



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

**Control y eliminación de virus entéricos en  
moluscos bivalvos y agua mediante  
sistemas de depuración y desinfección solar**

**David Polo Montero  
2014**





DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
E PARASITOLOGÍA

# Control y eliminación de virus entéricos en moluscos bivalvos y agua mediante sistemas de depuración y desinfección solar

**Memoria que presenta  
David Polo Montero  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias  
Biológicas**

**Fdo: David Polo Montero  
Santiago de Compostela  
Julio 2014**





DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
E PARASITOLOGÍA

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

Informa: que la presente Tesis Doctoral titulada: **“Eliminación de virus entéricos en moluscos bivalvos y agua”**, que presenta **David Polo Montero** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología bajo nuestra dirección, y considerando que se haya concluida, autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a **1** de **Septiembre** de **2014**

**Dr. Jesús L. Romalde**



**Este trabajo fue posible gracias a una subvención del Plan Gallego de Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Consellería de Economía e Industria; Xunta de Galicia)(Ref.: 10MMA200010PR), así como a dos Contratos de Investigación con el Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR)(Refs.: 2007/CP746 y 2008/CP776).**

**Durante el desarrollo del mismo, he disfrutado de contratos asociados a dichos proyectos y una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación para la financiación de estancias en la Plataforma solar de Almería (PSA), del Centro de Investigaciones Energéticas, Ambientales y Tecnológicas (CIEMAT).**



La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada (Karl R. Popper 1902-1994)

En principio, la investigación necesita más cabezas que medios (Severo Ochoa 1905-1993)



**A mis padres**  
**A mi hermana**



## *Agradecimientos*

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han hecho posible este trabajo, me han ayudado y animado y que han sido una parte importante de mi vida durante estos años. De la misma manera he de pedir perdón por todas aquellas personas que no se sientan suficientemente reconocidas en estas líneas. Sois muchas las personas con las que he tenido la suerte de cruzarme y aunque por motivos de espacio no aparezcan citados vuestros nombres formáis también parte de esta tesis y de los recuerdos que me llevo de estos años.*

*Quisiera, en primer lugar, agradecer al profesor **Jesús L. Romalde** la oportunidad de poder realizar la Tesis en su grupo de investigación. Gracias Jesús por tu tiempo, tu paciencia y tu ayuda. Gracias por tu confianza y por haber contribuido tanto a mi formación, profesional y personal. Gracias por todo, sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. Quiero agradecerte además tu cercanía, y hacer que trabajar contigo sea como con un compañero más. Muchas gracias.*

*En segundo lugar quiero darle las gracias a toda la gente del grupo, pasado, presente y futuro: **Ros, Sabe, Asmine, Susana, Ana, Ale, Noe, Nuria, Javi, Aide, Diego, Mari, Carmen, Miguel, Alba, Berta, Celsa.** También a los profesores **Juan L. Barja, Beatriz Magariños** y **Alicia E. Toranzo**, un ejemplo de profesionalidad y buen hacer. Porque formamos en definitiva una familia, con sus buenos y malos momentos. Hay que reconocer que fueron tiempos magníficos. Por todas las cenas, congresos y momentos históricos. **Gracias Mari.** Por tu tiempo, tu naturalidad y tu paciencia. Gracias por enseñarme. **Gracias Sabe.** Gracias por tus consejos cuando era un novato y por estar*

siempre llena de buenas intenciones. Gracias por la pasión con la que desempeñas tu trabajo y por el buen rollo que transmites, porque haces que se contagie a los demás. **Gracias Carmen.** Mi principal compañera de doctorado y poyata. Gracias por todos los buenos momentos. **Gracias Miguel.** Kayman, pequeño padawan! de ti también he aprendido muchas cosas. Eres el futuro inmediato del laboratorio. Todavía te queda mucho por hacer, ten paciencia, esto es una carrera de larga distancia, pero estás en buena forma y tienes un gran corazón. Me tienes ahí para lo que necesites. **Gracias Javi y Aide,** pájaros, porque fuimos los primeros chicos en un laboratorio de chicas. El día a día y la noche a noche no serían lo mismo sin vosotros. Momentos muy grandes. El congreso de Salamanca, la sentada en las ramblas, bocatas de ali-oli y pizzas del Galicia. **Noe,** pájara... porque eres única... el mundo necesita de tus patadas voladoras. **Gracias Ana,** los debates del café no serían lo mismo sin ti. Nunca olvidaré el secuestro y extorsión de mi patito de goma. Un clásico. **Gracias Celsa.** Por tu labor, muchas veces no lo suficientemente reconocida y por tu paciencia con todos nosotros. Eres un sol. **Gracias Juan.** Gracias por ser tan único, natural y cercano. Gracias, porque tu fundaste un nuevo campo de estudio y conocimiento, la "Bricobiología". Ánimo y vuelve pronto, te necesitamos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a la gente de la **Plataforma Solar de Almería**, en especial a Irene y Pilar por el buen trato recibido, y a la gente del **INTECMAR**, en especial a **Cris**, por su colaboración.

**Gracias a mis amigos. Kike, Luci, Julio, Martín y Juan.** El ejército de los elegidos! Juntos hemos compartido tanto que no hay páginas suficientes para describir las anécdotas compartidas durante todos estos años. Toda nuestra vida universitaria. Más allá del crepúsculo. Porque gracias a vosotros esto se ha hecho muy corto, fugaz. Espero seguir compartiendo mucho más con vosotros. Sois únicos.

A **María**, una persona maravillosa, la persona más especial que he conocido, que siempre ha estado ahí, por todo tu apoyo, cariño y amor.

Mis más sentidos agradecimientos son para mi familia. Entre ellos a mi tía **Reyes**, una persona increíble y un ejemplo de superación. Estoy muy orgulloso de ti. Finalmente quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi **Madre**, mi **Padre** y mi **hermana**. Ne, siento no haber podido pasar más tiempo contigo de pequeña, pero ahora ya sabes lo que es la universidad y el trabajo que ello supone, te quiero y te adoro... eres única y estoy muy, muy orgulloso de ti. Mamá, Papá, os debo todo lo que soy. Me habéis enseñado los valores más fundamentales, lo más importante de todo. Habéis renunciado a mucho en vuestra vida para ofrecerme esto y que haya podido llegar hasta aquí. Estoy muy orgulloso de vosotros, y esto es para vosotros.

A todos, de corazón, muchas gracias.



## Publicaciones

### Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

Polo, D., Álvarez, C., Díez, J., Manso, C.F., Angulo, M., Vilariño, M.L., Darriba, S., Longa, A., & Romalde, J.L. (2013). Bioaccumulation and removal dynamics of murine norovirus in Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*). En: *Molluscan Shellfish Safety*, Chapter: 14, Publisher: Springer Netherlands, Editores: Gilbert Sauv , pp.165-175. DOI:10.1007/978-94-007-6588-7\_14 ISBN: Print 978-94-007-6587-0, Online 978-94-007-6588-7.

Polo, D., Álvarez, C., Díez, J., Darriba, S., Longa, A., & Romalde, J.L. (2014). Viral elimination during commercial depuration of shellfish. **Food Control**, 43, 206–212.

 ndice de impacto 2013: 2,819; Q1 (17/123) en Food Science and Technology.

Polo, D., Álvarez, C., Vilariño, M.L., Longa, A., & Romalde, J.L. (2014). Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams. **Food Microbiology**, 39, 103–107.

 ndice de impacto 2013: 3,374; Q1 (8/123) en Food Science and Technology.

Polo, D., Álvarez, C., Longa, A., & Romalde, J.L. (2014). Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, 180, 24–29.

 ndice de impacto 2013: 3,155; Q1 (11/123) en Food Science and Technology.

Polo, D., Feal, X., Varela, M.F., Monteagudo, A., Romalde, J.L. (2014). Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish. **Food Research International**, 64, 182–187.

 ndice de impacto 2013: 3,050; Q1 (14/123) en Food Science and Technology.

Polo, D., Feal, X., & Romalde, J.L. (2014). Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful tool to estimate the risk for the consumers. **Emerging Infectious Diseases** (Enviado).

 ndice de impacto 2013: 7,327; Q1 (3/70) en Infectious Diseases.

Polo, D., García-Fernández, I., Fernández-Ib a ez, P., & Romalde, J.L. (2014). Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and norovirus under natural solar conditions. **Journal of Applied Microbiology** (Enviado).

 ndice de impacto 2013: 2,386; Q2 (69/165) en Biotechnology and Applied Microbiology

Polo, D., García-Fernández, I., Fernández-Ibáñez, P., & Romalde, J.L. (2014). Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under natural solar conditions. **Environment International** (Enviado). Índice de impacto 2013: 5,664; Q1 (7/215) en Environmental Sciences.

### **Otras publicaciones relacionadas con la presente Tesis Doctoral**

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. Índice de impacto 2013: 1,341; Q3 (117/165) en Biotechnology and Applied Microbiology.

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 Technology**, 61, 15–24. Índice de impacto 2013: 1,212; Q3 (44/79) en Water Resources.

Polo D., Vilariño, M.L., Manso, C.F., & Romalde, J.L. (2010). Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. **Emerging Infectious Diseases**, 16, 1036–1038. Índice de impacto 2013: 7,327; Q1 (3/70) en Infectious Diseases.

Polo, D., Varela M.F., & Romalde, J.L. (2014). Detection and quantification of Hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. **International Journal of Food Microbiology**, (En prensa). Índice de impacto 2013: 3,155; Q1 (11/123) en Food Science and Technology.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas y acrónimos</b> .....	<b>i</b>
<b>Tablas y figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Presentación y resumen</b> .....	<b>v</b>
<b>Presentación e resumen</b> .....	<b>ix</b>
<b>Presentation and summary</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria. Hacia un riesgo y una seguridad global</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Virus entéricos de transmisión alimentaria</b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Perspectiva histórica.....	4
1.2.2. Características generales de los virus entéricos .....	8
1.2.3. Principales virus entéricos.....	9
<b>1.3. Virus de la Hepatitis A</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Historia.....	10
1.3.2. Taxonomía y diversidad genética y antigénica .....	11
1.3.3. Estructura y organización genómica .....	16
1.3.4. Replicación viral .....	18
1.3.5. Cuadro clínico e inmunidad .....	21
1.3.6. Epidemiología y prevalencia.....	23
1.3.7. Vías de transmisión.....	24
1.3.8. Estabilidad físico-química.....	25
1.3.9. Cultivo celular .....	27
<b>1.4. Norovirus</b> .....	<b>27</b>
1.4.1. Historia.....	27
1.4.2. Taxonomía y diversidad genética y antigénica .....	29
1.4.3. Estructura y organización genómica .....	32
1.4.4. Replicación viral .....	34
1.4.5. Cuadro clínico e inmunidad .....	35
1.4.6. Epidemiología y prevalencia.....	37

1.4.7. Susceptibilidad genética a NoV. El papel del grupo de antígenos histo-sanguíneos .....	39
1.4.8. Vías de transmisión.....	41
1.4.9. Estabilidad fisico-química .....	43
1.4.10. Cultivo celular .....	44
<b>1.5. Detección de HAV y NoV en alimentos .....</b>	<b>45</b>
<b>1.6. Productos de especial prioridad.....</b>	<b>49</b>
<b>1.7. Virus entéricos en moluscos bivalvos .....</b>	<b>50</b>
1.7.1. Los moluscos bivalvos como vectores de transmisión de virus entéricos .....	50
1.7.2. Modos de contaminación .....	54
1.7.3. Captación, acumulación y persistencia viral.....	57
1.7.4. Métodos de control y eliminación .....	63
1.7.5. Legislación y control microbiológico para el producto final.....	74
<b>1.8. Virus entéricos en agua.....</b>	<b>75</b>
1.8.1. El agua como vector de transmisión de virus entéricos.....	75
1.8.2. Virus entéricos en agua de consumo.....	76
1.8.3. Virus entéricos en agua para irrigación .....	80
1.8.4. Tratamiento de aguas residuales .....	82
1.8.5. Legislación.....	84
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Eliminación de virus entéricos en almeja y mejillón mediante sistemas de depuración .....</b>	<b>93</b>
3.1.1. Artículo 1. Viral elimination during commercial depuration of shellfish.....	95
3.1.2. Artículo 2. Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams.....	105
3.1.3. Artículo 3. Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ).....	113

3.1.4. Artículo 4. Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish .....	121
3.1.5. Artículo 5. Mathematical model for the depuration kinetics of enteric viruses in shellfish.....	129
<b>3.2. Eliminación de virus entéricos en agua mediante SODIS y sistemas foto-Fenton.....</b>	<b>155</b>
3.2.1. Artículo 1. Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and norovirus under field conditions.....	157
3.2.2. Artículo 2. Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under field conditions.....	189
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>221</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>233</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>237</b>



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

(-)	Polaridad negativa
(+)	Polaridad positiva
a.C.	antes de Cristo
AdV	Adenovirus
Ag	Antígeno/s
AiV	Aichi virus
ANN	Redes Artificiales Neuronales (del inglés <i>Artificial Neural Networks</i> )
AOP	Procesos Avanzados de Oxidación (del inglés <i>Advanced Oxidation Processes</i> )
AsV	Astrovirus
bc	Bicatenario
BSC	Células de riñón de mono verde Africano
CoV	Coronavirus
CoxV	Coxsackievirus
DNA	Ácido dexosirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
EchV	Echovirus
ECP	Efecto citopático
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EEUU	Estados Unidos
ELISA	Ensayo por Inmuno-absorción Ligado a Enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
EMCV	Encefalomiocarditis virus
ETA	Enfermedad de transmisión alimentaria
EV	Enterovirus
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FBVE	Red Europea de Virus de transmisión alimentaria (del inglés, <i>Food-Borne Virus in Europe</i> )
FCV	Calicivirus Felino (de inglés, <i>Feline calicivirus</i> )
FRhK	Células de riñón de macaco
FUT	Fucosiltransferasa
<i>FUT</i>	Gen codificante para una fucosiltransferasa
HAV	Virus de la hepatitis A (del inglés, <i>Hepatitis A Virus</i> )
HBGA	Grupo de Antígenos de Histocompatibilidad sanguíneos (del inglés <i>Histo-Blood Group Antigens</i> )
HBV	Virus de la hepatitis B (del inglés, <i>Hepatitis B Virus</i> )
HEV	Virus de la hepatitis E
HHP	Alta Presión Hidrostática (del inglés, <i>High Hydrostatic Pressure</i> )
Ig	Inmunoglobulina
IRES	Sitio Interno de Entrada Ribosomal (del inglés <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
ISO	Organización Internacional para la Estandarización (del inglés <i>International Organization for Standardization</i> )
IU	Unidades Internacionales (del inglés, <i>International Units</i> )
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
kGy	KiloGrays
Le	Lewis
mc	Monocatenario
ME	Microscopía Electrónica
MERS	Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (del inglés, <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> )

MIE	Microscopía Inmuno-Electrónica
MNV	Norovirus murino (de inglés, <i>Murine norovirus</i> )
N-terminal	Amino terminal
NCR	Región No Codificante (del inglés <i>Non Coding Region</i> )
NIAID	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de EEUU (del inglés <i>National Institute of Allergy and Infectious Disease</i> )
NLV	Virus tipo Norwalk (del inglés, <i>Norwalk-Like virus</i> )
NMP	Número Más Probable
NoV	Norovirus
NSSP	Programa sanitario nacional de los EEUU para moluscos bivalvos (del inglés <i>National Shellfish Sanitation Program</i> )
NTPasa	Nucleótido trifosfatasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Pauta abierta de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i> )
P	Dominio protuberante
PaV	Parvovirus
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PET	Polietileno-Tereftalato
PV	Poliovirus
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA (del inglés <i>RNA dependent RNA polymerase</i> )
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> )
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
RNasas	Ribonucleasas
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
RT-qPCR	Retrotranscripción asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés <i>Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i> )
RV	Rotavirus
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo (del inglés, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> )
SAT	Sistemas de Alerta Temprana
SaV	Sapovirus
SODIS	Desinfección solar (del inglés <i>Solar Disinfection</i> )
SRSV	Virus pequeños de estructura redondeada (del inglés <i>Small Round-Structure Viruses</i> )
TBEV	Tick-Borne Encephalitis Virus
RNA <sub>t</sub>	ARN transferente (del inglés, <i>Transfer RNA</i> )
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
VP	Proteína viral (del inglés, <i>Viral Protein</i> )
VP <sub>g</sub>	Proteína viral unida al genoma (del inglés: <i>virus protein genome linked</i> )
x g	Unidades de fuerza centrífuga relativa

En este listado no se incluyen unidades de medida, ni otras abreviaturas de términos científicos utilizados de forma convencional en publicaciones internacionales.

## TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características de los principales virus entéricos .....	12
<b>Tabla 2:</b> Diferentes perfiles de unión de diferentes cepas de NoV a los HBGA .....	42
<b>Tabla 3:</b> Diferentes brotes asociados al consumo de moluscos bivalvos .....	53
<b>Tabla 4:</b> Criterios de la UE para la clasificación de las áreas de cultivo de moluscos bivalvos .....	66
<b>Tabla 5:</b> Criterios NSSP para la clasificación de las áreas de cultivo de moluscos bivalvos .....	67
<b>Tabla 6:</b> Comparación de los tres principales sistemas de desinfección de agua utilizados durante el proceso de depuración .....	69

### FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Árbol filogenético de los géneros más representativos de la familia <i>Picornaviridae</i> .....	14
<b>Figura 2:</b> Clasificación genotípica y subgenotípica de HAV .....	15
<b>Figura 3:</b> Distribución geográfica de los genotipos de HAV .....	16
<b>Figura 4:</b> Representación esquemática de la estructura y organización genómica de HAV .....	17
<b>Figura 5:</b> Evolución de los títulos virales y signos clínicos durante una infección de hepatitis A .....	22
<b>Figura 6:</b> Distribución geográfica de la prevalencia de antígeno anti- HAV .....	24
<b>Figura 7:</b> Árbol filogenético de la familia <i>Caliciviridae</i> .....	30
<b>Figura 8:</b> Árbol filogenético de los diferentes genogrupos de NoV .....	31
<b>Figura 9:</b> Representación esquemática de la estructura y organización genómica de NoV .....	34

<b>Figura 10:</b> Vías de biosíntesis de los HBGA humanos del sistema ABH y Lewis basado en el precursor tipo-1 .....	40
<b>Figura 11:</b> (A) Estructura secundaria de la 5`NCR de la cepa HM-175 de HAV. (B y C) Análisis de la variabilidad del genoma completo de NoV GI (B) y GII (C).....	47
<b>Figura 12:</b> Origen y fuentes de transmisión de los virus entéricos hasta el medio marino .....	56
<b>Figura 13:</b> Representación esquemática de la circulación del material dentro del estómago y estilo cristalino de la mayoría de lamelibranquios.....	59
<b>Figura 14:</b> (A) Sección que muestra la unión claramente definida entre el epitelio de un conducto secundario y el de un túbulo digestivo en <i>Mytilus edulis</i> . (B) Sistemas de conductos de los divertículos digestivos. (C) Representación de un conducto principal de los divertículos digestivos. (D) Sección transversal de un túbulo de los divertículos digestivos de <i>Venerupis pullastra</i> mostrando la disposición de los cilios .....	60
<b>Figura 15:</b> Representación de la circulación de fluidos y partículas dentro de los divertículos digestivos de la almeja .....	61
<b>Figura 16:</b> Vías de contaminación de los virus entéricos transmitidos a través del agua .....	76
<b>Figura 17:</b> Porcentajes de las etiologías de los brotes asociados a los sistemas públicos de agua desde 1971 hasta 2006.....	79

## Presentación y resumen

Las enfermedades de transmisión alimentaria de etiología viral representan uno de los principales retos a nivel mundial dentro de la seguridad alimentaria. El desarrollo de un comercio a gran escala sin procedimientos y estándares microbiológicos de seguridad apropiados desde un punto de vista virológico, ilustra la vulnerabilidad actual del mercado global alimentario. En los últimos años, se ha demostrado que los virus son una de las principales causas del aumento de enfermedades de transmisión alimentaria (incluida el agua) en todo el mundo. Desde un punto de vista epidemiológico, norovirus (NoV) y el virus de la Hepatitis A (HAV) son los virus de transmisión alimentaria más importantes y centran la atención de esta tesis.

El objetivo general de este trabajo es la adquisición de un mayor conocimiento en lo que concierne al control y eliminación de HAV y NoV en moluscos bivalvos y agua mediante procesos de depuración y desinfección solar, respectivamente.

