. L., Ehrenfeld, E. (Eds) American Society for Microbiology Press, Washington, USA, 211-241.

Parashar, U.D., Bresee, J.S., Glass, R.I. (2003b) The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bulletin of the World Health Organization*, 81:236.

Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A., Glass, R.I. (2003a) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 9:565-572.

Parashar, U.D., Li, J.F., Cama, R., DeZalia, M., Monroe, S.S., Taylor, D.N., Figueroa, D., Gilman, R.H., Glass, R.I. (2004) Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *Journal of Infectious Disease*, 190:1088-1092.

Parrino, T.A., Schreiber, D.S., Trier, J.S., Kapikian, A.Z., Blacklow, N.R. (1977) Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *New England Journal of Medicine*, 297:86-89.

Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J., Parashar, U.D. (2009) Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, 44:1-8.

Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J., Parashar, U.D. (2008) Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Disease,* 14:1224-1231.

Payne, D.C., Vinjé, J., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Weinberg, G.A., Hall, C.B., Chappell, J., Bernstein, D.I., Curns, A.T., Wikswo, M., Shirley, S.H., Hall, A.J., Lopman, B., Parashar, U.D. (2013) Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *New England Journal of Medicine*, 368:1121-1130.

Perrett, K., Kudesia, G. (1995) Gastroenteritis associateed with oysters. *Communication Disorders Reports,* 5:153-154.

Petersen, A.M., Nielsen, S.V., Meyer, D., Ganer, P., Ladefoged, K. (1996) Bacterial gastroenteritis among hospitalized patients in a Danish County, 1991-93. *Scandinavian Journal of Gastroenterology,* 31:906-911.

Phan, T.G., Nguyen, T.A., Nishimura, S., Nishimura, T., Yamamoto, A., Okitsu, S., Ushijima, H. (2005) Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Archives of Virology*, 150:1415-1424.

Phillips, G., Tam, C.C., Conti, S., Rodrigues, L.C., Brown, D., Iturriza-Gomara, M., Gray, J., Lopman, B. (2010b) Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *American Journal of Epidemiology,* 171:1014-1022.

Phillips, G., Tam, C.C., Rodrigues, L.C., Lopman, B. (2010a) Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiology and Infection*, 139:1-11.

Pina, S., Creus, A., González, N., Girones, R., Felip, M., Sommaruga, R. (1998) Abundance, morphology and distribution of planktonic virus-like particles in two high-mountain lakes. *Journal of Plankton Research*, 20:2413-2421.

Pintó, R,M., Costafreda, M.I., Bosch, A. (2009) Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:7350-7355.

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

Polo, D., Álvarez, C., Vilariño, M.L., Longa, A., Romalde, J.L. (2013) Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams. *Food Microbiology* (En prensa).

Polo, D., Vilariño, M.L., Manso, C.F., Romalde, J.L. (2010) Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerging Infectious Disease,* 16:1036-1038.

Power, U.F., Collins, J.K. (1990) Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:803-807.

Prats, G., Llovet, T., Muñoz, C., Solé, R., Mirelis, B., Izquierdo, C., Rodríguez, P., Sabanés, M.E., Rabella, N., Pericas, R., Sánchez, F., Margall, N., Navarro, F., Coll, P. (1997) Etiology of enteritis in a university general hospital in Barcelona (1992-1995) *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,* 15:349-356.

Provost, K., Dancho, B.A., Ozbay, G., Anderson, R.S., Richards, G.P., Kingsley, D.H. (2011) Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:8360-8369.

Provost, P.J., Hilleman, M.R. (1979) Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 160:213-221.

Pybus, O.G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C., Harvey, P.H. (2001) The epidemic behaviour of the hepatitis C virus. *Science*, 292:2323-2325.

Pybus, O.G., Rambaut, A. (2002) GENIE: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics,* 18(10):1404-1405.

Pybus, O.G., Rambaut, A., Harvey, P.H. (2000) An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics*, 155:1429-1437.

Rambaut, A., Pybus, O.G., Nelson, M.I., Viboud, C., Taubenberger, J.K., Holmes, E.C. (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature.* 453:615-619.

Ramirez, S., De Grazia, S., Giammanco, G.M., Milici, M., Colomba, C., Ruggeri, F.M., Martella, V., Arista, S. (2006) Detection of the norovirus variants GGII.4 hunter and GGIIb/hilversum in Italian children with gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 78:1656-1662.

Reuter, G., Pankovics, P., Szucs, G. (2008) Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *Journal of Clinical Virology*, 42:135-140.

Rezende, G., Roque-Afonso, A.M., Samuel, D., Gigou, M., Nicand, E., Ferre, V., Dussaix, E., Bismuth, H., Feray, C. (2003) Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*, 38:613-618.

Richards, G.P. (1985) Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. *Journal of Food Protection*, 48:815-823.

Riemann, H.A., Prince, A.H., Hodges, J.H. (1945) The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery). *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine,* 59:8-9.

Rippey, S.R. (1994) Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, 7:419-429.

Rizzetto, M., Bonino, F., Verme, G., Purcell, R.H., Gerin, J.L. (1987) Nomenclature: a proposal to designate the delta agent as hepatitis D virus. In: The Hepatitis Delta virus and Its Infection. Verme, G., Bonino, F., Rizzetto, M. (Eds) Alan R. Liss, New York, USA, 20-21.

Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S. (1992) Genetic relatedness of Hepatitis A Virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology,* 73:1365-1377.