La tesis doctoral presentada a continuación se divide en dos grandes bloques: (i) una primera parte centrada en el estudio y evaluación de la eficacia y cinética de eliminación viral en moluscos bivalvos sometidos a procesos de depuración y (ii) una segunda parte centrada en la eficacia del método SODIS y los sistemas foto-Fenton para la desinfección viral de agua.

La primera parte centrada en la depuración viral de moluscos bivalvos, representa la mayor parte de esta tesis e incluye 5 artículos científicos: (i) En el primer artículo titulado “*Eliminación viral durante la depuración comercial de moluscos bivalvos*” se evaluó la eficacia de la depuración para la eliminación de HAV, NoV genogrupos I y II, y bacteriófagos F+RNA (F+RNA) en almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y mejillón mediterráneo (*Mytilus*

*galloprovincialis*) contaminados en el medio natural. El objetivo fue comparar el comportamiento de los diferentes virus en las dos especies de bivalvos, en condiciones de depuración aplicadas comercialmente y en un centro autorizado y homologado, extendiendo el periodo de depuración hasta los 7 días. Los resultados pusieron de manifiesto la ineficacia de los procesos comerciales para la eliminación viral y se observaron ciertas diferencias en cuanto a la capacidad depurativa de las dos especies de bivalvos.

Se intentó a continuación profundizar en el comportamiento viral durante este tipo de procesos mediante su estudio en una depuradora experimental. Estos ensayos componen los artículos (ii) “*Cinética de depuración del virus de la hepatitis A en las almejas*”, (iii) “*Eficacia de la depuración para la eliminación del virus de la hepatitis A en mejillones (Mytilus galloprovincialis)*” y (iv) “*Cinética de depuración de norovirus murino en moluscos bivalvos*”. En estos tres artículos se observó tanto una dinámica de depuración compartida entre los dos moluscos como ciertas diferencias en su capacidad depurativa. Se observaron también ciertas diferencias en la capacidad de persistencia de los dos virus.

Estos resultados dieron lugar al quinto artículo, (v) “*Modelo matemático para la cinética de depuración viral en moluscos bivalvos: una herramienta útil para estimar el riesgo para los consumidores*”. En él se desarrolló un modelo predictivo que caracteriza la cinética observada previamente y que puede predecir la carga viral en cualquier momento de la depuración conociendo la tasa de filtración específica del molusco bivalvo y ciertas propiedades específicas del virus en cuestión relacionadas con su capacidad de unirse, penetrar o acumularse dentro de las células y tejidos gastrointestinales del bivalvo.

La segunda parte de la tesis, relacionada con la desinfección viral mediante SODIS y foto-Fenton, incluye dos artículos: (i) “*Desinfección Solar de agua (SODIS) del virus de Hepatitis A y norovirus bajo condiciones solares naturales*”. En este artículo se evalúa y se compara la eficacia del método

SODIS para la desinfección de HAV y NoV en agua de bebida bajo condiciones naturales. Los resultados indicaron que SODIS puede contribuir a reducir el riesgo de infección viral y apoya su uso como método de desinfección de agua alternativo y/o de emergencia para comunidades vulnerables. En el segundo artículo (ii) “*Desinfección del virus de la Hepatitis A y norovirus mediante sistemas foto-Fenton bajo condiciones solares naturales*”, se evaluó comparativamente la eficacia del método SODIS, y los sistemas Fenton y foto-Fenton para la desinfección de HAV y NoV en agua como una posible aplicación para la desinfección de agua de riego. Los resultados demostraron que los sistemas foto-Fenton pueden reducir significativamente la presencia e infectividad viral a temperaturas medias y sin una fuente de luz intensa, y sitúan a este tipo de procesos como una alternativa prometedora y medioambientalmente más sostenible y barata que los procesos de desinfección convencionales.



## Presentación e resumo

As enfermidades de etioloxía viral transmitidas polos alimentos representan un dos principais desafíos para a seguridade alimentaria a nivel mundial. O desenvolvemento dun comercio a gran escala sen procedementos e normas de seguridade microbiolóxica axeitadas, dende un punto de vista virolóxico, ilustra a vulnerabilidade actual do mercado global alimentario.

Nos últimos anos, demostrouse que os virus son unha das principais causas do aumento de enfermidades transmitidas por alimentos (incluíndo a auga) en todo o mundo. Dende o punto de vista epidemiolóxico, norovirus (NoV) e o virus da hepatitis A (HAV) son os principais virus de transmisión alimentaria e son o foco de atención desta tese.

O obxectivo xeral deste traballo é adquirir un mellor coñecemento no que se refire ao control e eliminación de HAV e NoV en moluscos bivalvos e auga mediante procesos de depuración e desinfección solar, respectivamente.

A tese presentada a continuación divídese en dous bloques principais: (i) unha primeira parte céntrase no estudo e avaliación da eficacia e cinética de depuración viral nos moluscos bivalvos sometidos a procesos de purificación e (ii) unha segunda parte céntrase no estudo da eficiencia do método SODIS e sistemas foto-Fenton para desinfección viral de auga.

A primeira parte centrada na depuración viral de moluscos, representa a maior parte da tese e inclúe cinco artigos científicos: (i) No primeiro artigo titulado "*Eliminación viral durante a depuración comercial de moluscos bivalvos*", avalíase a eficacia da depuración para a eliminación de HAV, NoV xenogrupo I e II e bacteriófagos F+RNA en ameixa babosa (*Venerupis pullastra*) e mexillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) contaminados no medio natural. O obxectivo foi comparar o comportamento dos diferentes virus nas

dúas especies de bivalvos, en condicións de depuración aplicadas comercialmente nun centro autorizado e homologado, alongando o periodo de depuración ata os 7 días. Os resultados puxeron de manifesto a ineficacia dos procesos comerciais para a eliminación viral e observáronse certas diferencias no que respecta á capacidade depurativa das dúas especies de bivalvos.

Intentouse a continuación profundizar no comportamento viral durante este tipo de procesos mediante o seu estudo nunha depuradora experimental. Estes ensaios compoñen os artigos (ii) “*Cinética da depuración do virus da hepatitis A en ameixas*”, (iii) “*Eficacia da depuración para a eliminación do virus da hepatitis A en mexillóns (Mytilus galloprovincialis)*” e (iv) “*Cinética da depuración de norovirus murino en moluscos bivalvos*”. Nos tres artigos observouse tanto unha dinámica de depuración compartida entre ámbolos dous moluscos como certas diferencias na súa capacidade depurativa. Tamén observáronse certas diferencias na capacidade de persistencia dos dous virus.

Estos resultados deron lugar ó quinto artículo, (v) “*Modelo matemático para a cinética de depuración viral en moluscos bivalvos: una ferramenta útil para estimar o risco para os consumidores*”. Neste artigo, desenvólvese un modelo predictivo que caracteriza a cinética observada previamente e que pode predecir a carga viral en calquera momento da depuración coñecendo a tasa de filtración específica do molusco bivalvo e certas propiedades específicas do virus en cuestión, relacionadas coa súa capacidade de unirse, penetrar ou acumularse dentro das células e tecidos gastrointestinais do bivalvo.

A segunda parte da tesis, relacionada coa desinfección viral mediante SODIS e foto-Fenton, inclúe dous artigos: (i) “*Desinfección Solar de auga (SODIS) do virus da Hepatite A e norovirus baixo condicións solares naturais*”. Neste artigo avalíase e compárase a eficacia do método SODIS para a desinfección de HAV e NoV en auga de bebida baixo condicións naturais. Os resultados indicaron que SODIS pode contribuir a reducir o risco de infección viral e apoia o seu uso como método de desinfección de auga alternativo e/ou de emerxencia para comunidades vulnerables. No segundo artigo (ii)

---

*“Desinfección do virus da Hepatite A e norovirus mediante sistemas foto-Fenton baixo condicións solares naturais”*, avaliouse comparativamente a eficacia do método SODIS, e os sistemas Fenton e foto-Fenton para a desinfección de HAV e NoV en auga como unha posible aplicación para a desinfección de auga de rego. Os resultados demostraron que os sistemas foto-Fenton poden reducir significativamente a presenza e a infectividade viral a temperaturas medias e sen unha fonte de luz intensa, e sitúan a este tipo de procesos como una alternativa prometedora, medioambientalmente máis sostible e barata que os procesos de desinfección convencionais.



## Presentation and summary

Foodborne diseases of viral etiology represent one of the main challenges in global food security. The development of a large-scale trade without appropriate safety standards and microbiological procedures, from a virological standpoint, illustrates the current vulnerability of the global food market. In recent years, it has been demonstrated that viruses are one of the major cause of the increase of foodborne and waterborne illnesses worldwide. From an epidemiological point of view, norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) are the major foodborne viruses and focus the attention of this thesis.

The overall objective of this work is to acquire a deeper knowledge on the control and elimination of HAV and NoV in bivalve molluscs and water by depuration and solar disinfection processes, respectively.

The thesis presented below is divided into two main blocks: (i) a first part focuses on the study and evaluation of the efficacy and kinetics of viral clearance in bivalve molluscs subjected to purification processes and (ii) a second part focused on SODIS and photo-Fenton systems efficiency for viral disinfection of water.

The first part, focused on viral clearance in bivalve molluscs, represents the largest part of this thesis and includes 5 scientific articles: (i) The first article entitled "*Viral elimination during commercial depuration of shellfish*" evaluated the purification efficiency for the elimination of HAV, NoV genogroups I and II, and F+RNA bacteriophages in pullet carpet shell clam (*Venerupis pullastra*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated in the natural environment. The objective was to compare the behavior of these viruses in the two bivalve species, in commercial depuration conditions and in an authorized center, extending the depuration period to 7 days. Results showed the inefficiency of the commercial depuration processes

for viral clearance as well as certain differences in the purification capacity of the two bivalve species.

Further assays in an experimental depuration system were carried out to evaluate the viral behavior during these processes. These assays comprise articles (ii) "*Depuration kinetics of hepatitis A virus in clams*" (iii) "*Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels (Mytilus galloprovincialis)*" and (iv) "*Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish*". These three articles showed a depuration dynamic shared by the different molluscan species but also some differences in their purification capacity. Certain differences in the persistence capacity of the two viruses were also observed.

These results led to the development of the fifth article, (v) "*Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful tool to estimate the risk for the consumers*". In this article, a predictive model that characterizes the viral depuration kinetics previously observed was developed. The model can predict the viral load at any time of depuration knowing the specific filtration rate of bivalve mollusc and certain specific properties of the virus related to their ability to bind, penetrate or accumulate within cells and gastrointestinal tissues of the bivalves.

The second part of the thesis, related to viral disinfection by SODIS and photo-Fenton, includes two articles: (i) "*Solar Water Disinfection (SODIS) of hepatitis A virus and norovirus under natural solar conditions*". This article evaluated and compared the effectiveness of SODIS method for the disinfection of HAV and NoV in drinking water under natural conditions. The results indicated that SODIS can contribute to reduce the risk of viral infection and supports its use as an alternative and/or emergency method of water disinfection for vulnerable communities. In the second article (ii) "*Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under natural solar conditions*", the effectiveness of the SODIS method, and Fenton and photo-Fenton systems for disinfection of HAV and NoV were comparatively

---

evaluated in water, as a possible application for the disinfection of irrigation water. Results showed that solar photo-Fenton systems can significantly reduce the viral presence and infectivity at medium temperatures and without a strong light source, highlighting these methods as a promising, environmentally sustainable and cheaper alternative to the conventional disinfection processes.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria. Hacia una un riesgo y una seguridad global

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) constituyen uno de los problemas más serios para la salud humana en todo el mundo. A pesar de que existen más de 200 patógenos microbianos y agentes físicos o químicos causantes de trastornos tras su ingestión, son las enfermedades causadas por bacterias, virus, parásitos y priones las que concentran más esfuerzos y preocupación pública (Acheson, 1999). El cuadro clínico más común de estas enfermedades se caracteriza por síntomas gastrointestinales y diarrea. Alrededor de 2,2 millones de personas mueren cada año en el mundo debido a estas enfermedades, en su mayoría niños de países en vías de desarrollo ([www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/diarrhoea/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/en/)).

El aumento de la población humana, la creciente urbanización e industrialización y, en las últimas décadas, el gran desarrollo de un comercio alimentario cada vez más globalizado, son los factores principales que contribuyen a aumentar no sólo el número de casos, sino también su extensión y rapidez de transmisión. Otros factores que influyen en el aumento de ciertos tipos de ETA son la mejora de la logística y las condiciones de transporte, que permiten a los patógenos sobrevivir durante más tiempo en los alimentos y llegar en forma viable al consumidor. El aumento del turismo, nuevos hábitos alimentarios como el consumo de productos crudos o ligeramente cocinados, el auge de la comida rápida, la demanda de alimentos exóticos o de temporada durante todo el año, cambios en las prácticas agrícolas o incluso el cambio climático son factores que facilitan el aumento de las ETA (Newell *et al.*, 2010; Qusted *et al.*, 2010). A esto hay que añadir que las poblaciones de estos patógenos no son estáticas y, aunque las prácticas de producción alimentaria cambian y mejoran, ciertos microorganismos son capaces de evolucionar, explotar nuevas oportunidades y generar nuevos problemas de salud pública (Tauxe *et al.*, 2010).

A pesar del enorme impacto de estas enfermedades en la sociedad actual, sólo una pequeña fracción de los casos de ETA pueden confirmarse en el laboratorio y documentarse a través de las agencias de salud pública, lo que dificulta el cálculo de la incidencia real de estas enfermedades. Dichos cálculos requieren además, el desarrollo de complejos modelos de estimación, que difieren en muchos casos entre estudios y/o países, dificultando la comparación directa de los datos (Morris, 2011; Mead *et al.*, 1999; Scallan *et al.*, 2011a, 2011b). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dado respuesta a este vacío de información mediante el lanzamiento de una nueva iniciativa para proporcionar mejores estadísticas ([www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/ferg/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index.html)).

Según estimaciones recientes, tan sólo en EEUU se producen anualmente aproximadamente 47,8 millones de casos de ETA, incluyendo 9,4 millones de episodios de enfermedades de etiología conocida, causados principalmente por virus (5,5 millones; 58 %), bacterias (3,6 millones; 39 %) y parásitos (0,2 millones; 2 %). La incidencia promedio de enfermedad gastrointestinal aguda oscila entre 0,6 y 0,8 episodios de gastroenteritis por persona y año en EEUU dependiendo del estudio y su metodología (Mead *et al.*, 1999; Scallan *et al.*, 2011a, 2011b). Por otro lado, se estima que entre el 50 y el 60 % de los agentes causales de enfermedades infecciosas intestinales no logran identificarse, en muchos casos debido a la falta de herramientas de diagnóstico (Scallan *et al.*, 2011b; Tompkins *et al.*, 1999).

## **1.2. Virus entéricos de transmisión alimentaria**

### **1.2.1. Perspectiva histórica**

En los últimos años, se ha demostrado que los virus son una de las principales causas del aumento de ETA (incluida el agua) en todo el mundo. El primer brote documentado de enfermedad de etiología viral transmitida por un alimento data de 1914. Dicho brote, ocurrido en Inglaterra, se asoció con cuatro casos de “enfermedad paralizante” debido al consumo de leche cruda (Jubb,

1915). La causa de la enfermedad, denominada posteriormente poliomielitis, era un virus, aislado por primera vez en 1908 por Karl Landsteiner y Erwin Popper y denominado poliovirus (PV). El PV se clasificó dentro de la familia *Picornaviridae* (pico= pequeño; RNA, genoma de ácido ribonucleico) como especie tipo. Tras numerosos brotes de PV asociados al consumo de alimentos (principalmente leche y derivados) y agua (Cliver, 1969; Mosley, 1967), se logra cultivar PV *in vitro* por primera vez en 1949 (Enders *et al.*, 1949). A principios de la década de los años 50 dejan de documentarse casos relacionados con PV en los países industrializados debido al desarrollo de la vacuna contra este patógeno (Sattar y Tetro, 2001). Sin embargo, a partir de los años 40 comienzan a descubrirse los primeros brotes de hepatitis víricas asociados a consumo de alimentos. Aunque ya existen referencias de brotes de ictericia asociados al agua anteriores al siglo XX (Mosley, 1967) e incluso en la antigüedad (Schmid, 2001), el estudio de la transmisión alimentaria de hepatitis A se vió muy limitado debido a que la enfermedad no llegó a estar bien definida clínicamente hasta principios de la Segunda Guerra Mundial. Especialmente importante fue el brote de hepatitis ocurrido en Nueva Delhi (1955-1956) que afectó a aproximadamente 29.000 personas y que daría lugar, a finales de los años 50, al inicio de la virología ambiental como disciplina científica. Sin embargo, no sería hasta la década de los 90 cuando una revisión de este mismo brote identificaría al virus de hepatitis E (HEV) y no al virus de la hepatitis A (HAV) como el agente causal.

Paralelamente, y durante la mayor parte de los años 40 y los 50, el papel de los patógenos bacterianos como causa de gastroenteritis fue reconociéndose cada vez más. Sin embargo, las infecciones bacterianas no podían explicar la mayoría de las enfermedades gastrointestinales o grandes brotes asociados a un cuadro clínico de vómitos y diarrea aguda, asociados en muchos casos al consumo de alimentos (Cliver, 1969, 1983).

En 1955 se describen en Suecia (Roos, 1956) y posteriormente en EEUU (Mason y McLean, 1962) los primeros brotes documentados de hepatitis A transmitida por moluscos bivalvos, el primero de ellos asociado a más de 600

casos de hepatitis tras la ingesta de ostras crudas. El brote epidémico más importante de HAV ocurrió en Shangai en 1988 afectando a aproximadamente 300.000 personas con un total de 47 muertos. El brote se asoció al consumo de almejas crudas contaminadas con aguas residuales (Halliday *et al.*, 1991).

En 1929, Zahorsky ya había descrito por primera vez la “hemis-hiperémesis” o “enfermedad de los vómitos de invierno”, una enfermedad caracterizada por la aparición repentina de vómitos y diarrea, principalmente durante los meses de invierno (Zahorsky, 1929). Durante los siguientes 40 años se documentaron numerosos brotes de características similares, no obstante, el patógeno causante no sería identificado hasta 1972. Ese año Kapikian *et al.* detectaron mediante microscopía inmuno-electrónica (MIE) partículas virales en heces de voluntarios infectados experimentalmente con filtrados de heces, libres de bacterias, de pacientes afectados por un brote de gastroenteritis ocurrido en una escuela de Norwalk, Ohio (EEUU) en 1968 (Kapikian *et al.*, 1972). Fue el primer aislamiento de un virus causante de gastroenteritis, y recibió el nombre de Norwalk-virus, actualmente prototipo del género norovirus (NoV) (familia *Caliciviridae*).

Las dos principales familias virales asociadas a ETA (familia *Picornaviridae* y *Caliciviridae*) fueron paulatinamente añadiendo miembros a sus listas y agrupándose en distintos géneros (Tabla 1) principalmente gracias a los avances en microscopía electrónica (ME) durante los años 70 (Madeley y Crosgrave, 1975; Kapikian *et al.*, 1972) y, posteriormente, durante los años 80 y 90, gracias a las técnicas de inmunoensayo para la detección de antígenos en muestras fecales (muy útiles en el esclarecimiento de los brotes de gastroenteritis) (Herrmann *et al.*, 1995). A partir de los años 90 los avances en el desarrollo de técnicas de biología molecular, como la retrotranscripción asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, del inglés *Reverse transcriptase-Polimerase Chain Reaction*), permitieron a su vez la detección y caracterización de los genomas virales dando un último impulso a la disciplina (Jiang *et al.*, 1992, 1993).

Cien años después del primer brote documentado (Jubb, 1915), las ETA de etiología viral se reconocen como uno de los principales problemas a nivel mundial en seguridad alimentaria, siendo HAV y NoV los principales agentes etiológicos. El aumento de casos documentados de ETA detectados con agente causal vírico reconocido se debe en gran medida a los factores anteriormente citados, como el aumento poblacional, la escasez de agua y cambios en los hábitos alimentarios, pero también a los avances metodológicos, principalmente de carácter molecular, que han posibilitado en gran medida la detección viral.

La contaminación viral de agua y alimentos representa uno de los principales retos dentro de la seguridad alimentaria. El desarrollo de un comercio global sin procedimientos de seguridad virológica apropiados, tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo, junto con la ineficacia de los estándares microbiológicos existentes como indicadores de contaminación, ilustra la vulnerabilidad actual del mercado alimentario global.