Robertson, B.H., Khanna, B., Nainan, O.V., Margolis, H.S. (1991) Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by geneticvariation. *The Journal of Infectious Diseases,* 163:286-292.

Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinje, J., De Bruin, E., Van Duynhoven, Y., Koopmans, M. (2002) Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Disease*, 35:246-253.

Rodrigues, L., Pista, A., Oliveira, I., Água-Doce, C., Manita, C., Paixão, M.T. (2007) Molecular epidemiology of Hepatitis A Virus in a group of portuguese citizens living in Lisboa area. *Journal of Medical Virology*, 79:483-487.

Rodríguez de la Rúa, A., González de Canales, M. L., Sarasquete, C. (2002) Estudio histomorfológico del aparato digestive y distribución histoquímica de carbohydratos en el ostión Crassostrea angulata (Lamarck, 1819). *Boletin del Instituto Español de Oceanografia,*18:329-336.

Rohayem, J., Munch, J., Rethwilm, A. (2005) Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *Journal of Virology*, 79:4977-4990.

Romalde, J.L. (1996) New molecular methods for the detection of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish. *Microbiologia*. 12:547-556.

Romalde, J.L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pintó, R.M., Barja, J.L., Bosch, A. (2002) Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology*, 74:119-130.

Romalde, J.L., Estes, M.K., Szucs, G., Atmar, R.M.L.,Woodely, C.M., Metcalf, T.G. (1994) In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Applied and Environmental Microbiology,* 60:1921-1926.

Romalde, J.L., Torrado, I., Ribao, C., Barja, J.L. (2001) Global market: shellfish imports as source of re-emerging hepatitis A virus in Spain. *International Microbiology*, 4:223-226.

Roman, E., Wilhelmi, I., Colomina, J., Villar, J., Cilleruelo, M.L., Nebreda, V., Del Alamo, M., Sánchez-Fauquier, A. (2003) Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *Journal of Medical Microbiology,* 52:435-440.

Rondy, M., Koopmans, M., Rotsaert, C., Van Loon, T., Beljaars, B., Van Dijk, G., Siebenga, J., Svraka, S., Rossen, J.W., Teunis, P., Van Pelt, W., Verhoef, L. (2011) Norovirus disease associated with excess mortality and use of statins: a retrospective cohort study of an outbreak following a pilgrimage to Lourdes. *Epidemiology and Infection*, 139:453-463.

Roos, R. (1956) Hepatitis endemic conveyed by oysters. *Svenska Lakartidningen,* 53:989-1003.

Rossi, G. (2002) Programa Chidos para el cálculo de chi-cuadrado. http://psico.univr.it/germano/soft/chicuadrado.php. Universidad de Verona.

Rutjes, S.A., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H., van Duijnhoven, Y.T., de Roda Husman, A.M. (2006) Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *Journal of Food Protection*, 69:1949-1956.

Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H., Bosch, A. (2002) Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:4148-4155.

Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E., Pintó, R.M. (2003a) Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology,* 315:34-42.

Sánchez, G., Bosch, A., Pintó, R.M. (2003b) Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *Journal of Virology,* 77:452-459.

Santos, N., Hoshino, Y. (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15:29-56.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerging Infectious Disease*, 17:7-15.

Schuster, C.J., Ellis, A.G., Robertson, W.J., Charron, D.F., Aramini, J.J., Marshall, B.J., Medeiros, D.T. (2010) Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. *Canadian Journal of Public Health*, 96:254-258.

Schwartzbrod, L. (1995) Level of viral contamination in aquatic environments. In: Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. *World Health Organization*. Geneva, 5-14.

Sharp, P.M. (2002) Origins of human virus diversity. *Cell*, 108:305-312.

Sheretz, R.J., Russell, B.A., Reunman, P.D. (2005) Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Archives of Internal Medicine*, 1441:1579-1580.

Shieh, Y.C., Khudyakov, Y.E., Xia, G., Ganova-Raeva, L.M., Khambaty, F.M., Woods, J. W., Veazey, J.E., Motes, M.L., Glatzer, M.B., Bialek, S.R., Fiore, A.E. (2007) Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak. *Journal of Food Protection*, 70:145-150.

Shieh, Y.S.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt III, W., Baric, R.S. (2000) Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *Journal of Infectious Disease*, 181:360-366.

Siebenga, J.J., Lemey, P., Kosakovsky Pond, S.L., Rambaut, A., Vennema, H., Koopmans, M. (2010) Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathogene,* 6:e1000884.

Siebenga, J.J., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M.P. (2007a) Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerging Infectious Disease*, 13:144-146.

Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J., Koopmans, M. (2007b) Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology*, 81:9932-9941.

Siebenga, J.J., Vennema, H., Zheng, D.P., Vinjé, J., Lee, B.E., Pang, X.L., Ho, E.C.M., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N.B.G., Hewitt, J., Greening, G.E., Jin, M., Duan, Z.J., Lucero, Y., O'Ryan, M., Hoehne, M., Schreier, E., Ratcliff, R.M., White, P.A., Iritani, N., Reuter, G., Koopmans, M. (2009) Norovirus illness is a global problem: Emergence and

spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *Journal of Infectious Disease*, 200:802-812.

Smillie, J.W., Howitt, B.F., Denison, G.A. (1948) An epidemic of acute watery diarrhea in Alabama. *Public Health Reports*, 63:233-243.

Soares-Weiser, K., Maclehose, H., Bergman, H., Ben-Aharon, I., Nagpal, S., Goldberg, E., Pitan, F., Cunliffe, N. (2012) Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2:CD008521.