Actualmente, no existe una vigilancia sistemática de las ETA de etiología viral. El impacto real de estas enfermedades en la población humana y sistemas sanitarios es a día de hoy desconocida y los datos existentes se limitan a unos cuantos países industrializados (Morris, 2011). Muchos de estos países, a pesar de contar con algún nivel de notificación de brotes de ETA, no incluyen las enfermedades de etiología viral y/o no suelen centrarse en la transmisión alimentaria como fuente de infección. Como resultado, las estadísticas nacionales sobre las ETA de etiología viral son difíciles de conseguir y, cuando existen, reflejan una importante infraestimación de los casos (O'Brien, 2008). Las estimaciones sobre la prevalencia de estas enfermedades son discutibles, pero van desde el 5 % para la hepatitis A al 12-47 % para NoV. Se calcula que en EEUU el 27 % de todas las hospitalizaciones causadas por ETA y el 12 % de las muertes son causadas por virus, siendo NoV el principal responsable (Scallan *et al.* 2011a, 2011b).

La red FBVE (del inglés, *Food-Borne Virus in Europe*), ha desarrollado una base de datos electrónica común para facilitar la comparación de datos y

armonizar la nomenclatura de cepas virales ([www.rivm.nl/bnwww](http://www.rivm.nl/bnwww)) (Duizer *et al.*, 2008; Koopmans *et al.*, 2003). El objetivo de la red es establecer un marco para el intercambio rápido de datos epidemiológicos, virológicos y moleculares sobre los brotes de gastroenteritis viral y hepatitis aguda causada por HAV y HEV, tanto para fines de investigación como de vigilancia. Surgida de esta plataforma, la *NoroNet*, se creó con el fin de ampliar el conocimiento sobre las tendencias geográficas y temporales en la aparición y propagación de las variantes de NoV, y limitar así el impacto y la magnitud de epidemias futuras. A día de hoy, la virología alimentaria es una disciplina aún emergente y en rápida expansión.

### **1.2.2. Características generales de los virus entéricos**

Los virus implicados en las ETA son principalmente los virus entéricos. Éstos, se encuentran en el intestino humano y son excretados en las heces de personas infectadas en altas cantidades ( $10^5$ – $10^{11}$  partículas virales/g de heces de individuos afectados por gastroenteritis o hepatitis) (Farthing, 1989). Se transmiten mediante la ruta fecal-oral, infectando a su hospedador vía tracto gastrointestinal, tras su ingesta (Koopmans y Duizer, 2004). La mayoría de los virus entéricos son virus de pequeño tamaño (generalmente entre 27 y 35 nm), poseen RNA monocatenario (mc) de sentido positivo (+) y no presentan envoltura lipídica (desnudos), perteneciendo al grupo IV según la clasificación Baltimore. Algunas excepciones incluyen a coronavirus (CoV), que aunque pertenecen también al grupo IV de la clasificación Baltimore tienen envoltura lipídica, rotavirus (RV), del grupo III que son virus con RNA bicatenario (bc), adenovirus (AdV) del grupo I que son virus con ADNbc, y parvovirus (PaV) perteneciente al grupo II con ADNmc de sentido negativo (-) (Tabla 1).

Los virus entéricos son virus que se caracterizan por ser generalmente muy estables fuera del hospedador. Su resistencia natural a condiciones ácidas, como las producidas por las enzimas digestivas y sales biliares en el tracto digestivo humano, les permite sobrevivir en el medio ambiente bajo condiciones estresantes y les confiere una alta resistencia a los procesos

bactericidas de uso habitual en producción alimentaria. La mayoría de los virus de transmisión alimentaria son de origen humano y generalmente de hospedador específico, tanto las cepas animales como humanas, por lo que aunque se han aislado cepas animales de NoV en heces de personas, no parecen estar implicadas en enfermedades en humanos (Oliver *et al.*, 2003; Sugieda *et al.*, 1998; van der Poel *et al.*, 2000). La mayoría de los virus entéricos tienen una dosis infectiva baja, entre 10 y 100 partículas o incluso menos en el caso de NoV, por lo que a pesar de no multiplicarse en la comida, una pequeña cantidad de partículas infectivas puede cursar enfermedad (Teunis *et al.*, 2008).

Hay una variedad de síndromes clínicos asociados a la infección con virus entéricos, desde vómitos y diarrea leve hasta encefalitis grave, aunque las infecciones asintomáticas son también comunes. En general pueden agruparse en tres grandes tipos de enfermedades, (i) gastroenteritis, causada entre otros por NoV, sapovirus (SaV), RV, astrovirus (AsV), aichivirus (AiV) y AdV, que causan vómitos y diarrea; (ii) hepatitis de transmisión entérica, causados por HAV y HEV, que migran hacia el hígado, donde se manifiesta la enfermedad con dolores abdominales e ictericia; y (iii), un tercer grupo que se replica en el intestino humano, pero sólo causa la enfermedad después de migrar a otros órganos, como los ojos, sistema nervioso central o sistema respiratorio causando enfermedades como conjuntivitis, poliomielitis, meningitis y encefalitis. En este grupo se encuentran virus como PV, enterovirus (EV), coxsackievirus (CoxV) o echovirus (EchV).

### 1.2.3. Principales virus entéricos

La transmisión alimentaria de etiología viral se ha identificado, hasta el momento, para un amplio número de especies virales, pertenecientes a 11 familias diferentes (Tabla 1) (Newell *et al.*, 2010). Sin embargo, desde un punto de vista epidemiológico, las familias *Caliciviridae* y *Picornaviridae*, y más concretamente NoV y HAV, son las más importantes atendiendo al número de casos y la gravedad de la enfermedad, respectivamente (Koopmans

y Duizer, 2004). Estos dos virus centran la atención de la presente tesis doctoral.

### **1.3. Virus de la Hepatitis A**

#### **1.3.1. Historia**

La hepatitis viral es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Las primeras descripciones de ictericia epidémica se encuentran en la literatura china y en los trabajos de Hipócrates, que datan del s.V a.C. Durante los s. XVII y XVIII fueron frecuentes las epidemias en Europa entre la población civil y militar, sin embargo no fue hasta principios del s. XX cuando se empezó a sospechar que el agente infeccioso responsable podría ser un virus (Schmid, 2001). Durante esta época aparecieron evidencias de una segunda forma de hepatitis transmitida aparentemente a través del suero humano: la “hepatitis sérica”. El agente etiológico se denominó virus de la hepatitis B (HBV). Ésta enfermedad era claramente diferente de la “hepatitis infecciosa”, llamada hepatitis A, cuyo agente etiológico se denominó HAV (Hollinger y Emerson, 2007; Melnick, 1995; Sánchez-Tápias, 1995). Las dos enfermedades se diferenciaban claramente en el periodo de incubación (de 2 a 4 semanas en la hepatitis A y de 1 a 3 meses en la hepatitis B) y en la vía de transmisión (fecal-oral en la hepatitis A y transmisión parenteral/sexual en la hepatitis B) (Hunter *et al.*, 1997). Los primeros datos sobre las alteraciones que HAV producía en el hígado se produjeron en 1967 tras conseguir la propagación del virus en primates no humanos (Deinhardt *et al.*, 1967). En 1973 se consiguieron visualizar por MIE las partículas víricas (Feinstone *et al.*, 1973) y en 1979 se consiguió la multiplicación *in vitro* de HAV en células derivadas de hígado o riñón de mono (Provost y Hilleman, 1979).

En los últimos 30 años se ha avanzado de forma espectacular en el conocimiento de la hepatitis A y su agente etiológico. Se ha conseguido clonar y secuenciar el genoma de HAV (Cohen *et al.*, 1987a, b; Lemon *et al.*, 1991, 1992; Linemeyer *et al.*, 1985; Ticehurst *et al.*, 1983), se ha estudiado su

estructura antigénica (Lemon *et al.*, 1991), el mecanismo de replicación (Agnès *et al.*, 1994; Bishop y Anderson, 1997a, 1997b), las mutaciones que permiten la adaptación al cultivo *in vitro* (Cohen *et al.*, 1987a; Emerson *et al.*, 1993; Graff *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995), y se han realizado estudios epidemiológicos (Jansen *et al.*, 1990; Melnick, 1995; Papaevangelou, 1992; Robertson *et al.*, 1991, 1992). La posibilidad de obtener grandes cantidades de virus en líneas celulares ha permitido la elaboración de vacunas basadas en virus inactivados y se ha evaluado su utilización para prevenir la enfermedad (Koff, 1998; Rosenthal, 1998).

### 1.3.2. Taxonomía y diversidad genética y antigénica

HAV, clasificado dentro de la familia *Picornaviridae*, es el único miembro del género *Hepatovirus* (Minor, 1991). La familia *Picornaviridae* perteneciente al orden Picornvirales se compone en la actualidad de 46 especies agrupadas en 26 géneros: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicpivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* y *Tremovirus* (Knowles *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2013) (Figura 1).

Durante mucho tiempo se consideró a HAV como un miembro del género *Enterovirus* (serotipo 72) en base a sus similitudes físicas y epidemiológicas con este género. Sin embargo, las diferencias en la estructura, estabilidad, replicación y distancia genética del HAV con miembros de otros géneros dentro de la familia *Picornaviridae* sugirió su clasificación en un nuevo género (Palmenberg, 1989).

Tabla 1. Características de los principales virus entéricos

Familia	Género	Especie tipo	Otras especies relevantes	Ac. Nucleico	Tamaño del genoma (Kb)	Simetría/Morfología	Tamaño (nm)	Envoltura	Cultivable	Enfermedad
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	Norwalk-virus	Southampton virus	RNAme(+)	7,4-7,7	Icosaédrica	28-35	N	N	Gastroenteritis
			Lordsdale virus	RNAme(+)	7,5	Icosaédrica	27-32	N	S <sup>a</sup>	Inflamación del hígado, Hepatitis
			Hawaii virus Snow Mountain virus	RNAme(+)	7,2-8,4	Icosaédrica	28-30	N	S <sup>a</sup>	Poliomielitis Meningitis encefálicas
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	EV	Poliavirus	RNAme(+)	8,25	Icosaédrica	30	N	S	Gastroenteritis
			Coxsackievirus Echovirus	RNAme(+)	8	Icosaédrica	--	N	--	Gastroenteritis
			Po Kobavirus Bo Kobavirus	RNAme(+)	7,0-8,0	Icosaédrica	28-30	N	S <sup>a</sup>	Gastroenteritis
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastroviridae</i>	Astrovirus	Klassevirus	RNAme(+)	7,2	Icosaédrica	32-34	N	N	Inflamación del hígado, Hepatitis
			HEV	RNAme(+)	9,5-12,5	Icosaédrica	45-60	N	--	Encefalitis
			TBEV	RNAme(+)	20-30	Helicoidal	80-220	S	S <sup>a</sup>	Gastroenteritis
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus	SARS-CoV	RNAme(+)	20-30	Helicoidal	80-220	S	S <sup>a</sup>	Infección respiratoria
			MERS-CoV	RNAme(+)	4	Icosaédrica	35-40	N	--	Gastroenteritis
			Picobirnavirus	DNAme (-)	5	Icosaédrica	20-30	N	N	Gastroenteritis
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirus</i>	Parvovirus	Rotavirus	RNAbc	16-27	Icosaédrica	60-80	N	S	Gastroenteritis
			Adenovirus	DNAbc	28-45	Icosaédrica	70-90	N	S <sup>a</sup>	Infección respiratoria, conjuntivitis, gastroenteritis
			Adenovirus	DNAbc	28-45	Icosaédrica	70-90	N	S <sup>a</sup>	Infección respiratoria, conjuntivitis, gastroenteritis

<sup>a</sup> No todas las cepas del género son cultivables. Las cepas silvestres son a menudo difíciles de cultivar

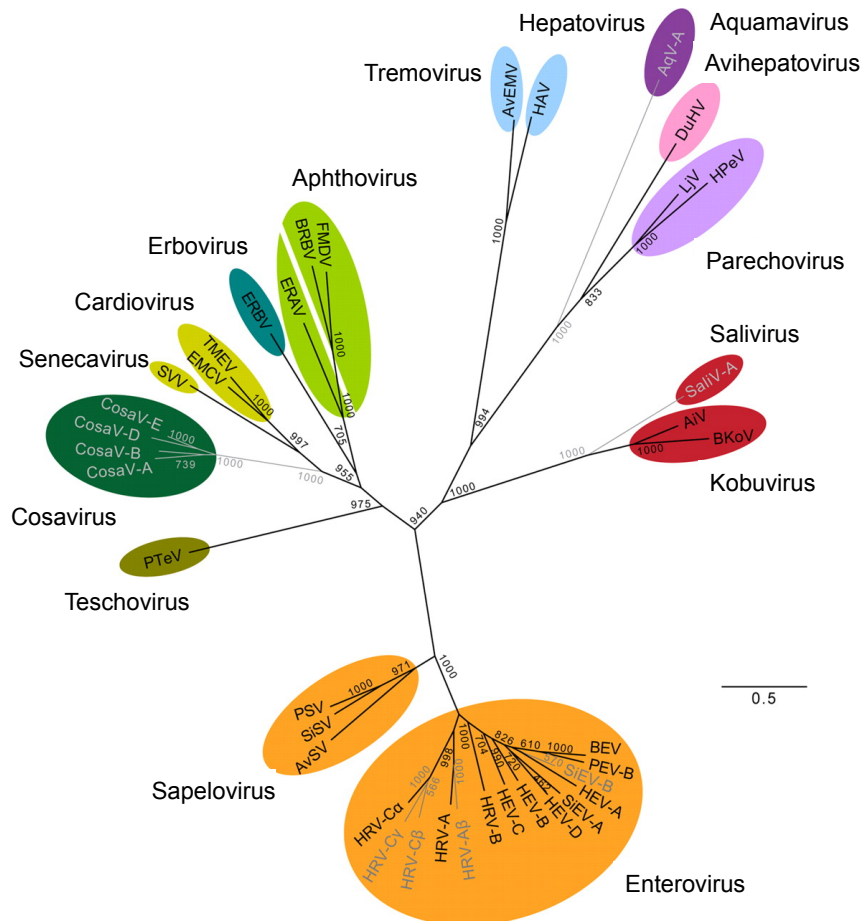
El estudio de la diversidad genética de HAV y su comparación con otros géneros se vio impulsada por la secuenciación del genoma completo de la cepa HM-175 y la utilización de regiones parciales del genoma altamente variables como la parte C-terminal de la región VP3, la parte N-terminal de la región VP1 y la región de unión VP1/VP2A (Jansen *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1991, 1992). Mediante el análisis de la región VP1/VP2A, Robertson *et al.* (1992) sentaron las bases taxonómicas de HAV, estableciendo 7 genotipos distintos (I-VII), y definiendo el genotipo como un grupo de virus con más del 85 % de similitud en la secuencia nucleotídica. Los genotipos I y III se dividieron a su vez en dos subgenotipos, definiendo el concepto de subgenotipo como virus cuya secuencia no difiere en más de un 7,5 % entre sí (Nainan *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1992; Tsarev *et al.*, 1991).

Posteriormente, Costa-Mattioli *et al.* (2003) han establecido relaciones filogenéticas utilizando la secuencia completa de VP1 (900 nucleótidos). Las conclusiones del trabajo determinaron que HAV se debe clasificar en 6 genotipos diferentes, 3 con origen humano (I – III) y 3 con origen en primates (IV – VI) (Figura 2). Esta es la clasificación reconocida actualmente.

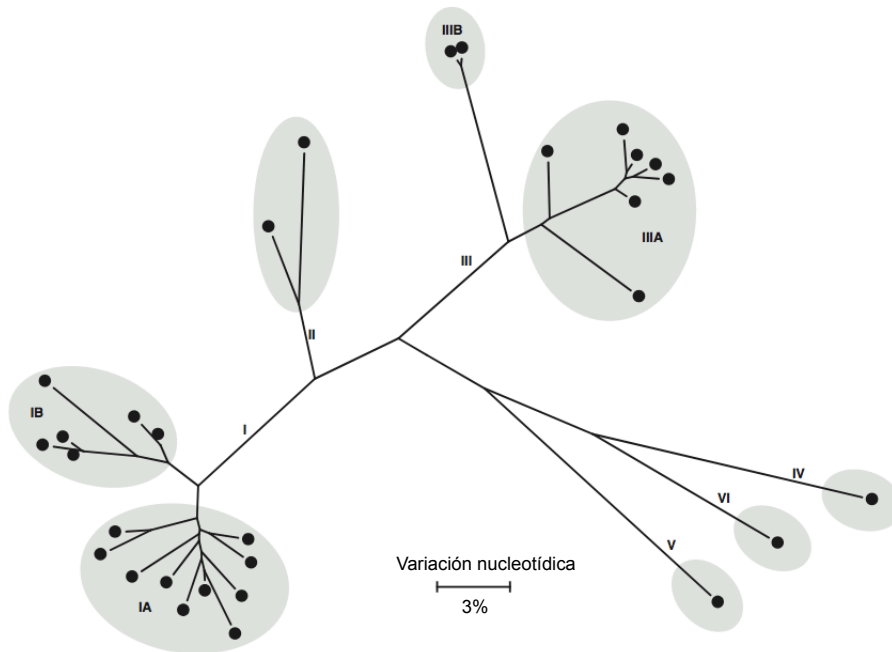
La secuenciación de la región VP1/VP2A sigue utilizándose, aunque también se secuencian la parte C-terminal de VP3 y la parte N-terminal de VP1 como una única región VP3-VP1 de 186 pares de bases.

A pesar de las diferencias nucleotídicas entre las diferentes cepas, HAV muestra un alto grado de conservación antigénica, identificándose hasta la fecha un único serotipo causante de la infección en humanos (Lemon y Binn, 1983).

Tampoco se han descrito diferencias en el transcurso de la enfermedad causada por diferentes cepas. Se postula que, a pesar de la variación genética, existen limitaciones estructurales en las proteínas de la cápside que obligan a mantener su estructura antigénica sin modificaciones. Este es el motivo por el que, tras la infección con HAV, el individuo adquiere generalmente inmunidad durante toda la vida contra posibles reinfecciones. Sin embargo, se han encontrado variantes virales con modificaciones vinculadas a sitios antigénicos.

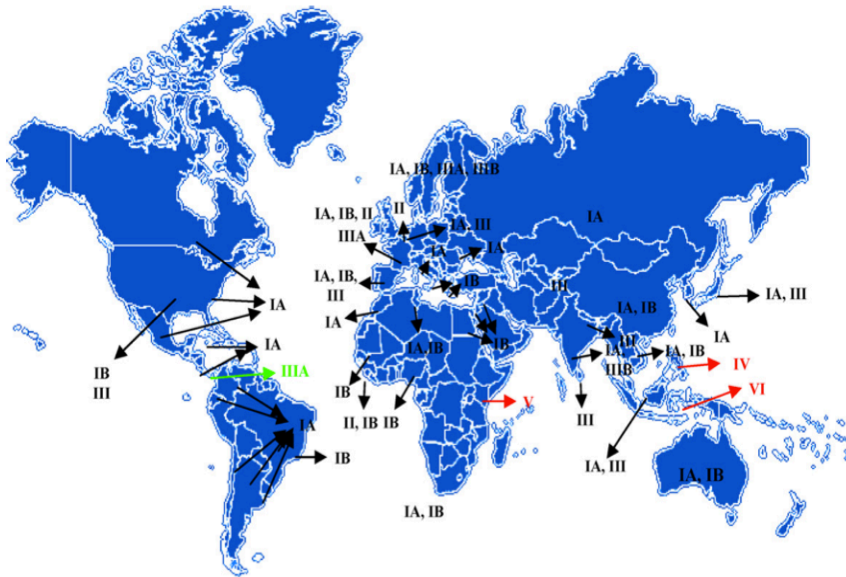


**Figura 1: Árbol filogenético de los géneros más representativos de la familia *Picornaviridae*.** La figura muestra la filogenia de 38 picornavirus representando la diversidad de especies de la familia. El análisis filogenético está basado en la familia de proteínas altamente conservadas 1B, 1C, 1D, 2C, 3C y 3D (Lauber y Gorbalenya, 2012).



**Figura 2: Clasificación genotípica y subgenotípica del HAV.** La figura muestra los seis genotipos del HAV propuestos por Costa-Mattioli, 2003, y actualmente reconocidos. (Modificado a partir de Vaughan *et al.*, 2014).