Stene-Johansen, K., Jenum, P. A., Hoel, T., Blystad, H., Sunde, H., Skaug, K. (2002) An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiology and Infection,* 129:113-117.

Stene-Johansen, K., Tjon, G., Schreier, E., Bremer, V., Bruisten, S., Ngui, S. L., King, M., Pinto, R.M., Aragonès, L., Mazick, A., Corbet, S., Sundqvist, L., Blystad, H., Norder, H., Skaug, K. (2007) Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *Journal of Medical Virology*, 79:356-365.

Suchard, M.A., Weiss, R.E., Sinsheimer, J.S. (2001) Bayesian selection of continuous time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 18:1001-1013.

Suffredini, E., Magnabosco, C., Civettini, M., Rossetti, E., Arcangeli, G., Croci, L. (2012) Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *Journal of Applied Microbiology*, 113:686-692.

Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., Nakajima ,S. (1998) Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Archives of Virology*, 143:1215-1221.

Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmans, M. (2007) Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:1389-1394.

Tam, C.C., Rodrigues, L.C., Viviani, L., Dodds, J.P., Evans, M.R., Hunter, P.R., Gray, J.J., Letley, L.H., Rait, G., Tompkins, D.S., O'Brien, S.J., IID2 Study Executive Committee. (2012). Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*, 61:69-77.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Mololecular Biology and Evolution,* 28:2731-2739.

Tan, M., Hegde, R.S., Jiang, X. (2004) The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology*, 78:6233-6242.

Tan, M., Jiang, X. (2005) The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology*, 79:14017-14030.

Tang, Y.W., Wang, J.X., Xu, Z.Y., Guo, Y.F., Qian, W.H., Xu, J.X. (1991) A serologically confirmed case-control study of a large outbreak of hepatitis A in China associated with consumption of clams. *Epidemiology and Infect*ion, 107:651-658.

Tavare, S. (1986) Some probabilistic and statistic problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures in Mathematic in the Life sciences.* 17:57-86.

Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S. (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362:371-373.

Tesar, M., Jia, X.Y., Summers, D.F., Ehrenfeld, E. (1993) Analisis of a potential myristoylation site in Hepetitis A Virus capside protein VP4. *Virology,* 194:616-626.

Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L. (2008) Norwalk virus: how infectious is it?. *Journal of Medical Virology*, 80:1468-1476.

Thornley, C.N., Emslie, N.A., Sprott, T.W., Greening, G.E., Rapana, J.P. (2011) Recurring norovirus transmission on an airplane. *Clinical Infectious Disease*, 53:515-520

Tian, P., Bates, A. H., Jensen, H. M., Mandrell, R. E. (2006) Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Letters in Applied Microbiology,* 43:645-651.

Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E. (2007) Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *Journal of Food Protection*, 70:2140-2147.

Tierney, J.T., Sullivan, R., Peeler, J.T., Larkin, E.P. (1982) Persistence of poliovirus in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection*, 45:1135-1137.

Tong, M.J., el-Farra, N.S., Grew, M.I. (1995) Clinical manifestations of hepatitis A: recent experience in a community teaching hospital. *Journal Infectious Disease*, 171:15-18.

Torner, N., Domínguez, A., Ruíz, L., Martinez, A., Bartolomé, R., Buesa, J., Ferrer, M.D., Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. (2008) Acute gastroenteritis outbreaks in Catalonia, Spain: norovirus versus Salmonella. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43:567-573.

Tortajada, C., de Olalla, P. G., Pintó, R. M., Bosch, A., Cayla, J. (2009) Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008-March 2009. *Eurosurveillance,* 14:19175.

Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Balayan, M.S., Ticehurts, J., Purcell, R.H. (1991) Simian Hepatitis A Virus (HAV) strain AGM-27: comparision of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *Journal of general Virology,* 72:1677-1686.

Tu, E.T., Bull, R.A., Greening, G.E., Hewitt, J., Lyon, M.J., Marshall, J.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A.. (2008) Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clinical Infectious Disease*, 46:413-420.

van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinje, J., White, P., Koopmans, M. on behalf of NoroNet. (2013) Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance*, 18:20345.

van Der Poel, W.H., Vinje, J., van Der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Koopmans, M.P. (2000) Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Disease*, 6:36-41.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., Vinjé, J. (2011) Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging Infectious Disease*, 17:1389-95.

Victoria, M., Guimarães, F., Fumian, T., Ferreira, F., Vieira, C., Leite, J. P., Miagostovich, M. (2009a) Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *Journal of Virological Methods,* 156:73-76.

Victoria, M., Miagostovich, M.P., Ferreira, M.S., Vieira, C.B., Fioretti, J.M., Leite, J.P., Colina, R., Cristina, J. (2009b) Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 9:927-932.

Vilariño, M.L. (2009) Prevalencia de virus entéricos en molucos cultivados en Galicia. Estudio de la fiabilidad de microorganismos indicadores de contaminación viral. Tesis Doctoral. Universdad de Santiago de Compostela.

Vilariño, M.L., Le Guyader, F.S., Polo, D., Schaeffer, J., Kröl, J., Romalde, J.L. (2009). Assesment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *International Microbiology*, 12:145-151.

Vinjé, J., Altena, S.A., Koopmans, M.P. (1997) The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Journal of Infectious Disease*, 176:1374-1378.