La distribución geográfica a nivel mundial de los diferentes genotipos del HAV se muestra en la Figura 3. El genotipo I es el más prevalente en el mundo, y el subgenotipo IA más común que el IB. Ambos subgenotipos son detectados frecuentemente en Norteamérica, Sudamérica, Europa, China y Japón (Robertson *et al.*, 1992; Costa-Mattioli *et al.*, 2001a, 2001b).



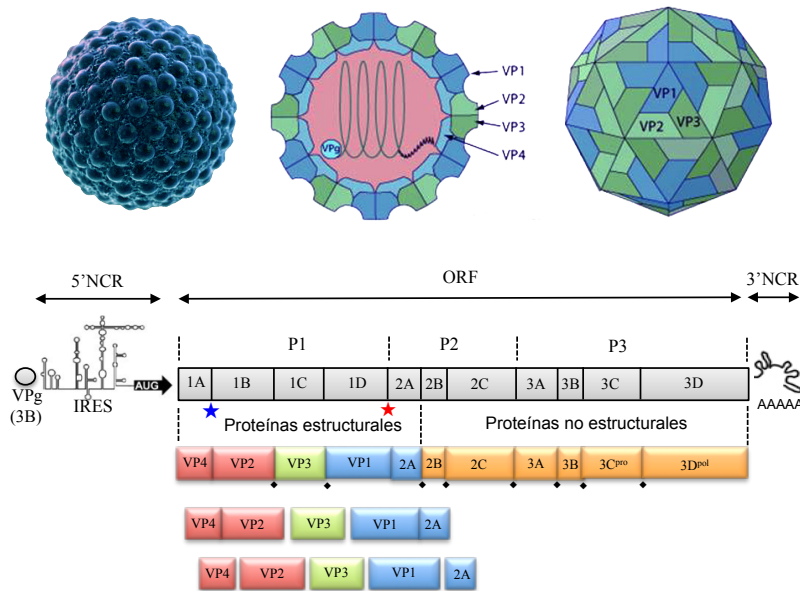
**Figura 3: Distribución geográfica de los genotipos de HAV.** Los genotipos aislados a partir de humanos están representados en negro y los genotipos aislados a partir de monos están representados en rojo. El genotipo IIIA aislado en primates autóctonos de Panamá está representado en verde (Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

### 1.3.3. Estructura y organización genómica

HAV es un virus sin envoltura, sin estructuras superficiales y con un diámetro de 27-32 nm. Su cápside presenta simetría icosaédrica (Feinstone *et al.*, 1973) (Figura 4). Tiene una densidad en cloruro de cesio de 1.33-1.34 g/mL y un coeficiente de sedimentación de 150-160 S en solución neutra de sacarosa (Ticehurst, 1983). A partir de suspensiones fecales o de cultivos infectados se han podido detectar partículas no infecciosas que podrían corresponder a proviriones inmaduros con o sin RNA (Bishop y Anderson, 1997a; Nüesch *et al.*, 1989; Polish *et al.*, 1999).

El genoma viral está constituido por RNA monocatenario (mc) lineal de polaridad positiva (+) de unas 7,5 kilobases (Kb). A diferencia de muchos virus

RNA, el genoma del HAV está altamente conservado, con una variación promedio de sólo 1-4 % (Cromeans *et al.*, 2001).



**Figura 4: Representación esquemática de la estructura y organización genómica del HAV.** El genoma está compuesto por una cadena de RNA de polaridad positiva que contiene una pauta de lectura abierta (ORF) que codifica para una poliproteína procesable por la proteasa viral 3C<sup>pro</sup>. La poliproteína es autoprosesada por la proteasa viral 3C<sup>pro</sup> en todos los sitios de escisión (♦), con la excepción de dos divisiones hechas por proteasas distintas de la 3C<sup>pro</sup> viral: una proteasa celular todavía por identificar (□), que libera el fragmento 2A de la cápside, y una actividad proteolítica desconocida (□), que participa en el último proceso de maduración de la cápside. NCR, Región No Codificante. IRES, Sitio Interno de Entrada del Ribosoma (modificado de Pintó *et al.*, 2012).

En la organización genómica de HAV se diferencian tres regiones (Figura 4):

- Región no codificante (NCR, del inglés *Non Coding Region*) del extremo 5'. Es la región más conservada del genoma, con más de un 92 % de similitud entre las diferentes cepas (Hollinger y Emerson, 2007). El extremo 5' NCR

representa un 10 % del genoma y se encuentra unido covalentemente a la proteína VPg (del inglés *Viral Protein Genome linked*). 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.

- Región no codificante del extremo 3'. El extremo 3'NCR tiene un tamaño mucho menor que el extremo 5'NCR y está poliadenilado. Es una región altamente variable entre cepas y con una estructura secundaria marcada.
- Región codificante. Entre los dos extremos no codificantes se encuentra una única pauta de lectura abierta (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) que codifica la poliproteína (P0) de aproximadamente 250 KDa. La ORF se encuentra dividida en tres regiones: P1, P2 y P3, procesadas a partir de la poliproteína P0. La región P1, dividida a su vez en 1A, 1B, 1C y 1D, codifica para proteínas estructurales o de la cápside VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente. Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales implicadas en la replicación (2A, 2B, 2C y 3A, 3B, 3C, 3D). 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<sup>pro</sup> es una proteasa responsable de la mayor parte del procesado post-transcripcional de la poliproteína P0 y la proteína 3D<sup>pol</sup>, es una RNA polimerasa RNA dependiente (Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

#### **1.3.4. Replicación viral**

Una vez que HAV entra en contacto con la célula diana mediante un receptor de membrana específico, el genoma viral se libera en el citoplasma celular e involucra la liberación de la proteína VP4 y la separación del RNA de la cápside, proceso denominado descapsidación (Bishop y Anderson, 1997a, b; Racaniello, 2001). A continuación comienza la replicación viral. El RNA (+) actúa como RNA mensajero (RNAm), uniéndose a los ribosomas de la célula y comenzando la traducción proteica.

La poliproteína P0 es procesada por la proteasa 3C<sup>pro</sup> de forma simultánea a la traducción del RNA. El procesamiento proteolítico, comienza con el corte de la poliproteína y ocurre en la región de unión 2A/2B (Martin *et al.*, 1995). El segmento formado por las proteínas no estructurales 2B-3D (incluyendo la proteasa 3C<sup>pro</sup> y la polimerasa 3D<sup>pol</sup>), es liberado a partir de los dominios P2 y P3 de la poliproteína, formando un complejo macromolecular replicativo que comienza la síntesis de nuevo RNA viral. Esto ocurre en las membranas del retículo endoplasmático de la célula (Gosert *et al.*, 2000). El precursor estructural P1 es cortado de nuevo generando dos precursores de las proteínas de la cápside, VP0 y VP1-2A (Anderson y Ross, 1990). Mientras que VP0 es procesada por la proteasa 3C<sup>pro</sup> (generando las proteínas VP4, VP3 y VP2), el caso de VP1-2A es distinto. La proteína 2A, que en otros picornavirus posee actividad proteolítica, en el caso del HAV es una extensión de la proteína estructural VP1 que actúa como señal primaria para el ensamblaje de la partícula viral. Durante la maduración de la cápside, 2A es eliminada por una proteína desconocida de la célula hospedadora (Morace *et al.*, 2008) (Figura 4).

Cuando el complejo replicativo está formado, el RNA viral es utilizado como molde para la replicación, la cual tiene lugar en dirección opuesta a la traducción (Gamarnik y Andino, 1998). Además de las proteínas virales, es necesaria la formación de los elementos de replicación en *cis*. Tras la traducción de las proteínas virales, la formación del complejo replicativo y de los elementos de replicación en *cis*, y la replicación del genoma viral, tiene lugar la encapsidación, maduración y liberación de las partículas virales a través de la membrana celular sin provocar un efecto citopático (ECP) acusado (Molla *et al.*, 1991).

La mayoría de picornavirus tienen cuatro polipéptidos en la cápside, incluida la proteína VP4 de pequeño tamaño localizada la parte N-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 *et al.*, 1993) que no ocurre en el caso de HAV.

Se desconoce el motivo por el cual el ensamblaje de la cápside de HAV es diferente del resto de picornavirus, pero se cree que puede estar relacionado con la replicación intrahepática de este virus.

El IRES de HAV (modelo tipo III) es único entre los picornavirus (Brown *et al.*, 1994; Ehrenfeld y Teterina, 2002) y constituye una de las características más importantes en la estrategia replicativa del genoma de HAV, debido a su baja eficiencia en la dirección de la traducción (Whetter *et al.*, 1994). La selección de un IRES poco eficiente es una cuestión evolutiva todavía por esclarecer. Se ha sugerido que esta estrategia podría atender a la necesidad de realizar dualmente las funciones de traducción y replicación en regiones adyacentes al extremo 5'NCR (Ehrenfeld y Teterina, 2002). Además, en otros picornavirus, la proteína 2A, con actividad proteolítica e implicada en la inhibición de la producción de proteínas celulares, es la responsable de que la maquinaria traduccional de la célula sea utilizada casi en su totalidad para la producción de proteínas virales (Leong *et al.*, 2002). Esto no ocurre en HAV, que debe competir de manera ineficaz por la maquinaria traduccional celular. Este hecho conduce a un uso preferencial de ciertos codones, en comparación con otros miembros de la familia *Picornaviridae*, adaptándose al uso de codones raros complementarios a los de las células humanas (Sánchez *et al.*, 2003a).

Este uso poco óptimo de la selección preferencial de codones se interpreta como un mecanismo para evitar la competencia con los RNA transferentes (RNAt) de la célula, dado que HAV no puede inhibir la traducción de proteínas celulares (Sánchez *et al.*, 2003b). Todas estas características contribuyen a una replicación lenta y de bajo rendimiento. Sin embargo, la evolución de HAV hacia una selección de codones poco óptima responde probablemente a una estrategia adaptativa, patente si se compara su infectividad específica (1 unidad infectiva por cada 60 unidades físicas), con la de otros virus como por ejemplo PV, que inducidos artificialmente hacia el uso de codones poco frecuentes muestran una tasa infectiva de 1 unidad infectiva por cada  $10^3$ - $10^4$  unidades físicas (Domingo *et al.*, 2005).

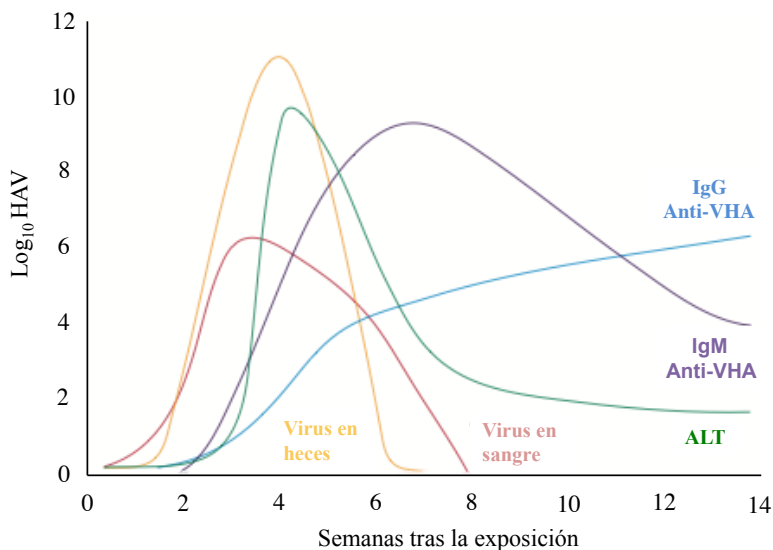
### 1.3.5. Cuadro clínico e inmunidad

Tras su ingestión, HAV alcanza el hígado a través de la vena porta. Una vez en los hepatocitos, las partículas virales infectan, se replican, se ensamblan y son expulsadas a la bilis. A través del conducto biliar, HAV alcanza el intestino y es excretado en las heces. El mecanismo exacto por el que el virus alcanza el torrente sanguíneo no está totalmente esclarecido. Se cree que, al igual que ocurre con PV, HAV puede alcanzar el torrente sanguíneo a través de las células M presentes en las placas de Peyer en el íleon distal (Ouzilou *et al.*, 2002). Otro posible mecanismo sería que las partículas virales recubiertas con Ig-A atravesaran las células del epitelio intestinal que contienen receptores apicales de inmunoglobulinas (Dotzauer *et al.*, 2005). El ciclo enterohepático del virus continúa hasta que éste es neutralizado por los anticuerpos Ig-M, Ig-A e Ig-G específicos (Martin y Lemon, 2006). La respuesta de las Ig-M se mantiene por un periodo corto de tiempo y suele utilizarse como un marcador de la fase aguda de la enfermedad. Las Ig-A, presentes en suero y heces, también son inducidas durante poco tiempo. Por el contrario, las Ig-G suelen durar toda la vida del individuo, confiriendo inmunidad ante posibles reinfecciones (Hollinger y Emerson, 2007; Lemon y Binn, 1983) (Figura 5).

El espectro clínico de la hepatitis A varía desde infección asintomática a 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 la presencia de 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. Con menos frecuencia se puede producir mialgia, prurito, diarrea, artralgia y erupciones cutáneas. No existen evidencias de enfermedad crónica hepática 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 de bilirrubina total (7 mg/dL), fosfatasa alcalina (319 Unidades, U/L), aspartato aminotransferasa (1,76 U/L) y alanina aminotransferasa (1,95 U/L) en suero de pacientes con hepatitis A hasta 2 meses después del comienzo de la enfermedad (Tong *et al.*, 1995).



**Figura 5: Evolución de los títulos virales y signos clínicos durante una infección de hepatitis A.**

En aquellos casos de infección sintomática, la aparición de los síntomas por lo general comienza 2 semanas después de la exposición y los signos clínicos duran más de 5 semanas. Entre los signos clínicos, es notable el aumento de actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica (verde). La respuesta inmunológica incluye a la Ig-M (púrpura) e Ig-G (azul) anti-HAV. En cuanto a la evolución de los virus en sangre (rojo) se desarrolla desde antes de la aparición de los síntomas hasta más de 3 semanas después, alcanzando picos de aproximadamente  $10^6$  copias de RNA/mL de suero. De la misma manera, la presencia de virus en las heces (naranja) se produce desde antes de la aparición de los síntomas hasta aproximadamente 3 semanas después, con picos de aproximadamente  $10^{11}$  copias de RNA/g de heces. Modificado de Pintó *et al.*, (2012).

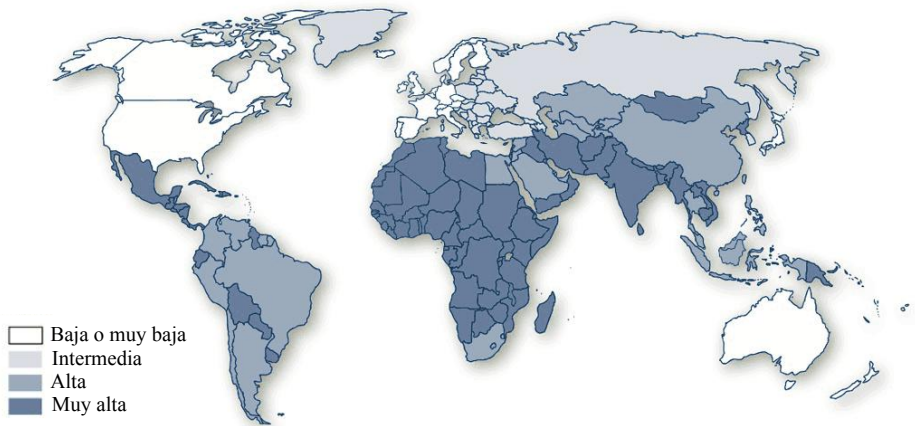
En ocasiones pueden producirse manifestaciones clínicas atípicas como la colestasis prolongada, daño hepático agudo o casos raros de hepatitis autoinmune. Otras complicaciones pueden ser la anemia aplásica, eritroblastemia y pancreatitis aguda, entre otras. La hepatitis fulminante es una complicación 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 *et al.*, 2003).

### 1.3.6. Epidemiología y prevalencia

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial, que puede presentarse de forma esporádica o bien en brotes epidémicos. La tasa de incidencia está estrechamente correlacionada con ciertos indicadores socioeconómicos, principalmente el nivel económico de la región o país, su nivel de desarrollo sanitario y el acceso a agua potable y sistemas de distribución de agua seguros y saneados (Jacobsen y Koopman, 2004, 2005). Según su prevalencia se pueden diferenciar cuatro modelos epidemiológicos: endemicidad alta, intermedia, baja y muy baja, correlacionados con los niveles de Ig-G anti-HAV en los habitantes de una región (Figura 6).

La mayor prevalencia de HAV en el mundo se encuentra en los países más pobres, con un nivel sanitario poco o nada desarrollado, dónde existe una exposición universal durante la infancia y una seroprevalencia superior al 90 %. En países en vías de desarrollo aparece el segundo modelo epidemiológico, endemicidad intermedia. La incidencia en la población infantil es más baja, seroprevalencia del 20-30 %, lo que produce un aumento de las infecciones con manifestaciones clínicas en los adultos jóvenes expuestos (Dominguez *et al.*, 1995; Jacobsen y Wiersma, 2010; Melnick, 1995). En países desarrollados aparece el modelo de endemicidad baja. En estas zonas la enfermedad ocurre principalmente en adolescentes, adultos pertenecientes a grupos de riesgo y personas que han viajado a países con una endemicidad intermedia o alta. La prevalencia de anticuerpos es baja en la población infantil (<10 %) y moderada

en la población adulta (30-70 %) (Domínguez *et al.*, 1995; Melnick, 1995). El cuarto modelo es exclusivo de países con un nivel socioeconómico elevado. Actualmente, en estas regiones las infecciones por HAV están desapareciendo. La seroprevalencia en adultos jóvenes es inferior al 10% y en la población de edad más avanzada se sitúa entre el 30 y 60% (Domínguez *et al.*, 1995).



**Figura 6: Distribución geográfica de la prevalencia de antígeno anti-HAV (2008)**  
(Modificado de Nothdurft, 2008).

### 1.3.7. Vías de transmisión

HAV se transmite principalmente mediante la ruta fecal-oral, por consumo de agua o alimentos contaminados con aguas residuales, aunque la transmisión por contacto persona-persona es también común. El contacto con superficies contaminadas, normalmente mediante fómites, 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 *et al.*, 1994). La transmisión sexual de HAV también se ha documentado, especialmente entre el colectivo homosexual (Hutin *et al.*,

2000; Stene-Johansen *et al.*, 2002, 2007; Tortajada *et al.*, 2009). Ocasionalmente pueden darse casos de transmisión mediante ruta parenteral (Noble *et al.*, 1984; Sheretz *et al.*, 2005), a través de transfusiones de sangre, aunque tales casos no son comunes. Se han dado brotes de hepatitis A entre drogodependientes. En estos casos la transmisión puede ser multifactorial, debido al contacto y escasa higiene de los individuos, al compartir jeringuillas u otros utensilios de preparación de la droga (Hutin *et al.*, 2000).

Dado que HAV es excretado en las heces en un elevado número de copias, su transmisión se ve facilitada por condiciones sanitarias deficientes. La mejora de las condiciones sanitarias y las prácticas de higiene en los países desarrollados han cambiado los patrones epidemiológicos de la hepatitis A, registrándose un aumento en la susceptibilidad a este patógeno en la población adulta, debido a una disminución de su prevalencia (Koopmans y Duizer, 2004). Esto aumenta el riesgo de infección por consumo de productos frescos importados de regiones donde HAV es endémico y donde las condiciones higiénicas son por lo general deficientes. La transmisión de HAV debido a alimentos o agua contaminada (discutido en mayor detalle en la sección 1.6) son especialmente importantes porque pueden desembocar en grandes brotes, sobretodo en regiones de endemicidad baja o intermedia.

Existe una gran proporción de casos de Hepatitis A cuya ruta de transmisión no es identificada, muchos de ellos debidos a un contacto personal con un individuo frecuentemente asintomático.

### **1.3.8. Estabilidad físico-química**

HAV presenta una alta resistencia a diversos agentes y procesos físicos y químicos como el secado, calentamiento, pH y disolventes, y en general, exhibe una mayor resistencia a agentes estresantes que otros picornavirus. HAV es muy estable en el medioambiente, especialmente cuando se asocia con materia orgánica, lo que permite su mantenimiento y propagación en la población. Puede sobrevivir desde días hasta meses en agua dulce, agua de mar,

aguas residuales, sedimentos marinos y moluscos bivalvos (Hollinger y Emerson, 2007; Sobsey *et al.*, 1988).