Vinjé, J., Hamidjaja, R.A., Sobsey, M.D. (2004) Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II Noroviruses. *Journal of Virology Methods,* 116:109-117.

Vinjé, J., Green, J., Lewis, D.C., Gallimore, C.I., Brown, D.W., Koopmans, M.P. (2000) Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Archives in Virology*, 145:223-241.

Vinjé, J., Koopmans, M.P. (1996) Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *Journal of Infectious Disease*, 174:610-615.

Wasley, A., Fiore, A., Bell, B.P. (2006) Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiology Reviews*, 28:101-111.

Waters, A., Coughlan, S., Hall, W.W. (2007) Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology,* 363:11-14.

Watson, B., Ellis, M., Mandal, B., Dunbar, E., Whale, K., Brennand, J. (1986) A comparison of the clinico-pathological features with stool pathogens in patients hospitalised with the symptom of diarrhoea. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 18:553-559.

Wheeler, J.G., Sethi, D., Cowden, J.M., Wall, P.G., Rodrigues, L.C., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roderick, P.J. (1999) Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *British Medical Journal*, 318:1046-1050.

Whetter, L.E., Day, S.P., Elroy-Stein, O., Brown, E.A., Lemon, S.M. (1994) Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *Journal of Virology*, 68:5253-5263.

Widdowson, M.A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, R.S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R.I., Monroe, S.S. (2004) Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. *Journal of Infectious Disease*, 190:27-36.

Widdowson, M.A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D., Swanson ,E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J.S., Monroe, S.S., Glass, R.I. (2005) Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerging Infectious Disease,* 11:95-102.

Wyatt, R.G., Dolin, R., Blacklow, N.R., Dupont, H.L., Buscho, T.R.F., Thornhill, S., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. (1974) Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *Journal of Infectious Disease*, 129:709-714.

Xi, J.N., Graham DY, Wang K, Estes MK. (1990) Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, 250:1580-1583.

Yen, C., Wikswo, M.E., Lopman, B.A., Vinje, J., Parashar, U.D., Hall, A.J. (2011) Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clinical Infectious Disease*, 53:568-571.

Yun, H., Kim, S., Soon Byun, K., Kwon, S. Y., Yim, H. J., Lim, Y., Jeong, S., Jee, Y. (2008) Genetic analysis of HAV strains isolated from patients with acute Hepatitis in Korea, 2005-2006. *Journal of Medical Virology* , 80:777-784.

Zahorsky, J. (1929) Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Archives of Pediatrics*, 46:5.

Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346:312-323.

Zheng, D.P., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Vinjé, J. (2010) Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:168-177.

Zuckerkandl, E., Pauling, L. (1962) Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. In: Horizons in biochemistry. Kasha, M., Pullman, B. (Eds) New York Academic Press, New York, USA,189-225.

Zuckerkandl, E., Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Evolving genes and proteins Bryson, V., Vogel, H. (Eds) New York Academic Press, New York, USA, 97-166.

12. ANEXOS

Anexo I: Lista de las secuencias de referencia de los distintos genogrupos/genotipos obtenidas del GeneBank y de la NoroNet empleadas en los análisis de coalescencia realizados

Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
HM072045	Genebank	1975	USA	USA 1995	II.3
HM072046	Genebank	1976	USA	USA1976	II.3
HM072042	Genebank	1979	USA	USA1979	II.3
DQ379713	Genebank	1983	Australia	USA1983	II.3
AY030312	Genebank	1987	USA	USA1987a	II.3
AY030313	Genebank	1987	USA	USA1987b	II.3
HM072044	Genebank	1988	USA	USA1988a	II.3
HM072043	Genebank	1988	USA	USA1988b	II.3
U22498	Genebank	1989	Méjico	MEX1989	II.3
L23830	Genebank	1989	Japón	JPN1989	II.3
HM072041	Genebank	1990	USA	USA1990	II.3
HM072040	Genebank	1991	USA	USA1991	II.3
U02030	Genebank	1991	Canada	CA1991	II.3
AF414411	Genebank	1993	USA	USA1993	II.3
AJ277617	Genebank	1993	UK	UK1993b	II.3
AF414413.	Genebank	1994	USA	USA1994a	II.3
AF414412	Genebank	1994	USA	USA1994b	II.3
AF414414	Genebank	1994	USA	USA1994c	II.3
U46039	Genebank	1994	N. Zelanda	NZ1994	II.3
AJ277611	Genebank	1995	UK	UK1995a	II.3
AF414415	Genebank	1995	USA	USA1995	II.3
AF190817	Genebank	1995	Argentina	ARG1995	II.3
AB195226	Genebank	1997	Japón	JPN1997a	II.3
AB039781	Genebank	1997	Japón	JPN1997b	II.3
AB067542	Genebank	1998	Japón	JPN1998	II.3
AY588132	Genebank	1998	Australia	AUS1998	II.3
DQ093062	Genebank	2000	Japón	JPN2000a	II.3
AB190457	Genebank	2000	Japón	JPN2000b	II.3
AY247431	Genebank	2000	Suecia	SWE2000	II.3
AY247439	Genebank	2001	Suecia	SWE2001a	II.3
AY247441	Genebank	2001	Suecia	SWE2001b	II.3
AF427111	Genebank	2001	Alemania	GER2001a	II.3
AF427112	Genebank	2001	Alemania	GER2001b	II.3
AF539440	Genebank	2001	Alemania	GER2001c	II.3
AY845056	Genebank	2002	Australia	AUS2002	II.3
AY652979	Genebank	2003	USA	USA2003	II.3
AB242256	Genebank	2003	Japón	JPN2003	II.3
AB242258	Genebank	2004	Rusia	RU2004	II.3

Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
AB242257	Genebank	2004	Japón	JPN2004	II.3
AB365435	Genebank	2004	USA	USA2004	II.3
EU850823	Genebank	2005	China	CHN2005a	II.3
EU850825	Genebank	2005	China	CHN2005b	II.3
AB385634	Genebank	2005	Noruega	NTH2005	II.3
AB385641	Genebank	2006	Noruega	NTH2006	II.3
GU339331	Genebank	2007	Méjico	MEX2007	II.3
GU252722	Genebank	2007	UK	UK2007a	II.3
JF262608	Genebank	2008	Vietnam	VNM2008a	II.3
JF262611	Genebank	2008	Vietnam	VNM2008b	II.3
JN602259	Genebank	2008	Australia	AU2008	II.3
JQ934819	Genebank	2010	China	CHN2010	II.3
AJ277617	Noronet	1993	UK	UK1993b	II.3
HCA277611	Noronet	1995	UK	UK1995b	II.3
2123723	Noronet	2001	UK	UK2001a	II.3
2149551	Noronet	2001	UK	UK2001b	II.3
2114494	Noronet	2001	UK	UK2001c	II.3
2125602	Noronet	2001	UK	UK2001d	II.3
Bordeauxs91	Noronet	2001	Francia	FR2001	II.3
2225876	Noronet	2002	UK	UK2002a	II.3
2212389	Noronet	2002	UK	UK2002b	II.3
2230887	Noronet	2002	UK	UK2002c	II.3
2203728	Noronet	2002	UK	UK2002d	II.3
TH0103b	Noronet	2002	Francia	FR2002	II.3
VI0104	Noronet	2004	Francia	FR2004	II.3
BA01	Noronet	2005	Italia	ITA2005	II.3
EVU2284	Noronet	2005	UK	UK2005a	II.3
EVU2592	Noronet	2005	UK	UK2005b	II.3
EVU2296b	Noronet	2005	UK	UK2005c	II.3
HO62700128	Noronet	2006	UK	UK2006	II.3
44LE0506	Noronet	2006	Francia	FR2006a	II.3
59LI0906	Noronet	2006	Francia	FR2006b	II.3
HO70840278	Noronet	2007	UK	UK2007b	II.3
57ME03072	Noronet	2007	Francia	FR2007	II.3
44NA0208	Noronet	2008	UK	UK2008a	II.3
88EP0308	Noronet	2008	UK	UK200b	II.3
ITMI2009	Noronet	2009	Italia	ITA2009	II.3
115998	Noronet	2009	UK	UK2009	II.3

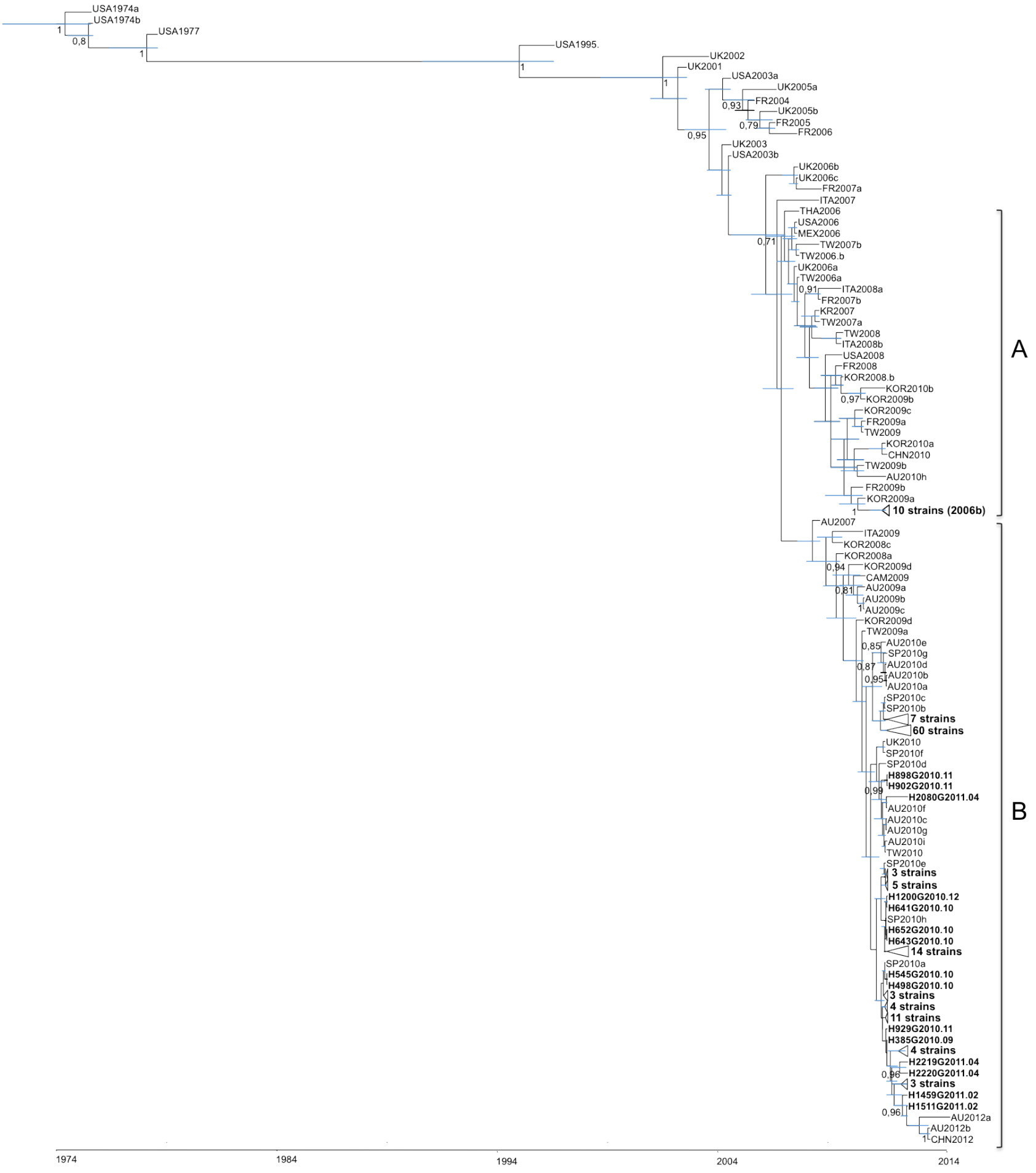
Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
63CO1211	Noronet	2011	Francia	FR2011	II.3
AJ277608.1	Genebank	1990	UK	UK1990	GII7
JN602289.1	Genebank	2002	Australia	AUS2002	GII7
HM055936.1	Genebank	2006	Nicaragua	NIC2006a	GII7
HM055934.1	Genebank	2006	Nicaragua	NIC2006b	GII7
HM055930.1	Genebank	2006	Nicaragua	NIC2006c	GII7
HM055933.	Genebank	2006	Nicaragua	NIC2006d	GII7
HM055931.1	Genebank	2006	Nicaragua	NIC2006e	GII7
EU735553.	Genebank	2006	UK	UK2006a	GII7
GQ849129.1	Genebank	2007	Australia	AUS2007	GII7
JN602301.1	Genebank	2008	Australia	AUS2008a	GII7
GQ849130.	Genebank	2008	Australia	AUS2008b	GII7
JF896184.1	Genebank	2008	Korea	KOR2008a	GII7
JF896171.1	Genebank	2008	Korea	KOR2008b	GII7
HM633199.	Genebank	2008	Japón	JPN2008	GII7
GU339333.1	Genebank	2008	Méjico	MEX2008a	GII7
GU339334.1	Genebank	2008	Méjico	MEX2008b	GII7
HQ201679.1	Genebank	2009	Sur África	ZAF2009	GII7
JN596789	Genebank	2009	China	CHN2009	GII7
JN191378.1	Genebank	2010	Sur África	ZAF2010	GII7
VI0403	Noronet	2003	Francia	FR2003	GII7
91ES1105	Noronet	2005	Francia	FR2005	GII7
EVU2852	Noronet	2006	UK	UK2006b	GII7
EVU3260	Noronet	2006	UK	UK2006c	GII7
UD08ISS2	Noronet	2008	Italia	ITA2008	GII7
RCC2710	Noronet	2010	España	SP2010	GII7
67WI0111	Noronet	2011	Francia	FR2011	GII7
AY113106.1	Genebank	1998	USA	USA1998	GII13
FJ986385.1	Genebank	2004	Australia	AUS2004	GII13
GU017900.1	Genebank	2007	Japón	JPN2007	GII13
JF262606.1	Genebank	2008	Vietnam	VNM2008a	GII13
JF262607.1	Genebank	2008	Vietnam	VNM2008b	GII13
JF262605.1	Genebank	2008	Vietnam	VNM2008c	GII13
JN596797.1	Genebank	2008	China	CHN2008	GII13
JF896161.1	Genebank	2008	Korea	KOR2008	GII13
GU969058.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008a	GII13
GU017908.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008b	GII13
GU017906.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008c	GII13

Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
GU017904.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008d	GII13
GU017901.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008e	GII13
GU017907.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008f	GII13
GU017905.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008g	GII13
GU017902.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008h	GII13
GU969059.1	Genebank	2008	Japón	JPN2008i	GII13
JN602314.1	Genebank	2008	Australia	AUS2008	GII13
HQ201664.1	Genebank	2008	Sur África	ZAF2008c	GII13
HQ201662.1	Genebank	2008	Sur África	ZAF2008b	GII13
HQ201659.1	Genebank	2008	Sur África	ZAF2008a	GII13
JN596796.1	Genebank	2009	China	CHN2009	GII13
JF909054.1	Genebank	2009	Etiopía	ETH2009a	GII13
JF909055.1	Genebank	2009	Etiopía	ETH2009b	GII13
JN191379.1	Genebank	2010	Sur África	ZAF2010	GII13
JN228271.1	Genebank	2011	Italia	ITA2011	GII13
59TO0106	Noronet	2005	Francia	FR2005	GII13
HO62920247	Noronet	2006	UK	UK2006	GII13
35PL0410	Noronet	2010	Francia	FR2010	GII13
ASPB	Noronet	2010	España	SP2010	GII13
AY130761	Genebank	1999	USA	USA1999	GII14
AJ865520	Genebank	2000	Japón	JPN2000	GII14
AJ865533	Genebank	2001	Japón	JPN2001	GII14
AB078334	Genebank	2002	Japón	JPN2002	GII14
AB354294	Genebank	2003	Japón	JPN2003	GII14
DQ004650	Genebank	2004	Korea	KOR2004	GII14
AJ865582	Genebank	2004	Japón	JPN2004	GII14
GU017902	Genebank	2008	Japón	JPN2008	GII14
JQ750991	Genebank	2009	China	CHN2009	GII14
2946	Noronet	1999	Noruega	NTH1999	GII14
E2418	Noronet	2005	UK	UK2005	GII14
708	Noronet	2007	Dinamarca	DK2007	GII14
8698	Noronet	2008	Dinamarca	DK2008	GII14
1066	Noronet	2008	Suecia	SW2008a	GII14
1090	Noronet	2008	Suecia	SW2008b	GII14
1144	Noronet	2010	Suecia	SW2010	GII14
FJ537135.1	Genebank	1974	USA	USA1974a	GII4
FJ537134.1	Genebank	1974	USA	USA1974b	GII4
FJ537138.1	Genebank	1977	USA	Usa1977	GII4