HAV es resistente al calor, reteniendo su integridad e infectividad tras un tratamiento a 60 °C a pH neutro durante 60 minutos. El virus se inactiva parcialmente tras 10-12 h a 56 °C. Su resistencia al calor es mayor cuando se encuentra en alimentos, especialmente cuando se encuentra internalizado en los tejidos o matrices alimentarias, que le ofrecen protección (Hollinger y Emerson, 2007; Le Guyader y Atmar, 2008). Bajo refrigeración y condiciones de congelación los virus permanecen intactos e infecciosos durante varios años. Es también resistente al secado, permaneciendo infeccioso durante más de un mes a 25 °C y 42 % de humedad y mostrando incluso mayor resistencia en condiciones de baja humedad y temperatura (McCaustland *et al.*, 1982).

Es capaz de sobrevivir en las manos de humanos y en fómites durante largos periodos (Mbithi *et al.*, 1992). Estas características facilitan su transmisión por contacto persona a persona y a través de agua y alimentos contaminados. El virus es estable a pH 1 y sobrevive a un marinado ácido a pH 3,75 en mejillones durante al menos 4 semanas (Hollinger y Emerson, 2007; Hewitt and Greening, 2004). Aunque su infectividad decrece entre 2 y 5 log tras la su exposición a alcohol al 70 % durante 3 minutos, es resistente a varios disolventes incluyendo cloroformo, freón, éter al 20 %, o triclorofluoroetano (Hollinger y Emerson, 2007; Provost y Hilleman, 1979, Scholz *et al.*, 1989). HAV no se inactiva con cloramina-T (1g/L durante 15 min a 20°C) o ácido percloroacético (300 mg/L durante 15 min a 20 °C) (Hollinger y Emerson, 2007). La irradiación gamma no es efectiva para su inactivación en frutas y verduras frescas (Bidawid *et al.*, 2000), pero sí se inactiva mediante alta presión hidrostática (HHP, del inglés *High Hydrostatic Pressure*). La presión hidrostática utilizada actualmente como método de preservación isotérmico para alimentos perecederos, inactiva el HAV tras 5 minutos de exposición a 450 MPa (Kingsley *et al.*, 2002a).

### 1.3.9. Cultivo celular

Algunas cepas de HAV pueden ser cultivadas en diferentes líneas celulares de primates incluyendo: células de riñón del mono verde africano (BSC-1), células de riñón de macaco (FRhK-4 y FRhK-6) y fibroblastos humanos. Las cepas salvajes son difíciles de cultivar y generalmente no producen ECP en cultivo celular. Debido a la ausencia de ECP, también se suele utilizar la inmunofluorescencia para la detección del antígeno del HAV en células infectadas. El virus tiene un crecimiento lento, y su rendimiento en cultivo celular es más bajo que otros picornavirus. Como consecuencia, el virus es difícil de identificar en muestras clínicas, alimento o muestras ambientales sólo mediante cultivo. Bajo condiciones normales el virus requiere tres semanas para su crecimiento *in vitro*. Sin embargo, mediante mutaciones se ha adaptado alguna cepa, como la HM-175, para una mejor replicación y la producción de un ECP más claro (Brack *et al.*, 1998) y han sido extensivamente utilizadas en investigación. Estas cepas requieren menos tiempo para su cultivo *in vitro* y producen un ECP visible. Las técnicas moleculares como la PCR han llegado a ser el método preferente para la detección de virus en muestras no humanas (ver sección 1.5), mientras que el diagnóstico clínico suele estar basado en la respuesta inmune del paciente.

## 1.4. Norovirus

### 1.4.1. Historia

En 1929, Zahorsky describe por primera vez una enfermedad denominada como “hemis -hiperémesis” o “enfermedad de los vómitos de invierno” (del inglés, *Winter vomiting disease*), caracterizada por una diarrea auto-limitada acompañada de náuseas, vómitos y dolor abdominal, típica de los meses de invierno (Zahorsky, 1929).

Durante las cuatro décadas siguientes se documentaron múltiples brotes de enfermedades que coincidían clínica y epidemiológicamente con la descrita por Zahorsky (Cumming y McEvedy, 1969; Foley y Chin, 1959; Hopkins, 1958;

Ingalls y Britten, 1951; Miller y Raven, 1936; Riemann *et al.*, 1945; Smillie *et al.*, 1948; Levitt *et al.*, 1970), realizándose, de manera infructuosa, numerosos intentos con el fin de cultivar *in vitro* el virus, así como estudios de infección con voluntarios para caracterizar el agente etiológico de la enfermedad (Blacklow *et al.*, 1972; Clarke *et al.*, 1972; Gordon, 1955; Gordon *et al.*, 1947; Jordan *et al.*, 1953; Kojima *et al.*, 1948). Sin embargo, el agente causal no fue identificado hasta 1972, cuando Kapikian *et al.* visualizaron mediante MIE partículas virales en las heces de voluntarios inoculados con filtrados fecales procedentes de un grupo de estudiantes de una escuela de primaria en Norwalk (Ohio, Estados Unidos) que habían padecido un brote de gastroenteritis en 1968 (Kapikian *et al.*, 1972). Observaron unas partículas víricas pequeñas y de aspecto redondeado, a las que denominaron virus Norwalk, considerado actualmente como el prototipo del género NoV. Desde la década de los 70, este tipo de virus eran conocidos como "Virus tipo Norwalk" (NLV, del inglés *Norwalk-Like Virus*) o "Virus pequeños de estructura redonda" (SRSV, del inglés *Small Round Structure Viruses*). Los primeros nombres de estos virus se determinaron por la ubicación en donde se detectó cada cepa (Norwalk, Hawaii) o por su apariencia física al visualizarlos por ME. El virus Norwalk fue el primer virus detectado que se asoció específicamente a casos de gastroenteritis aguda. En 1978 se produce en Australia, uno de los primeros brotes registrados de NoV de origen alimentario, asociado con el consumo de ostras (Murphy *et al.*, 1979; Grohmann *et al.*, 1980). Sin embargo, durante décadas, el estudio de su papel como agente causal de enfermedad se ha visto obstaculizada por la falta de sensibilidad de las técnicas de diagnóstico clásico y la imposibilidad de su cultivo celular.

La clonación y secuenciación del genoma del virus Norwalk a principios de la década de los 90 (Xi *et al.*, 1990) supuso un gran avance en el conocimiento de su estructura molecular, cambiando la comprensión de su importancia clínica y epidemiológica, y permitiendo el desarrollo de pruebas de diagnóstico. Su caracterización inicial situó al virus Norwalk como miembro de la familia *Caliciviridae*, dentro del género *Norovirus*.

#### 1.4.2. Taxonomía y diversidad genética y antigénica

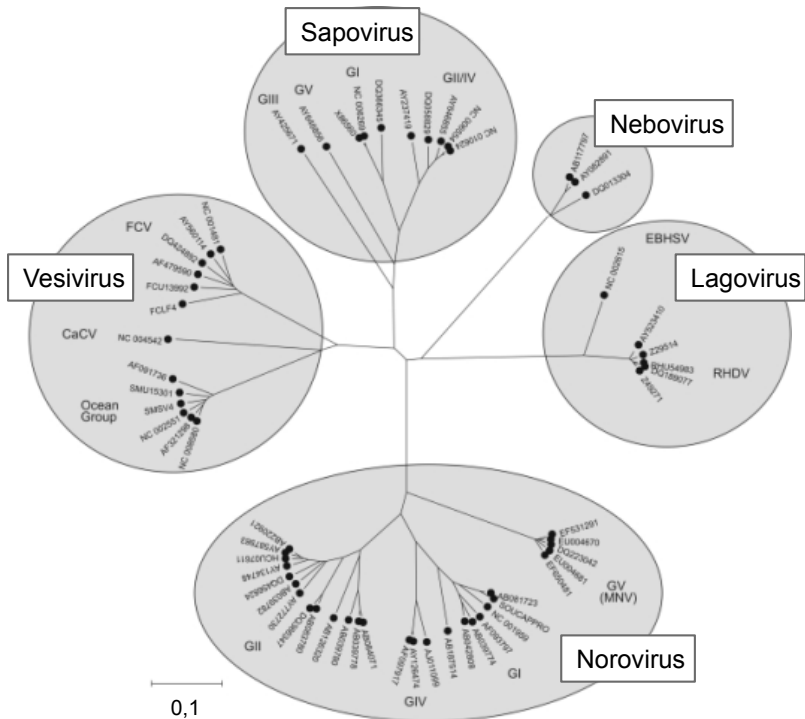
El género *Norovirus*, se clasifica dentro de la familia *Caliciviridae*, compuesta por 5 géneros (*Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* y *Nebovirus*) (Clarke *et al.*, 2012) (Figura 7). La familia *Caliciviridae* fue propuesta en el año 1974. Hasta entonces, los calicivirus constituían un género dentro de la familia *Picornaviridae* (Barry *et al.*, 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 su clasificación dentro de una familia distinta (Burroughs y Brown, 1974).

Históricamente, los análisis de reactividad cruzada mediante MIE en experimentos de infección con voluntarios fueron la base para la clasificación de NoV (Green *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1990; Wyatt *et al.*, 1974). Sin embargo, estas clasificaciones antigénicas resultaban muy poco precisas debido principalmente a reacciones cruzadas entre los anticuerpos (Ando *et al.*, 2000). El serotipado directo de NoV mediante sero-neutralización todavía no es una técnica aplicable (Duizer *et al.*, 2004) debido a la imposibilidad de cultivo de NoV, por lo que son la RT-PCR y la secuenciación genómica las principales técnicas empleadas para la caracterización y la comprensión de las relaciones existentes entre las distintas cepas (Ando *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 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 *et al.*, 2000; Vinjé *et al.*, 2004).

El género NoV presenta una elevada variabilidad genética consecuencia de mutaciones puntuales y procesos de recombinación entre cepas durante la co-infección en una misma célula. Numerosos estudios establecen que la secuencia del gen de la cápside varía hasta en un 60 % entre los distintos genogrupos y hasta en un 57 % en los NoV humanos (Green *et al.*, 1995; Katayama *et al.*,

2002; Vinjé *et al.*, 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. A pesar de esto, la dinámica evolutiva de NoV sigue siendo en gran medida desconocida (Zheng *et al.*, 2006)

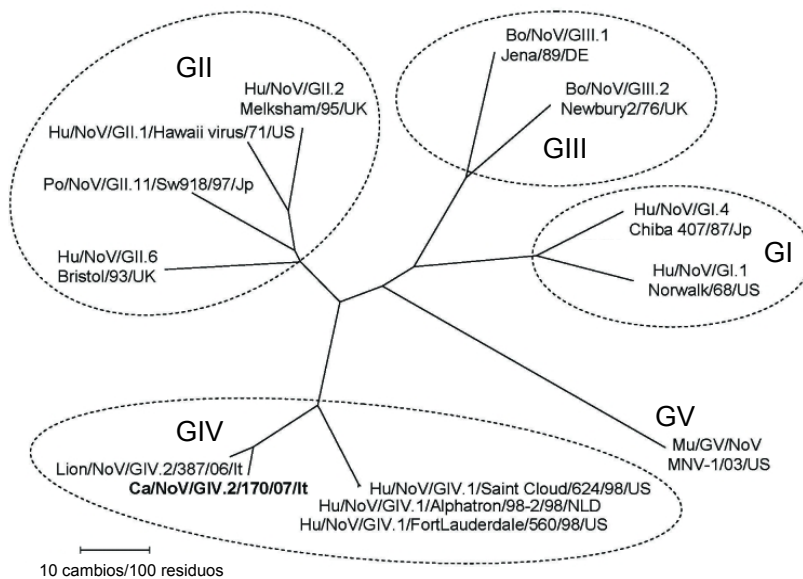


**Figura 7:** Árbol filogenético de la familia *Caliciviridae* construido a partir del análisis de la región codificante para la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp). Modificado de Simmonds *et al.*, 2008).

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

La clonación del genoma de NoV, además de la ya mencionada aplicación en las técnicas moleculares como la RT-PCR, permitió expresar *in vitro* proteínas víricas en sistemas de expresión procariotas y eucariotas. Basándose en estas técnicas, se han clasificado los NoV en cinco genogrupos (GI-GV) con 32 genotipos, definidos por tener al menos un 80 % de identidad sobre la secuencia total de la cápside (Ando *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006) (Figura 8).



**Figura 8:** Árbol filogenético de los diferentes genogrupos de NoV construido en base a la secuencia completa de la proteína de la cápside. (Modificado de Martella *et al.*, 2007)

Las cepas pertenecientes a los genogrupos GI, GII y GIV infectan a los seres humanos, mientras que las pertenecientes a los genogrupos GIII y GV infectan animales. Los genogrupos I y II son los más diversos, contando con 8 y 19 genotipos distintos, respectivamente (Zheng *et al.*, 2006, 2010). Dentro del GII, además de las cepas humanas existen 3 genotipos porcinos. Dentro del GIV,

junto con las cepas humanas, existe un genotipo que infecta al león (Martella *et al.*, 2007). El GIII incluye cepas bovinas, clasificadas en dos genotipos distintos. El GV consta de un único genotipo murino (Zheng *et al.*, 2006). La cepa de origen murino, MNV-1, es el único NoV capaz de crecer en cultivo celular (Karst *et al.*, 2003). Recientemente, se ha propuesto un nuevo genogrupo (GVI) con una única cepa de origen canino (Mesquita *et al.*, 2010).

### 1.4.3. Estructura y organización genómica

NoV es un virus sin envoltura con simetría icosaédrica y un diámetro entre 27 y 30 nm. El genoma viral consiste en una molécula lineal de RNAmc (+) de entre 7,3 y 8,3 Kb, y un contenido de guanina-citosina (G+C) entre el 45 y el 56 % (van der Poel, 2000).

El genoma viral se organiza en:

- El extremo 5'NCR, a la que se encuentra covalentemente unida la proteína VPg, 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 *et al.*, 2003).
- La región codificante está formada por tres pautas abiertas de lectura (ORF1, ORF2 y ORF3), que codifican los genes estructurales y no estructurales (Green, *et al.*, 2001).

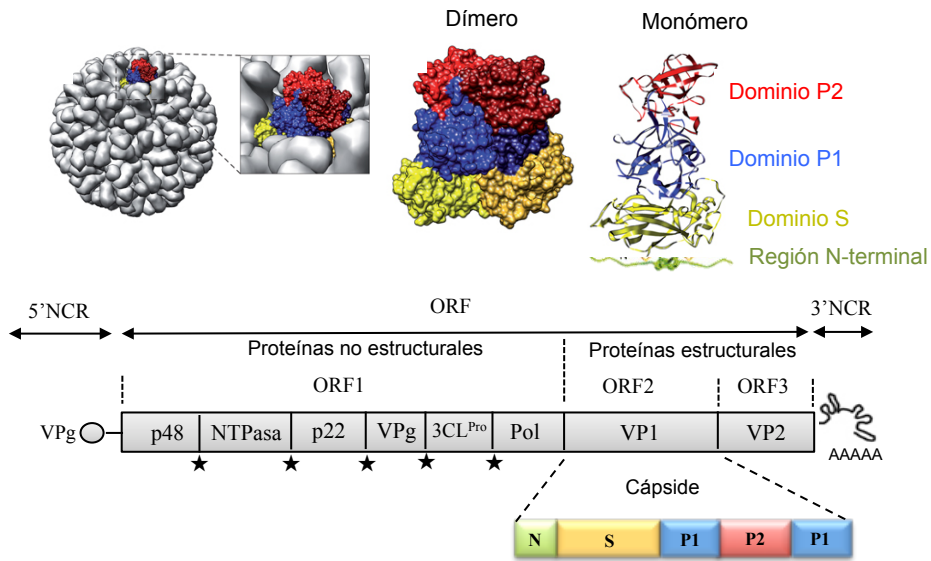
La ORF1, situada en el extremo 5', codifica una poliproteína de 194 KiloDaltons (KDa) que es escindida por la proteasa viral 3CL<sup>Pro</sup> en 6 proteínas no estructurales, implicadas en la replicación y transcripción viral: (i) la proteína N-terminal (N) de 37 KDa, (ii) una nucleótido trifosfatasa (NTPasa) de 40 KDa, (iii) la proteína p22 de 20,2 KDa, (iv) la proteína VPg de 15,8 KDa, (v) una proteasa (3CL<sup>Pro</sup>) de 19,3 KDa y (vi) una RdRp (Pol) de 56,8 KDa (Belliot *et al.*, 2003).

La ORF2, codifica la proteína principal de la cápside (VP1), de un tamaño de 60 KDa. La estructura atómica de esta proteína, determinada mediante cristalografía de rayos X, consta de (i) un dominio protuberante (P), dividido a su vez en dos subdominios, P1 y P2, y (ii) un dominio cubierta (S) (del inglés *Shell*).

El dominio S, altamente conservado, constituye la región más interna de la cápside que envuelve al genoma viral. El dominio P, unido al S, forma las protuberancias de estructura arqueada que surgen de la cubierta y es de naturaleza más variable. El subdominio P1, moderadamente conservado, es una región de unión entre S y P2. El subdominio P2, se sitúa en la superficie del virus y es codificado por la región más variable del genoma (Chakravarty *et al.*, 2005; Tan y Jiang, 2010), posee receptores para la unión a la célula hospedadora, por lo que se considera responsable de la antigenicidad viral (Figura 9).

La ORF3, es una región variable del genoma que 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 viral (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003) (Figura 9).

La autoordenación de la proteína VP1 en pseudo-partículas virales (VLP, del inglés *Virus-Like Particles*) es un proceso eficiente que no requiere ni del RNA ni de la proteína menor VP2. La cápside viral está compuesta por 90 dímeros de la VP1 que se disponen formando una cubierta de la cuál salen 90 capsómeros a modo de protuberancias y dispuestos de tal manera que forman 32 cavidades en la superficie de la partícula viral.



**Figura 9: Representación esquemática de la estructura viral y organización genómica de NoV.** El genoma se divide en tres pautas abiertas de lectura: ORF1, 2 y 3. ORF1 codifica las proteínas no estructurales: p48, NTPasa, p22, VPg, 3CL<sup>Pro</sup> y Pol. Los sitios de escisión de la proteasa se indican mediante estrellas. La ORF2 codifica la cápside viral (VP1) y la ORF3 codifica una proteína estructural menor (VP2). Las proteínas VP1 y VP2 vienen codificadas a partir de un ARN subgenómico unido a VPg. En la ORF2, N es el brazo N-terminal (verde) y S se refiere a la región interior, la parte más conservada de la cápside (amarillo). El dominio P, dividido en P1 y P2 (azul y rojo, respectivamente) conforma la superficie del virus, de la que P2 es su dominio más variable y expuesto (Modificado de Donaldson *et al.*, 2010).

#### 1.4.4. Replicación viral

La replicación tiene lugar en el citoplasma de los enterocitos, previa interacción entre el virus y la célula huésped, mediante receptores específicos y la liberación del genoma viral en el citoplasma celular. Estas primeras interacciones no se conocen en detalle, pero se sabe que el reconocimiento del receptor es esencial para el ciclo infeccioso de NoV. El genoma viral, de sentido positivo, juega a su vez el papel de RNA<sub>m</sub>. La polimerasa RdRp utiliza el genoma viral como molde para la síntesis de una hebra de RNA

complementaria de sentido negativo, la cual será transcrita en más copias de genoma RNA (+) que a su vez servirán para codificar la síntesis de las proteínas estructurales VP1 y VP2 empezando por el extremo 3' de la hebra de RNA (+) y con implicación de proteínas celulares (Gutierrez-Escolano *et al.*, 2003). La traducción inicial del genoma viral está mediada por interacciones entre la proteína VPg, ligada al genoma, con los mecanismos de traducción celular. El RNA se une a los ribosomas celulares y comienza la traducción proteica. La ORF1 es traducida en una poliproteína que será digerida por la proteasa vírica 3CL<sup>Pro</sup> para dar lugar a otras seis proteínas: p48, NTPasa, VPg (que se une al final 5' para iniciar la traducción), una polimerasa RpRd y la propia 3CL<sup>Pro</sup>. Dichas proteínas no estructurales intervienen en los procesos de copia del RNA(+) a RNA(-) que será utilizado como cadena molde para generar un RNA subgenómico (+) de unas 2,8 Kb. Éste RNA subgenómico será traducido para producir la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) y unas cuantas moléculas de la proteína secundaria de la cápside (VP2), que finalmente se autoensamblarán generando las partículas virales. La ausencia de actividad correctora en la polimerasa produce una tasa de error relativamente alta durante la transcripción. Esta es la causa de que NoV, al igual que otros virus RNA, sean genéticamente muy diversos y altamente adaptables a diferentes condiciones.