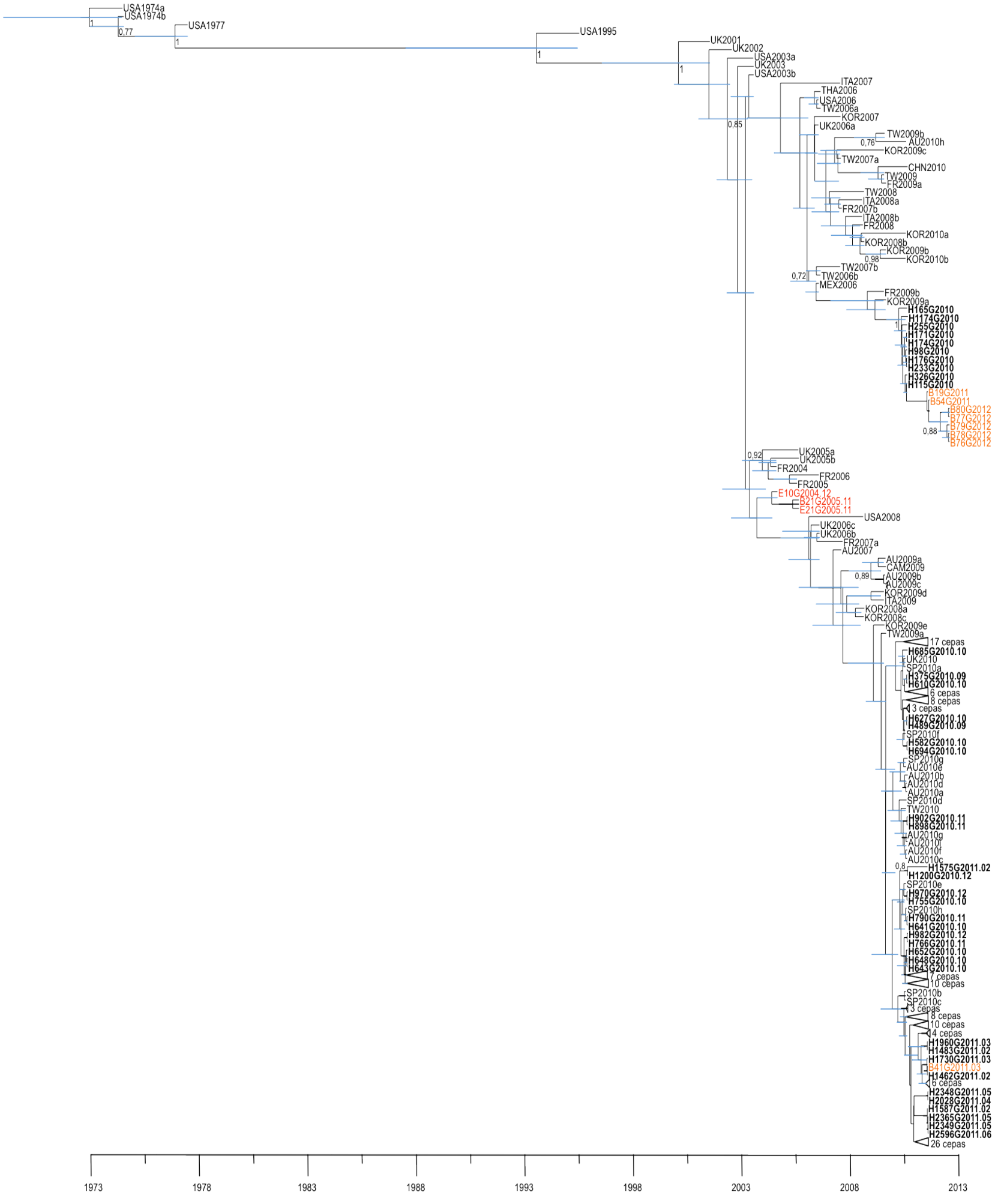
Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
AF414425	Genebank	1995	USA	USA1995	GII4
JQ965810.1	Genebank	2003	USA	USA2003a	GII4
JQ320073	Genebank	2003	USA	USA2003b	GII4
HQ693090	Genebank	2006	Tailandia	THA2006	GII4
JN400609.	Genebank	2006	Taiwan	TW2006a	GII4
JN400605	Genebank	2006	Taiwan	TW2006b	GII4
JN899246.1	Genebank	2006	USA	USA2006	GII4
JQ182705.1	Genebank	2006	Méjico	MEX2006	GII4
JQ622197	Genebank	2007	Korea	KOR2007	GII4
JN400613.	Genebank	2007	Taiwan	TW2007a	GII4
JN400615.	Genebank	2007	Taiwan	TW2007b	GII4
JQ613512.	Genebank	2007	Australia	AU2007	GII4
HM635193.	Genebank	2008	Korea	KOR2008a	GII4
JN400616	Genebank	2008	Taiwan	TW2008	GII4
HM635181.	Genebank	2008	Korea	KOR2008b	GII4
HM635191.1	Genebank	2008	Korea	KOR2008c	GII4
GQ850882.1	Genebank	2008	USA	USA2008	GII4
HM635195	Genebank	2009	Korea	KOR2009a	GII4
JN400618.	Genebank	2009	Taiwan	TW2009a	GII4
HM635185	Genebank	2009	Korea	KOR2009b	GII4
HM635183	Genebank	2009	Korea	KOR2009c	GII4
HM635099.	Genebank	2009	Korea	KOR2009d	GII4
HM635100	Genebank	2009	Korea	KOR2009e	GII4
JN400617	Genebank	2009	Taiwan	TW2009b	GII4
JQ613537	Genebank	2009	Australia	AU2009a	GII4
JQ613570	Genebank	2009	Australia	AU2009b	GII4
JF802503	Genebank	2009	Camerún	CAM2009	GII4
HM535612.1	Genebank	2009	Taiwan	TW2009	GII4
JQ613527	Genebank	2009	Australia	AU2009	GII4
JQ613552.2	Genebank	2010	Australia	AU2010a	GII4
JN400626	Genebank	2010	Taiwan	TW2010	GII4
HM635189.1	Genebank	2010	Korea	KOR2010a	GII4
HM635187.	Genebank	2010	Korea	KOR2010b	GII4
JQ934814	Genebank	2010	China	CHN2010	GII4
JQ613573	Genebank	2010	Australia	AU2010b	GII4
JQ613571	Genebank	2010	Australia	AU2010c	GII4
JQ613563.1	Genebank	2010	Australia	AU2010d	GII4
JQ613559.1	Genebank	2010	Australia	AU2010e	GII4