#### **1.4.5. Cuadro clínico e inmunidad**

Los síntomas descritos para la gastroenteritis asociada a la infección con NoV incluyen náuseas (79 %), vómitos (69 %), diarrea (66 %), fiebre leve (37 %), escalofríos (32 %), dolor abdominal (30 %), mialgias (26 %) y cefalea (22 %) (Kaplan *et al.*, 1982). Las heces no suelen presentar sangre ni moco. El período de incubación promedio es de 24 a 48 horas (período en que la transmisión es máxima), y los síntomas se suelen resolver en 12-72 horas (Kaplan *et al.*, 1982), a pesar de que, en algunos casos, su duración pueden alargarse, principalmente en ancianos, niños o individuos inmunocomprometidos (Lopman *et al.*, 2004a; Murata *et al.*, 2007). En los

niños, parece que el vómito se produce con más frecuencia que la diarrea, mientras que en los adultos, ocurre lo contrario.

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 (Lopman *et al.*, 2004a; Rockx *et al.*, 2002). La eliminación viral de carácter asintomático se produce hasta 3 semanas después de la resolución de los síntomas, aunque se han observado períodos aún más largos en niños menores de 1 año (Kirkwood y Streitberg, 2008; Murata *et al.*, 2007; Rockx *et al.*, 2002). Se ha descrito también la persistencia de infección con síntomas durante más de 1 año en pacientes pediátricos oncológicos (Simon *et al.*, 2006) y en adultos inmunodeprimidos (Nilsson *et al.*, 2003). Esto proporciona una gran oportunidad para la transmisión del virus a otros seres humanos. 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. Los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección que ofrece una protección parcial frente a infecciones posteriores, aunque esta es de corta duración (entre 6 y 14 semanas) (Johnson *et al.*, 1990; Parrino *et al.*, 1977; Rockx *et al.*, 2002).

Contrariamente a lo esperado, se ha demostrado que los individuos con títulos más elevados de anticuerpos en suero o heces tenían más probabilidad de infectarse con el virus que las personas con concentraciones bajas de anticuerpos. Este hecho se explica porque las personas sin anticuerpos frente a una cepa determinada de NoV no son genéticamente susceptibles a ella. Hay personas que son resistentes a la infección cuando se exponen por primera vez al virus, pero al volverse a exponer uno o dos años más tarde, desarrollan manifestaciones clínicas. Otros, en cambio, no las desarrollan nunca, hecho que sugiere, la existencia de una resistencia al virus determinada genéticamente. Hay estudios que han mostrado una asociación entre el fenotipo sanguíneo ABO

y el riesgo de desarrollar infección sintomática (Rockx *et al.*, 2005) (ver apartado 1.4.7).

#### **1.4.6. Epidemiología y prevalencia**

NoV son la principal causa de brotes de gastroenteritis aguda en todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, y responsables del 90 % de todos los brotes de origen no bacteriano (Scallan *et al.*, 2011a, 2011b). Se estima que tan sólo en EEUU, causan el 58 % de todas las ETA, y son los responsables del 26 % y el 11 % de todas las hospitalizaciones y muertes, respectivamente. A pesar de estas estimaciones, la incidencia de casos esporádicos de gastroenteritis aguda por NoV está mal documentada y probablemente altamente infraestimada en la mayor parte del mundo. Esto se debe tanto a una falta de un diagnóstico clínico rutinario, que impide precisar su prevalencia, como al carácter por lo general, medio-leve y auto-limitado de la enfermedad que cursa sin necesidad de acudir al médico (Harris *et al.*, 2008; Rondy *et al.*, 2011; Scallan *et al.*, 2011b).

En España no se realizan análisis virológicos rutinarios en caso de gastroenteritis, excepto para rotavirus y adenovirus, que son diagnosticados mediante ensayos inmunoenzimáticos. Estudios 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 Wit *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2010). Estudios realizados a nivel regional muestran datos similares (Hall *et al.*, 2011; Karsten *et al.*, 2009; Manso y Romalde, 2014).

Se ha observado que los diferentes genotipos y genogrupos de NoV tienen diferentes propiedades en lo que respecta a prevalencia y rutas de transmisión. También se han puesto de manifiesto diferentes susceptibilidades a la infección en humanos por diferentes genotipos y genogrupos en función de ciertos factores genéticos del hospedador (ver apartado 1.4.7). Alrededor del 90 % de los casos documentados de gastroenteritis debida a NoV se asocian con el genogrupo GII, y la mayoría de estos más concretamente con el genotipo GII.4 (Bull *et al.*, 2006; Gallimore *et al.*, 2007; Ramirez *et al.*, 2006; Siebenga *et al.*,

2007a, 2008). Los brotes pandémicos de NoV más importantes observados desde mediados de los 90 se deben a la emergencia y propagación de variantes de este genotipo (Lindesmith *et al.*, 2008). Aunque la razón de esta mayor prevalencia de ciertos genotipos no está todavía clara, se cree que podría ser debido a factores como un mayor “*fitness*” biológico, una mayor acumulación y excreción de partículas virales en las heces de personas infectadas, especificidad de receptor más diversa, y/o una mayor frecuencia de mutación (Huang *et al.*, 2005; Lopman *et al.*, 2004a; Shirato *et al.*, 2008).

La aparición secuencial y rápida propagación de nuevas variantes y/o cepas recombinantes de NoV, podría estar relacionada con su capacidad para evitar la inmunidad de grupo a corto plazo, gracias probablemente a alteraciones en su antigenicidad debido a la deriva genética (Lindesmith *et al.*, 2008; Parrino *et al.*, 1977). 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 *et al.*, 2004b; Gallimore *et al.*, 2007; Siebenga *et al.*, 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 *et al.*, 2004b; Lindesmith *et al.*, 2008).

En lo que respecta a su estacionalidad, los grandes brotes recurrentes del invierno en Europa son principalmente causados por cepas de GII.4 (Kroneman *et al.*, 2008). Sin embargo, tras las estaciones frías la prevalencia de GII.4 desciende. En las zonas tropicales, ocurre algo parecido pero asociado a las estaciones lluviosas, que es cuando GII.4 provoca la mayoría de brotes de gastroenteritis. Por otro lado, aunque las cepas del GI tienen una menor prevalencia en casos clínicos, se mantienen más estables durante todo el año (Bucardo *et al.*, 2008).

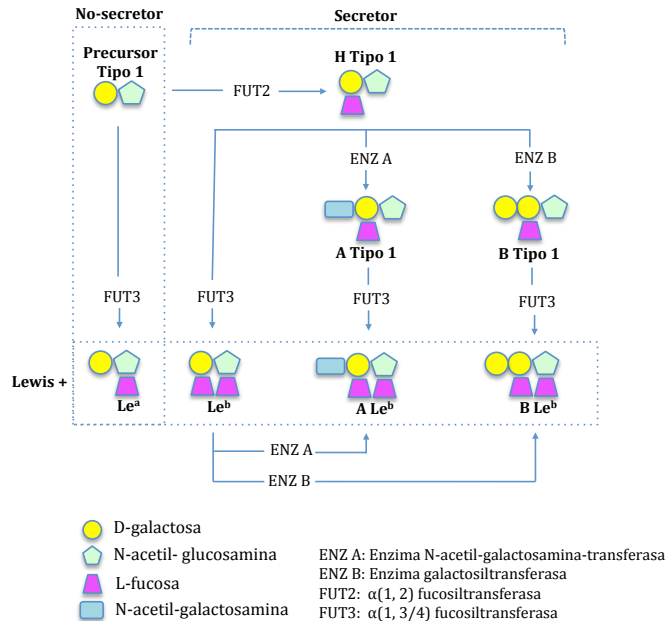
#### 1.4.7. Susceptibilidad genética a NoV. El papel del grupo de antígenos histo-sanguíneos.

La susceptibilidad humana a la infección por NoV viene determinada por el grupo de antígenos histo-sanguíneos humanos (HBGA) del sistema ABH, los antígenos del sistema Lewis (Le) y por el carácter secretor/no secretor de los individuos (Le Pendu *et al.*, 2006) (Figura 10). Los HBGA son carbohidratos complejos altamente polimórficos presentes en diferentes tipos celulares como eritrocitos, células endoteliales vasculares, células epiteliales del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio. Además, pueden estar presentes en la saliva, leche y otros fluidos corporales dependiendo del carácter secretor/no-secretor del individuo. Se sintetizan a partir de una serie de estructuras precursoras por adición gradual de monosacáridos, a través de un conjunto de glicosiltransferasas. A excepción de unos cuantos genotipos, los NoVs reconocen y se unen a los HBGA como paso previo a la infección.

Este reconocimiento se produce de una manera muy específica. Las diferentes cepas de NoV presentan diferentes perfiles de unión a estos receptores. Los perfiles de unión atienden a diferencias en la estructura de los carbohidratos de los diferentes antígenos del sistema ABH y Le, que constituyen los diferentes fenotipos antigénicos (Tabla 2).

La susceptibilidad a la infección con NoV se ha asociado con presencia de la  $\alpha$ -1,2 fucosa que viene determinada por el gen *FUT2*. Los HBGA se encuentran en la saliva y secreciones mucosas de las células epiteliales intestinales solo cuando los individuos son secretores. Estos individuos secretores, llevan el gen *FUT2*, que codifica una  $\alpha$ -1,2 fucosiltransferasa (*FUT2*). Un carbohidrato precursor es modificado por la *FUT2* para producir un carbohidrato tipo H. Este puede ser modificado aún más por la presencia de *FUT3* ( $\alpha$ -1,3 o 1,4 fucosiltransferasa) para producir los antígenos (Ag)  $Le^b$  y/o por las enzimas A y B para producir los Ag tipo A y tipo B. Los individuos con el gen *FUT2* no funcional (*FUT2* -/-) son denominados no-secretores y no expresan el Ag-H ni sus posteriores modificaciones ( $Le^b$ , A, B,  $Ale^b$ ,  $BLe^b$ ) en

la saliva ni secreciones mucosas (Atmar, 2010; Shirato, 2011; Tan y Jiang, 2010, 2011).



**Figura 10: Vías de biosíntesis de los HBGA humanos del sistema ABH y Lewis basado en el precursor tipo 1.** La síntesis de HBGA comienza con un disacárido precursor mediante la adición secuencial de un monosacárido. Cada etapa de la síntesis es catalizada por una glicosiltransferasa con sustratos y vínculos específicos. FUT3, una  $\alpha$ -1,3 o  $\alpha$ -1,4 fucosiltransferasa, es responsable de la adición de un residuo de fucosa al disacárido precursor mediante una unión  $\alpha$ -1,4, lo que resulta en un trisacárido llamado Lewis a ( $Le^a$ ). FUT2, otra fucosiltransferasa, añade un residuo de fucosa al precursor mediante una unión  $\alpha$ -1,2, produciendo un trisacárido llamado H tipo 1. Los genotipos *FUT2*(+/+) o (+/-) son fenotipo secretor o secretor +, mientras que el *FUT2*(-/-) es fenotipos no secretor o secretor -. La adición de otro residuo de fucosa al antígeno tipo H 1 por la FUT 3 resulta en un antígeno tetrasacárido Lewis b ( $Le^b$ ). Las enzimas A y B son glicosiltransferasas que añaden un N-acetilgalactosamina o una galactosa mediante enlace  $\alpha$ -1,3 al antígeno tipo H 1 para producir el tetrasacárido A tipo 1 y B tipo 1, respectivamente. Estos dos antígenos pueden transformarse aún más en los antígenos pentasacáridos A y B ( $A Le^b$  y  $B Le^b$ ), respectivamente, por la adición de un fucosa catalizada por la  $\alpha$ -1,3/4 fucosiltransferasa (FUT3). La totalidad de las vías pueden ocurrir igualmente para un precursor de tipo 2. Los productos correspondientes  $Le^a$  y  $Le^b$  en el tipo 1 son  $Le^x$  y  $Le^y$  para el tipo 2, respectivamente. (Modificado de Tan y Jiang 2007; Atmar, 2010).

Los individuos no-secretores (*FUT2*<sup>-/-</sup>), que representan aproximadamente el 20 % de la población, son altamente resistentes a las infecciones sintomáticas con las principales cepas de NoV aunque hay pruebas de que las cepas GII.4 han experimentado cambios evolutivos al reconocer antígenos Le de individuos no-secretores (de Rougemont *et al.*, 2011; Nasir *et al.*, 2012).

Debido a que las diferentes cepas de NoV humanos presentan especificidades distintas por los HBGA, la mayoría de ellas sólo infectan alguna vez a un subconjunto de la población. Esto sugiere una co-evolución patógeno-hospedador impulsada por las interacciones proteína viral-carbohidrato (Le Pendu *et al.*, 2006). La unión del NoV a los carbohidratos de los HBGA se produce a través de la región variable P2 de la proteína de la cápside VP1 (Tan y Jiang, 2010), que ha experimentado presiones evolutivas afectando a los fenotipos de reconocimiento (Parra *et al.*, 2012).

En la Tabla 2 se puede observar que no hay un único HBGA que se una a todas las cepas de NoV y que también existe variabilidad en los perfiles de unión de las diferentes cepas dentro de un mismo genotipo. Lo que no es evidente a partir de esta tabla es que, aun cuando varias cepas de NoV muestren unión a un HBGA común, la afinidad con la que se unen también puede variar (Huang *et al.*, 2005; Lindesmith *et al.*, 2008, 2010).

#### **1.4.8. Vías de transmisión**

La principal vía de transmisión es la ruta fecal-oral, tanto directa (mediante el contacto persona-persona) como indirecta (a través de comida o agua contaminadas). El virus puede persistir durante días o semanas en superficies y fômites que constituyen un reservorio importante, sobretodo en entornos cerrados, y que pueden actuar como foco continuo de infección. Puede diseminarse también mediante los aerosoles producidos por el vómito de individuos afectados contaminando el ambiente y provocando una transmisión directa (Lopman *et al.*, 2012; Otter *et al.*, 2011; Thornley *et al.*, 2011).

Tabla 2: Diferentes perfiles de unión de diferentes cepas de NoV a los HBGA.

Cepa	Genogrupo/ genotipo	A	B	H1	H2	H3	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Le <sup>x</sup>	Le <sup>y</sup>	Referencia
Norwalk	I.1	+		+		+		+		+	(Huang <i>et al.</i> , 2005)
GI.1 1968	I.1	+		+		+					(Lindesmith <i>et al.</i> , 2010)
GI.1 2001	I.1	+		+		+					(Lindesmith <i>et al.</i> , 2010)
GI.2 1999	I.2	+				+	+				(Lindesmith <i>et al.</i> , 2010)
Desert Shield	I.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	(Shirato, 2011)
GI.3 1999	I.3						+				(Lindesmith <i>et al.</i> , 2010)
VA115	I.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	(Shirato, 2011)
GI.4 2000	I.4	+					+		+		(Lindesmith <i>et al.</i> , 2010)
Boxer	I.8							+		+	(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Hawaii	II.1	+	+					+			(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Snow Mountain	II.2		+			+			NE	NE	(Tan and Jiang, 2007)
BUDS	II.2	+	+								(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Mexico	II.3	+	+					+			(Huang <i>et al.</i> , 2005)
GII.3 TV	II.3	+				+					(Cannon <i>et al.</i> , 2009)
VA387	II.4	+	+	+		+		+		+	(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Grimsby	II.4	+	+	+		+		+		+	(Tan and Jiang, 2007)
GII.4 1987	II.4					+				+	(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 1997	II.4	+	+			+		+		+	(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 2002	II.4					+				+	(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 2002a	II.4	+					+		+		(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 2004	II.4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 2005	II.4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	(Lindesmith <i>et al.</i> , 2008)
GII.4 2006	II.4	+	+			+					(Cannon <i>et al.</i> , 2009)
MOH	II.5	+	+								(Huang <i>et al.</i> , 2005)
VA207	II.9								+	+	(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Paris island	II.13	+	+					+			(Huang <i>et al.</i> , 2005)
OIF	II.16						+				(Huang <i>et al.</i> , 2005)

+, Unión; N, No unión; NE, No ensayado

Existe una variedad de factores que contribuyen a la alta capacidad de transmisión de NoV. Entre ellos está la alta estabilidad en el medio ambiente y resistencia a diferentes agentes físicos y químicos (Duizer *et al.*, 2004), la baja dosis infectiva requerida para una infección sintomática (10 partículas virales o incluso menos) (Teunis *et al.*, 2008), así como su acumulación y liberación prolongada en el tiempo (más de tres semanas después de la resolución de los síntomas) y en un elevado número de partículas virales en las heces ( $10^5$ - $10^9$

partículas/g de heces). Todos estos factores aumentan el riesgo de diseminación secundaria, sobretodo debido a una inadecuada manipulación alimentaria (Evans *et al.*, 2002; Kirkwood y Streitberg, 2008; Marks *et al.*, 2003; Parashar *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2009). Generalmente, la capacidad de infección mediante transmisión directa se mantiene, como promedio, sólo un día. Sin embargo, la larga duración de la secreción viral en las heces aumenta la capacidad de infección mediante transmisión ambiental (Lopman *et al.*, 2012). Su alta diversidad antigénica (Zheng *et al.*, 2006), y la ausencia de una inmunidad a largo plazo (Parrino *et al.*, 1977), conducen a muchas re-infecciones a partir de la misma o diferentes cepas de NoV y a la dificultad de desarrollar vacunas efectivas.

Los datos epidemiológicos indican que existen diferencias entre genogrupos en lo que respecta a sus vías de transmisión (Kroneman *et al.*, 2008; Nordgren *et al.*, 2009). Las cepas del GII suelen asociarse a casos con una transmisión mediante contacto persona-persona, mientras que las cepas de GI muestran una mayor prevalencia en los brotes de transmisión por agua y alimentos (Kroneman *et al.*, 2008; Verhoef *et al.*, 2010). Los estudios parecen indicar que esto es debido a una mayor resistencia de las cepas del GI frente a factores ambientales, favoreciendo su persistencia ambiental más a largo plazo (da Silva *et al.*, 2007; Nordgren *et al.*, 2009). En general, todas estas características hacen de NoV un patógeno con una alta capacidad de transmisión. De hecho, está considerado un agente de uso potencial en bioterrorismo de categoría B, según el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de EEUU (NIAID, del inglés *National Institute of Allergy and Infectious Disease*).

#### **1.4.9. Estabilidad físico-química**

La ausencia de un ensayo de infectividad para NoV ha lastrado desde su descubrimiento una adecuada evaluación de su resistencia a diferentes agentes desinfectantes y características de supervivencia, pudiendo evaluar su infectividad solo mediante estudios de dosis-respuesta en experimentos con voluntarios. Esto ha dirigido los esfuerzos hacia el estudio de otros géneros,

como modelo de NoV humanos, que tienen similitudes estructurales o genéticas y que son fácilmente cultivables dentro de la familia *Caliciviridae*, incluyendo el calicivirus felino (FCV) o el norovirus murino (MNV) (Dolin *et al.*, 1971; Green *et al.*, 2001).

En lo que respecta estrictamente a NoV, los estudios indican una amplia resistencia a la temperatura, pH y condiciones ambientales. Estudios en humanos indican que puede mantenerse infectivo tras someterse a 60°C durante 30 min. La infectividad de NoV se mantuvo tras 3 horas a pH 2,7 a temperatura ambiente o tratándolo con éter al 20 % a 4 °C durante 18 h (Dolin *et al.*, 1971; Green *et al.*, 2001). Keswick *et al.* (1985) describieron la resistencia a la desinfección por cloro libre en voluntarios después de una dosis de 3,75 mg/L de cloro libre durante 30 min, mientras que PV y RV se inactivaron completamente bajo las mismas condiciones. Duizer *et al.* (2004), detectaron mediante RT-PCR RNA viral de NoV GII.4 después de un tratamiento de 3.000 mg/L de cloro libre y 10 minutos de tiempo de contacto. Teniendo en cuenta los tratamientos de cloración comunes (1 mg/L de concentración media de cloro libre y 60 minutos de tiempo de contacto medio en EEUU), estos resultados implican un elevado riesgo de gastroenteritis por NoV a través del el agua potable clorada (AWWA, 2000; Payment *et al.*, 1991; White, 1999). Sin embargo, el virus es inactivado tras el tratamiento con 10 mg/L de cloro, que es la concentración aplicada en los suministros tras un evento de contaminación (Green *et al.*, 2001).

#### **1.4.10. Cultivo celular**

Hasta la fecha todos los intentos para propagar las cepas humanas de NoV han sido infructuosos. Se han evaluado más de 26 líneas celulares diferentes combinadas con una variedad de medios de cultivo y condiciones de crecimiento pero sin obtener ECP o replicación (Duizer *et al.*, 2004). Recientemente se ha conseguido mediante un cultivo tridimensional un pase *in vitro* con éxito tanto de GI como de GII (Straub *et al.*, 2007), aunque este trabajo no ha vuelto a ser confirmado por otros laboratorios.

Se han realizado grandes avances gracias al crecimiento en cultivo celular de la cepa MNV, que actualmente está considerada como el mejor modelo de NoV humano (Wobus *et al.*, 2004). Aunque no existe tampoco un modelo animal para NoV, sí se ha documentado la replicación de cepas humanas en primates no humanos y cerdos (Cheetham *et al.*, 2006; Rockx *et al.*, 2005; Subekti *et al.*, 2002). La ausencia de un cultivo *in vitro* para NoV también ha impedido el desarrollo de las técnicas tradicionales inmunológicas y serológicas, debido a la falta de antígenos necesarios para la producción de anticuerpos.

### 1.5. Detección de HAV y NoV en alimentos

Hasta la introducción de los métodos moleculares los virus entéricos eran identificados principalmente por ME. Los avances metodológicos (básicamente de tipo molecular como la RT-PCR y secuenciación) para la detección de virus entéricos no cultivables como NoV o de difícil cultivo (HAV, AsV, AdV, RV) han clarificado en los últimos años el papel que juegan ciertos alimentos en la transmisión de estos virus y su alta prevalencia en el medio ambiente. Estos métodos moleculares son actualmente los más empleados para la identificación de virus entéricos en alimentos aunque otros como la técnica de ELISA, el radio-inmunoensayo (RIA) y el cultivo celular (para los virus cultivables) siguen utilizándose. La ventaja de los métodos basados en el cultivo celular es que pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos, generando resultados no ambiguos con respecto a la presencia viral y su infectividad. Incluso cuando un brote viral está ligado epidemiológicamente al consumo de un determinado alimento, la carencia de métodos de detección sensibles y fiables complica la confirmación.

Los ensayos de infectividad no son, a día de hoy, un método útil para la detección de HAV y NoV. En relación a las técnicas inmunológicas empleadas en el diagnóstico clínico de HAV, estas están enfocadas a la detección de anticuerpos anti-HAV generados por la infección viral, principalmente Ig-M e Ig-G (Nainan *et al.*, 2005, 2006), mientras que la detección de antígenos (Ag)

es poco común. A pesar de que existen este tipo de sistemas para la detección de NoV en muestras fecales (Atmar y Estes, 2001), la sensibilidad incluso de los *kits* para la detección del Ag no es lo suficientemente alta para ser empleados en escenarios con poca concentración viral, como ocurre con los alimentos. Todo esto hace de las técnicas de amplificación genómica la mejor opción para el desarrollo de protocolos de detección viral de alta sensibilidad.

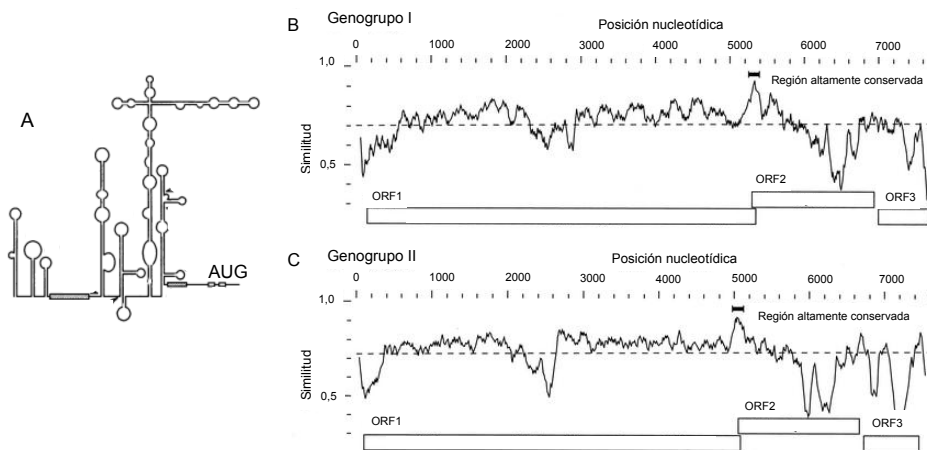
La RT-PCR convencional es la técnica más común para la detección viral en alimentos. En los últimos años, ha habido también un gran avance gracias a la RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) que, mediante sondas fluorescentes, permite no solo la detección sino también la cuantificación. De hecho, se ha desarrollado recientemente un método estándar basado en RT-qPCR para la detección y cuantificación de NoV y HAV en productos alimenticios, con vistas a ser incorporada a la legislación europea como método de referencia (ISO/TS 15216).

Tanto HAV como NoV son virus RNA que desarrollan complejas poblaciones de genomas mutantes o cuasi especies gracias a la alta tasa de error de sus polimerasas durante la replicación (Domingo y Holland, 1997). Debido a esto, el primer paso para el diseño de un ensayo de RT-PCR es a selección de cebadores y sondas altamente conservados.

Las regiones de RNA que contienen complejas estructuras multidominio, la mayoría involucradas en la traducción y/o replicación suelen ser regiones altamente conservadas (Ehrenfeld y Teterina, 2002; Paul, 2002). Como todos los picornavirus, HAV contiene este tipo de regiones en los extremos finales 5' NCR y 3' NCR de su genoma (Pöyry *et al.*, 1992). La traducción en los picornavirus es “cap-independentiente” (no depende de la metilación de la guanina del extremo 5' del RNAm para la iniciación de la traducción) y el reclutamiento de la maquinaria traduccional tiene lugar en el IRES, sitio contenido en la región 5'NCR. Esta región es particularmente adecuada como secuencia diana de amplificación en ensayos diagnósticos (Costafreda *et al.*, 2006; Costa-Mattioli *et al.*, 2003; Jothikumar *et al.*, 2005). Sin embargo, los calicivirus carecen de una región 5'NCR, y en particular de un IRES en su

genoma, y por otro lado las regiones 3'NCR presentan problemas de longitud de secuencia para su utilización.

Como consecuencia, para el caso de NoV se requieren métodos que incluyan varios conjuntos de sondas y cebadores para poder abarcar la diversidad de estos virus y no es suficiente un único ensayo (Atmar y Estes, 2001; Vinjé *et al.*, 2003). Una alternativa a estos sistemas múltiples de sondas y cebadores es el diseño de una pareja de cebadores y sonda que incluya codones para la metionina y el triptófano (familias de aminoácidos de codón único), debido a que cualquier mutación en estos sitios sería no sinónima y por tanto menos propensa a suceder. Estudios recientes han demostrado la presencia de regiones de relativamente alto grado de conservación en la región de unión 3'ORF1 y 5'ORF2 (Figura 11). Esta región se utiliza actualmente de manera habitual como zona diana para la amplificación por RT-qPCR (Kageyama *et al.*, 2003; Loisy *et al.*, 2005a).



**Figura 11: (A) Estructura secundaria de la 5'NCR de la cepa HM-175 de HAV (Modificado de Brown *et al.*, 1994). (B y C) Análisis de la variabilidad del genoma completo de NoV GI (B) y GII (C). La similitud media dentro de cada genogrupo se representa en línea de puntos (Modificado de Kageyama *et al.*, 2003)**

Estos métodos de detección no proporcionan resultados a nivel de genotipo. Para el genotipado de NoV, los sistemas están basados en análisis de secuencia de las regiones de la polimerasa y la cápside previo ensayo de RT-PCR convencional (Vinjé *et al.*, 2003, 2004). Para HAV la región más ampliamente utilizada para el genotipado es la región 2A N-terminal, la cual está incluida en un fragmento más largo correspondiente a la región de unión VP1-VP2A. Sin embargo, también se ha sugerido que el análisis de la región VP1 entera mejoraría la discriminación entre genotipos (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

Junto a la elección del sistema de amplificación, otro punto clave en la detección de virus entéricos en alimentos y otras matrices, es la elección de un control del proceso de extracción del RNA viral.

Desde un punto de vista puramente estructural, las partículas virales con simetría T=3 de aproximadamente 30 nm de diámetro parecen ser las más apropiadas, como los colifagos MS2 (familia *Leviviridae*), ampliamente utilizados como sustitutos o modelos de virus entéricos. Sin embargo, en el caso de MS2, además de que pueden estar presentes en la muestra diana (Chung *et al.*, 1998), la cubierta de la partícula a pesar de ser similar en tamaño a las de NoV y el HAV, no tiene similitud estructural a nivel proteico con los virus RNA icosaédricos eucariotas (Fauquet *et al.*, 2005). La mejor estrategia es por tanto utilizar un virus no patogénico de características similares a las de los virus problema, como otros miembros de las familias *Picornaviridae* y *Caliciviridae*. Actualmente, la cepa MC<sub>0</sub> de Mengovirus, serológicamente indistinguible del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) pero no patogénica para humanos u otros animales debido a que carece de la cola poli (C) de la 5'NCR, está siendo empleada como control del proceso de extracción de ácido nucleico de virus entéricos en alimentos (Costafreda *et al.*, 2006; Osorio *et al.*, 1996). Entre los miembros de la familia *Caliciviridae*, FCV y en particular, MNV constituyen los mejores modelos para el NoV humano (Cannon *et al.*, 2006; Wobus *et al.*, 2004, 2006).

## 1.6. Productos de especial prioridad

La contaminación de alimentos por virus entéricos puede ocurrir en cualquier fase de la cadena de producción (cultivo, extracción, procesado, distribución o manipulación). La gran mayoría de las ETA de etiología viral se pueden agrupar en dos categorías en función del tipo de alimento involucrado y la fase en la que se produce la contaminación:

- Alimentos frescos mínimamente procesados, como los moluscos bivalvos, vegetales como frutas, verduras, hortalizas, cereales y el agua, típicamente contaminados en el medioambiente durante la producción primaria. El factor clave que influye en el riesgo de contaminación de un producto fresco es la calidad del agua (bien sea de bebida, de irrigación o cultivo como por ejemplo en el caso de moluscos bivalvos).
- Productos contaminados durante su procesado, preparación y/o manipulación a través de personas infectadas. El riesgo de contaminación está íntimamente relacionado con las condiciones de higiene de los trabajadores y manipuladores en contacto con el alimento. Se incluyen en este grupo alimentos que se suelen consumir fríos, crudos o poco cocinados (pan y productos de repostería, comida rápida, ensaladas, frutas, verduras, embutidos).

Actualmente, existen cinco combinaciones de virus de transmisión alimentaria y productos ampliamente reconocidas como de especial prioridad para el *Codex Alimentarius* (<http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/virus/en/>).

(i) *NoV y HAV en moluscos bivalvos*: La infección con NoV y HAV a través del consumo de moluscos bivalvos han sido ampliamente documentada en todo el mundo hasta llegar a convertirse en uno de los productos con un riesgo más alto de transmisión de virus entéricos (Lees, 2000).

(ii) *NoV y HAV en productos frescos*: La presencia de NoV y HAV en productos frescos como verduras, frutas y hortalizas y su relación con grandes brotes internacionales está también bien documentada (Le Guyader *et al*, 2004;

Wheeler *et al.*, 2005). La principal fuente de contaminación se cree que está relacionada con la contaminación del agua utilizada para su irrigación.

(iii) *NoV y HAV en alimentos preparados*: La principal vía de contaminación en este tipo de alimentos es mediante la contaminación a partir de individuos infectados implicados en la manipulación del alimento y sin unas correctas práctica higiénicas (de Wit *et al.*, 2003).

(iv) *RV en el agua utilizada para la preparación de alimentos*: Los RV del grupo A son la causa más frecuente de hospitalización por enfermedad diarreica y muertes en niños, sobre todo en los países no industrializados. La utilización de la leche en polvo reconstituida con agua contaminada, parece una fuente probable aunque las evidencias son difíciles de obtener (Duffy *et al.*, 1986).

(v) *Virus emergentes en productos básicos seleccionados*: Los brotes de virus de reciente aparición asociados a alimentos suelen ser escasos pero tienen un impacto potencialmente muy alto. Los ejemplos del SARS y la gripe aviar así como la transmisión alimentaria relativamente incontrolada de otros virus menos peligrosos, ponen de manifiesto la dificultad de manejo de dichos eventos, sobre todo con patógenos con una eficiente capacidad de transmisión a través de los alimentos. En estos casos, la vigilancia sistemática de las ETA y el rápido intercambio internacional de datos, puede ayudar en la identificación temprana de este tipo de brotes.

## **1.7. Virus entéricos en moluscos bivalvos**

### **1.7.1. Los moluscos bivalvos como vectores de transmisión de virus entéricos**

Los moluscos (Mollusca, del latín *molluscum* "blando") bivalvos (Bivalvia, bi = dos; valvia = valva o placa) o lamelibranquios, son animales con simetría bilateral, cuerpo blando comprimido lateralmente y protegido por dos piezas o valvas. Son animales de tipo infaunal o epifaunal, en su mayoría

estáticos (a excepción de Pectínidos, como la vieira), que se alimentan mediante filtración.

Los moluscos bivalvos han sido una fuente importante de alimento desde tiempos prehistóricos. Desde hace décadas, la creciente demanda de moluscos a nivel mundial como proteína de consumo ha llevado a un importante desarrollo de este sector productivo dentro del campo de la acuicultura. Galicia cuenta con más de 1,660 kilómetros de costa, incluyendo las islas del litoral, con una topografía especial, caracterizada por la presencia de rías. Estas rías tienen una alta productividad primaria y están especialmente adaptadas a la producción de moluscos bivalvos. España es, con diferencia, el mayor productor de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) de Europa y el segundo del mundo (con una producción anual de alrededor de 300.000 toneladas) (FAO, 2010), y Galicia representa el 95% de la producción total española. Por otra parte, la explotación de otras especies como almejas (*Venerupis pullastra*, *V. discussatus*, *V. philippinarum*), berberechos (*Cerastoderma edule*), ostras (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*), vieiras (*Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*) y navajas (*Ensis* spp. y *Solen* spp.) a partir de bancos naturales, son también muy importantes.

Especies como las ostras, mejillones y almejas pueden sobrevivir durante períodos relativamente largos fuera del agua y son históricamente objeto de comercio en fresco. Otras especies, como berberechos y vieiras son menos resistentes y normalmente comercializados como producto refrigerado o procesado.

La naturaleza filtradora de los bivalvos los convierten en vehículos de concentración, acumulación, transmisión y diseminación de una gran cantidad de microorganismos presentes en sus aguas de cultivo, entre ellos diferentes patógenos humanos de tipo bacteriano, vírico o protozoario. A pesar de que algunas enfermedades son consecuencia de la presencia natural de algunos patógenos marinos (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*), la mayoría tienen su origen en la contaminación de sus aguas de cultivo con aguas fecales (Lees, 2000) (Tabla 3).

Los moluscos bivalvos pueden acumular estos patógenos en concentraciones mucho más altas que las de sus aguas de cultivo (Bosch, 1998; Lees, 2000). Los peligros que plantea la bioacumulación de microorganismos patógenos se ven agravados por el consumo tradicional de este tipo de producto, crudo o ligeramente cocinado e incluyendo sus tejidos digestivos, principal órgano de acumulación de la contaminación. Estas circunstancias son en gran medida únicas y representan un caso especial entre los peligros microbianos asociados con los alimentos. Actualmente, los problemas para la salud humana asociados con el consumo de moluscos bivalvos están reconocidos a nivel internacional y las evidencias epidemiológicas señalan a los virus entéricos como los principales agentes etiológicos transmitidos por los moluscos bivalvos (Polo et al., 2010; Westrel *et al.*, 2010).

Entre los bivalvos, las ostras dominan como principal molusco vector de enfermedades, seguido de almejas, mejillones y berberechos (Bellou *et al.*, 2013; Jaykus *et al.*, 1994). Otras especies como las vieiras, que viven en aguas más alejadas de la costa y menos contaminadas, y son generalmente evisceradas y mejor cocinadas, no presentan el mismo riesgo de infección, a pesar de estar asociadas con otros incidentes de salud en relación con su contaminación por biotoxinas y bacterias marinas. Otras especies de bivalvos como las navajas no se asocian comúnmente con brotes virales, posiblemente debido a que en la actualidad tan solo ocupan una parte pequeña y especializada del mercado de este tipo de productos y porque durante su preparación se alcanzan temperaturas más elevadas.

El patógeno más común de estas infecciones es NoV (83,7 %), seguido de HAV (12,8 %). La hepatitis A es la infección viral más seria relacionada con el consumo de bivalvos, causando ocasionalmente incluso la muerte. La mayoría de los brotes de NoV asociados al consumo de bivalvos ocurrieron en el Este asiático (72,7 %), seguido de Europa, Oceanía, y América, mientras que los brotes causados por HAV fueron principalmente documentados en Europa (83 %) (Bellou *et al.*, 2013). Periódicamente se documentan también brotes

causados por HEV, RV, AsV, aichi virus (AiV) o sapovirus (SaV), pero en tasas mucho más bajas.

Tabla 3: Diferentes brotes asociados al consumo de moluscos bivalvos

Molusco	País	Categoría <sup>a</sup>	Casos	Fuente <sup>b</sup>	Análisis de heces	Análisis de molusco	Referencia
Ostra	Japón	--	--	5	NoV GI	NoV GI, GII	Sugieda et al., 1996
Ostra	Dinamarca	A	356	3	NoV, EV	NoV, EV	Christensen et al., 1998
Ostra	Francia	A	14	7	NoV GI	NoV GI,	Le Guyader et al., 2003
Ostra	EEUU	A,B	171	7	NoV	NoV	Shieh et al., 2000
Ostra	EEUU	A	132	4	NoV GI, GII	NoV GI	Kohn et al., 1995
Ostra	Singapur	B	305	1	NoV GII	NoV GII	Ng, et al., 2004
Ostra	Francia	B*	127	6	NoV GI, GII	NoV GI, GII	Le Guyader et al., 2006a
Ostra	Italia	--	202	6	NoV GI, GII	--	Le Guyader et al., 2006a
Ostra	Australia	--	83	3	NoV GI, GII	NoV GII	Webby et al. 2007
Ostra	N. Zelanda	C	115	3	NoV GI, GII	NoV GI, GII	Simmons et al. 2007
Ostra	Canadá	A	135	1	NoV GI, GII	NoV GI	David et al. 2007
Ostra	Suecia	A	30	2	NoV GI	NoV GI, GII	Nenonen et al. 2009
Ostra	Francia	A	205	6	AiV, AV, EV, RV, NoV GI, GII	AiV, AV, RV, NoV GI, GII	Le Guyader et al. 2008
Ostra	Francia	A	34	5	NoV GII, SaV, AiV	NoV GI, GII, SaV	Le Guyader et al. 2010
Mejillón	Italia	--	103	7	NoV	NoV GI, GII	Prato et al., 2004
Almeja	EEUU	B**	5	3	NoV	NoV GII, HAV	Kingsley et al., 2002b
Ostra	EEUU	A	61	5	HAV	HAV	Desenclos et al., 1991
Ostra	EEUU	A	39	4, 5	HAV	HAV	Sheih et al., 2007
Mejillón	Italia	--	562	1, 2	HAV	--	Lopalco et al., 1997
Mejillón	Italia	diverso	882	1, 2	HAV	HAV	Pontrelli et al., 2008
Almeja	China	A	638	1	HAV	HAV	Halliday et al., 1991
Almeja	España	--	184	3	HAV	HAV	Sanchez et al., 2002
Almeja	España	--	100	3	HAV	HAV	Costafreda et al., 2006

<sup>a</sup>, Categorías basadas en recuento de *E. coli* según la legislación oficial de la UE y EEUU; <sup>b</sup>Fuente: 1, Área de cultivo contaminada o probablemente contaminada; 2, Almacenamiento ilegal o inadecuado; 3, producto importado en fresco o congelado; 4, descarga de aguas residuales desde embarcación; 5, cultivo o recolección en área prohibida, vedada o no clasificada; 6, fallo en EDAR; 7, sin explicación. \*, Depuración especificada; \*\*, Basado en recuento de *E. coli* en la muestra analizada; --, no analizado /detectado.