Nº Acceso	Base de datos	Año muestreo	Lugar de muestreo	Códido en el árbol	Genotipo
JQ613553.1	Genebank	2010	Australia	AU2010f	GII4
JQ613547.	Genebank	2010	Australia	AU2010g	GII4
JQ613572.1	Genebank	2010	Australia	AU2010h	GII4
JQ613558	Genebank	2010	Australia	AU2010i	GII4
2140311	Noronet	2001	UK	UK2001	GII4
2212309	Noronet	2002	UK	Uk2002	GII4
2317184	Noronet	2003	UK	Uk2003	GII4
FU0804	Noronet	2004	Francia	FR2004	GII4
29PA0305	Noronet	2004	Francia	FR2005	GII4
EVU2364	Noronet	2005	UK	UK2005a	GII4
EVU2494	Noronet	2005	UK	UK2005b	GII4
Lincoln	Noronet	2006	UK	UK2006a	GII4
HO62380227	Noronet	2006	UK	UK2006b	GII4
EVU3513U	Noronet	2006	UK	UK2006c	GII4
71CH0206	Noronet	2006	Francia	FR2006a	GII4
04BA0407	Noronet	2007	Francia	FR2006b	GII4
97RE0907	Noronet	2007	Francia	FR2006c	GII4
MLT1107	Noronet	2007	Italia	ITA2007	GII4
23BO0608	Noronet	2008	Francia	FR2008	GII4
BZ08ISS3	Noronet	2008	Italia	ITA2008a	GII4
TS08ISS1	Noronet	2008	Italia	ITA2008b	GII4
ITAB	Noronet	2009	Italia	ITA2009	GII4
63CL1209	Noronet	2009	Francia	FR2009a	GII4
66PE0109	Noronet	2009	Francia	FR2009b	GII4
UTE01	Noronet	2010	España	SP2010a	GII4
TAR02	Noronet	2010	España	SP2010b	GII4
TARGII4	Noronet	2010	España	SP2010c	GII4
UVEVV	Noronet	2010	España	SP2010d	GII4
UVEVV	Noronet	2010	España	SP2010e	GII4
ASPB	Noronet	2010	España	SP2010f	GII4
GIR56	Noronet	2010	España	SP2010g	GII4
RCC15	Noronet	2010	España	SP2010h	GII4
MI118074Z	Noronet	2010	UK	UK2010	GII4

Anexo II: Ampliaciones de las Figuras 7.1 y 8.4.



Ampliación de Figura 7.1: MCCT de 213 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas de Galicia se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.



Ampliación de Figura 8.4: MCCT (*Maximun clade credibility tree*) de 224 secuencias de NoV GII.4 (periodo de 37 años). Las cepas detectadas en muestras clínicas se encuentran representadas en ramas colapsadas indicadas en negrita. Las cepas detectadas en moluscos de la ría do Burgo se encuentran representadas en naranja, y las detectadas en moluscos de la ría de Vigo en rojo. Los códigos de las distintas cepas hacen referencia al país y al año de detección. El eje de las X refleja la escala temporal. La barra en cada nodo representa el valor del 95% HPD para la altura del nodo (edad), mientras que el valor de la probabilidad posterior (una medida de la fiabilidad de cada agrupamiento) se muestra en los nodos clave. El árbol fue enraizado asumiendo un reloj molecular relajado.