Hay que tener en cuenta que la falta de sistemas de vigilancia de brotes de etiología viral asociados al consumo de bivalvos y documentación de casos de gastroenteritis afecta a estas estimaciones, infraestimando la incidencia real de estas enfermedades. La mayoría de la literatura científica está dominada por los países industrializados con una mayor capacidad académica y de vigilancia. Un

claro ejemplo es que a pesar de que los moluscos bivalvos se consumen en países de todo el mundo, existe una ausencia prácticamente total de documentación en África. Además, la asociación epidemiológica de un brote a un producto en particular es más difícil para algunos virus, como HAV, debido a sus largos tiempos de incubación (Bellou *et al.*, 2013).

### **1.7.2. Modos de contaminación**

Las zonas costeras son las zonas de interacción entre el medio terrestre y el medio acuático. La presencia de microorganismos entéricos en el medio marino, principalmente en bahías y estuarios, viene determinada por una amplia gama de fenómenos complejos basados en interacciones físicas, bioquímicas y biológicas que dificultan la comprensión y el control de las fuentes de contaminación. La presencia de contaminación fecal en el medio ambiente es el resultado de un flujo de mezcla, acumulación y persistencia en las aguas y sedimentos (Pommepuy *et al.*, 2005). Las actividades y los parámetros dependientes de la zona de interacción “tierra-agua dulce”, determinan la intensidad del flujo microbiano y el tipo de microorganismo que es descargado al medio. Los parámetros dependientes de la zona de interacción “agua dulce-agua salada”, como la hidrografía, marea, procesos de mezcla, dispersión, estratificación hialina y sedimentación, influyen en la distribución y disponibilidad de la contaminación (Pommepuy *et al.*, 2005).

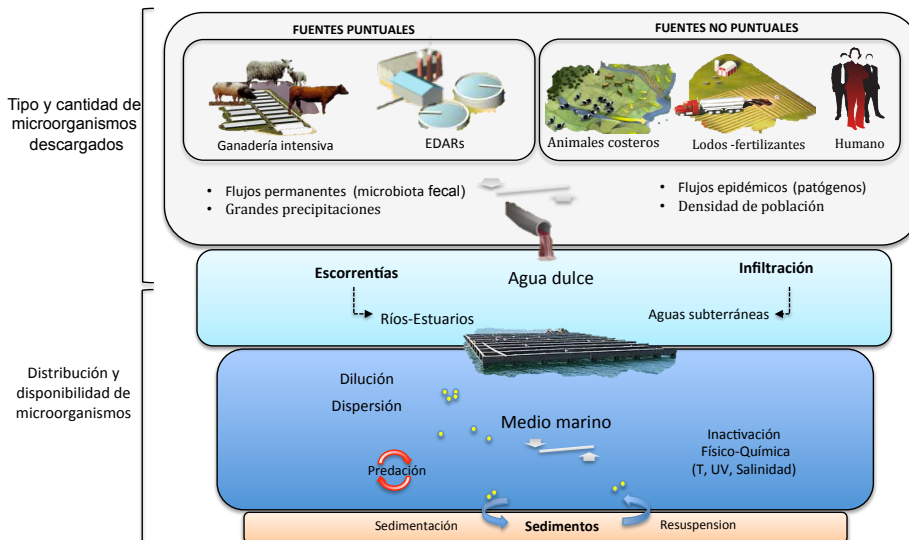
Los virus entéricos humanos entran en el medio ambiente a través de la descarga de aguas residuales contaminadas. Se eliminan en un número extremadamente alto ( $10^5$ - $10^{11}$  partículas virales/g de heces) en las heces de individuos afectados de gastroenteritis o hepatitis (Farthing, 1989). En consecuencia, se encuentran en grandes cantidades en las aguas residuales, aunque su concentración puede variar en función de factores como la zona geográfica, la estación del año y/o el estatus socioeconómico y sanitario (Haramoto *et al.*, 2006; Okoh *et al.*, 2010). Los virus y las bacterias difieren ampliamente en términos de transmisión, resistencia a los procesos de desinfección y persistencia en el medio ambiente.

Se ha comprobado que los tratamientos actuales a los que se someten las aguas residuales no garantizan la total eliminación de los patógenos virales, por lo que estos son descargados continuamente al medio. De hecho, son frecuentemente detectados en efluentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) y en ríos y aguas circundantes a las plantas de tratamiento (da Silva *et al.*, 2007; Iwai *et al.*, 2009; Maalouf *et al.*, 2010). Además, los indicadores bacterianos en los que se basa la actual legislación se consideran una herramienta obsoleta e insuficiente para controlar la calidad del agua residual desde un punto de vista virológico (Fong y Lipp, 2005; Maunula *et al.*, 2007).

La contaminación del medio acuático se produce como consecuencia de aumentos en la urbanización costera, principalmente alrededor de las zonas de producción, fugas y derrames en las EDAR consecuencia de fallos por exceso en su capacidad de almacenamiento o debido a temporales y fuertes lluvias (Le Guyader *et al.*, 2006a, Le Guyader y Atmar, 2008; Morse *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1979). La presencia de granjas o animales en las zonas costeras (Zakhour *et al.*, 2010) o actividades asociadas como la aplicación de purines, estiércol, lodos de depuradora y residuos de fosas sépticas en los pastos como abono de tierras de cultivo son también comunes. Estos llegan al agua por infiltración o lixiviación (Crowther *et al.*, 2002; Maalouf *et al.*, 2010) (Figura 12).

La infiltración, lixiviación y los ríos, representan las principales vías de entrada de la contaminación viral al mar. Una vez que los virus entéricos entran en los depósitos y fuentes de agua dulce, su aparición y permanencia en las aguas costeras dependerá del equilibrio entre su resistencia a la inactivación y una amplia gama de factores y procesos ambientales de degradación y distribución. Estos mecanismos de eliminación y distribución son complejos y difíciles de dilucidar. Las corrientes marinas, la morfología del estuario, su estratificación hialina, las mareas, las tormentas y las condiciones oceanográficas en general influyen en la distribución, dilución y/o procesos de sedimentación viral. Procesos como la dilución física, la dispersión, la sedimentación, adsorción, la destrucción enzimática y/o la depredación por

bacterias y protozoos pueden disminuir la contaminación fecal en las zonas costeras (Pommepuy *et al.*, 2005).



**Figura 12: Origen y fuentes de transmisión de los virus entéricos hasta el medio marino**

Sin embargo, a diferencia de otros microorganismos, los virus pueden permanecer estables en el medio ambiente durante largos periodos especialmente asociados a los sedimentos, que evitan su foto-inactivación. Esta unión del virus a diferentes coloides depende de sus propiedades intrínsecas (tamaño, carga eléctrica). Una vez asociados, los virus se establecen en los lechos poco profundos del estuario y persisten en un estado infeccioso durante varios meses, protegidos por los sedimentos marinos. Estos sedimentos actúan en muchos casos como un depósito desde el cual los virus pueden ser resuspendidos, por ejemplo durante fuertes tormentas. Las condiciones físico-químicas específicas de la zona y el agua marina (radiación solar, salinidad, temperatura, pH), influyen también en la degradación viral (Bosch, 1998; Chung y Sobsey, 1993; da Silva *et al.*, 2008) (Figura 12).

Existen además otras fuentes de contaminación entérica en las zonas costeras, como la eliminación de heces de personas infectadas desde buques o barcos, o directamente en las zonas de producción sobre el lecho de los moluscos (Dowell *et al.*, 1995; Gerba, 2000; Kohn *et al.*, 1995). Las acciones ilegales como la recolección de zonas no autorizadas pueden desempeñar un papel importante en la aparición de brotes (Desenclos *et al.*, 1991; Le Guyader *et al.*, 2010). Al igual que otros productos frescos, la contaminación también puede ocurrir durante el procesamiento, el almacenamiento, la distribución y la preparación final, ya sea directamente a partir de los manipuladores (debido a una mala higiene personal) o por contacto con un ambiente contaminado (Caul, 1994; Cliver, 1994). La contaminación puede provenir también de la utilización de hielo o agua contaminada durante su almacenamiento, por enjuague del producto, el pelado con las manos contaminadas, guantes o cuchillos de desconchado, mesas y/o recipientes de almacenamiento (Beller, 1992; Khan *et al.*, 1994). Algunas prácticas de los distribuidores como devolver, después de su recolección, tras su almacenaje, los bivalvos al mar durante un período corto tiempo para que puedan alimentarse puede dar lugar a la contaminación del producto si el agua de mar está contaminada. A pesar de que esta no es una práctica aprobada ni en EEUU ni en la UE, se produce habitualmente (Richards *et al.*, 2010).

### **1.7.3. Captación, acumulación y persistencia viral**

La naturaleza filtradora de los moluscos bivalvos está íntimamente relacionada con su capacidad de acumulación y concentración viral. Durante este proceso filtran grandes cantidades de agua de mar, obteniendo su alimento de forma selectiva, a partir de pequeñas partículas de materia orgánica. Este proceso depende del atrapamiento de las partículas potencialmente alimenticias en un mucus secretado de forma continua al mismo tiempo que bombean agua a través de las branquias. La composición química de este mucus es esencialmente similar en todas las especies de bivalvos (Di Girolamo *et al.*,

1977). Una vez atrapadas, las partículas entran en la boca hacia el esófago por medio de unos palpos.

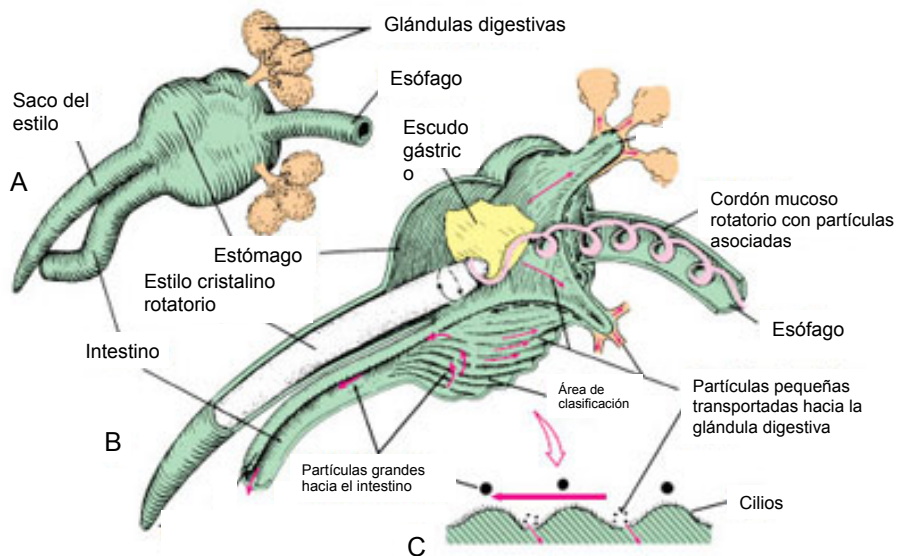
La digestión se lleva a cabo en dos fases: una extracelular en el estómago y otra intracelular en los divertículos digestivos. El órgano principal de la digestión extracelular es el estilo cristalino. A medida que gira va liberando enzimas que inician el proceso de digestión del alimento retenido en el mucus. Las partículas de comida son seleccionadas o reordenadas de nuevo en el estómago, por acción de los cilios de las células epiteliales, de acuerdo con su tamaño, densidad y digestibilidad, y son, o bien rechazadas en el intestino medio y expulsadas como pseudoheces o recirculadas hacia los divertículos digestivos para una mayor degradación.

Las partículas recirculadas se someten a una degradación mecánica y química, y los productos de este proceso entran en la glándula digestiva donde tiene lugar la digestión intracelular. Los nutrientes son transportados a la hemolinfa, amebocitos, y el tejido conectivo periglandular.

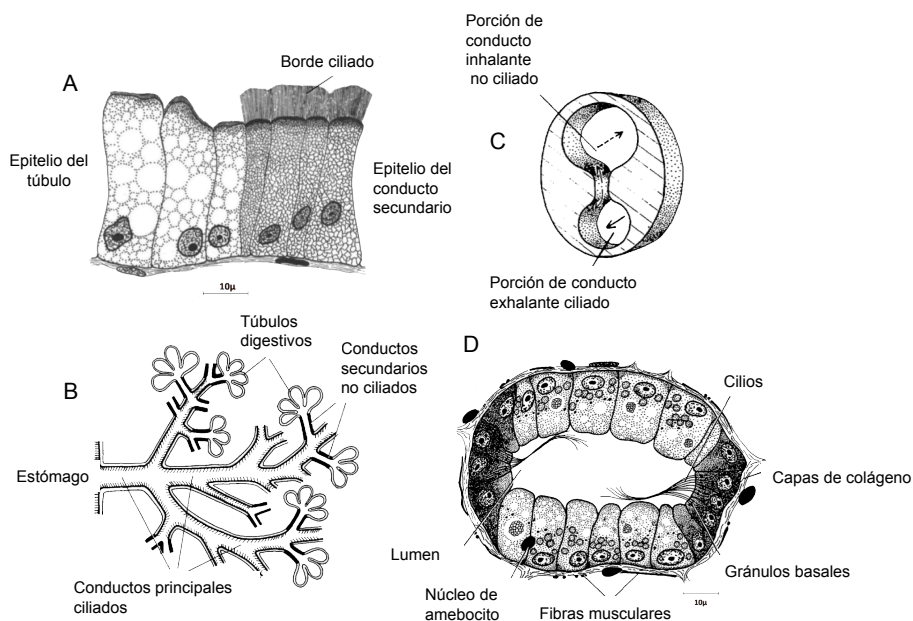
El material no digerido se acumula dentro de las células digestivas, que rompen su polo apical y liberan el contenido de cuerpos residuales y lisosomas a través del intestino, donde se lleva a cabo la re-absorción de algunos nutrientes. El material de desecho se consolida en el intestino y el recto y es expulsado a través del ano en la corriente exhalante (Gosling, 2003). A pesar de no ser parte de la dieta de los bivalvos, los virus entéricos, cuando están presentes en sus aguas de producción, son también atrapados en el mucus, ingeridos y bioacumulados por los bivalvos. Sin embargo, los mecanismos exactos de captación, acumulación y persistencia viral en los moluscos bivalvos permanecen aun en gran medida por esclarecer.

La captación viral se produce, en un primer paso, por adsorción de las partículas virales a la mucosidad existente en las branquias, principalmente por atrapamiento mecánico y unión iónica. Se ha sugerido que esta unión iónica de los virus al mucus se produce a través de los radicales sulfato de los polisacáridos existentes en los compuestos mucoides. También se ha sugerido que la salinidad del mucus, el pH y/o propiedades de la superficie viral podrían

influir en dicha adsorción y en el tipo de virus adsorbido (Bedford *et al.*, 1978; Di Girolamo *et al.*, 1977). A partir de ahí, los virus contenidos en el mucus siguen la misma ruta que los alimentos. Parte son eliminados en las pseudoheces asociadas a materia orgánica y productos de desecho y otra parte entra en los divertículos digestivos.



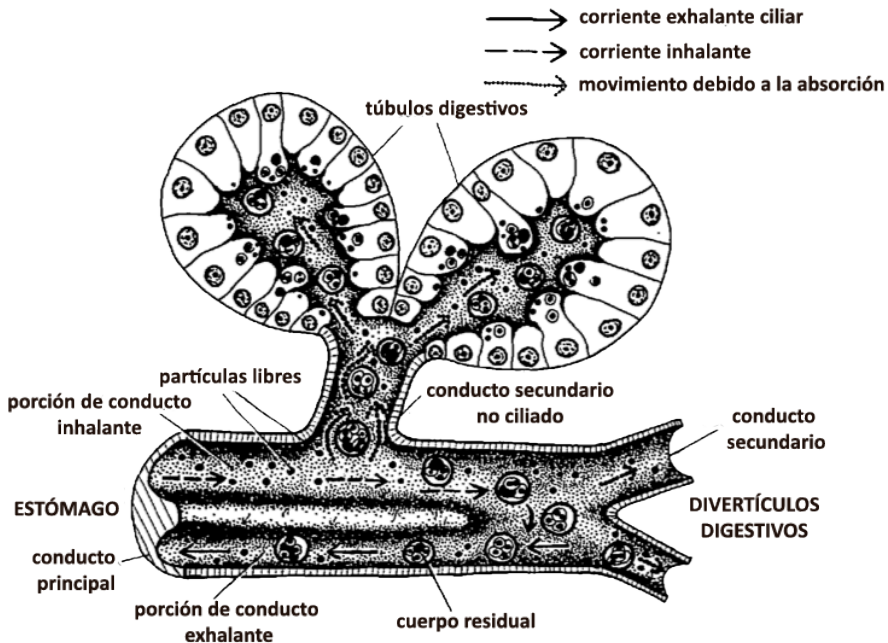
**Figura 13: Representación de la circulación del material dentro del estómago y estilo cristalino de la mayoría de lamelibranquios. (A) Vista externa del estómago y el saco del estilo. (B) Corte transversal que muestra la dirección y los movimientos del alimento. Las partículas de comida en el agua entrante son atrapadas en un cordón mucoso que se mantiene en rotación gracias al estilo cristalino. En el área de clasificación se dirigen las partículas grandes hacia el intestino y las pequeñas partículas de alimentos hacia las glándulas digestivas. (C) Acción de clasificación de los cilios (Modificado de Pechenik, 1991).**



**Figura 14:** (A) Sección que muestra la unión claramente definida entre el epitelio de un conducto secundario y el de un túbulo digestivo en *Mytilus edulis*. (B) Sistemas de conductos de los divertículos digestivos. (C) Representación de un conducto principal de los divertículos digestivos. (D) Sección transversal de un túbulo de los divertículos digestivos de *Venerupis pullastra* mostrando la disposición de los cilios (Modificado de Owen, 1955).

La glándula digestiva o hepatopáncreas es el lugar principal de bioacumulación de los virus entéricos y el órgano diana utilizado ya comúnmente para la detección de estos patógenos (Di Girolamo *et al.*, 1977; Romalde *et al.*, 1994). Una vez en los divertículos digestivos, algunos virus son eliminados a través de las heces, una vez finalizado el proceso digestivo. Sin embargo, se ha observado que parte de la carga viral es transportada a través de las paredes del tracto digestivo hacia zonas interiores. Se han detectado HAV y NoV en células basales del epitelio digestivo, en el lumen del tracto digestivo, en el interior de las células gastrointestinales (CG) y en hemocitos, tanto en el epitelio digestivo como en el tejido conectivo (Le Guyader *et al.*, 2006b;

McLeod *et al.*, 2009a; Provost *et al.*, 2011; Romalde *et al.*, 1994). La internalización de las partículas virales intactas en las CG, en los hemocitos o el tejido conectivo podría proporcionar una explicación para la baja eficiencia de los procesos de depuración de moluscos para la eliminación de ciertos virus como HAV y NoV.



**Figura 15:** Representación de la circulación de fluidos y partículas dentro de los divertículos digestivos de la almeja (Modificado de Owen, 1955).

Además, se ha descubierto recientemente la existencia de unos antígenos presentes en las CG de ostras, almejas y mejillones muy similares al HBGA humanos, y se ha demostrado la unión específica de NoV a las CG del tracto digestivo de los moluscos a través de estos antígenos (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006, 2007). Concretamente, se ha observado que las partículas virales de NoV se unen específicamente a los conductos digestivos (intestino medio, conductos principales y secundarios y túbulos digestivos) de

ostra (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006), almeja y mejillón (Tian *et al.*, 2007) a través de una estructura de tipo carbohidrato con un residuo terminal N-acetilgalactosamina mediante un enlace tipo- $\alpha$ . Este tipo de residuo equivaldría al HBGA del tipo-A.

Como se ha explicado anteriormente las cepas pertenecientes al genogrupo GI y GII de NoV presentan diferentes patrones de unión con las diferentes estructuras de carbohidratos de la familia del HBGAs. A pesar de que existe una gran variedad de perfiles de unión, en este caso las cepas pertenecientes a GI se verían más favorecidas para su unión a los conductos digestivos de estos moluscos. Esto sugiere una posible co-evolución entre NoV (principalmente cepas pertenecientes a GI), su hospedador y los moluscos bivalvos como vector de transmisión (Le Guyader *et al.*, 2006b).

Esto, además de proporcionar a ciertos virus un mecanismo para evitar entrar en el sistema digestivo y ser degradados, favorecería la bioacumulación y concentración selectiva de ciertos virus como el virus Norwalk sobre otros incapaces de unirse específicamente a estos tejidos y por lo tanto no transmisibles mediante este hospedador intermediario (Maalouf *et al.*, 2011; Nappier *et al.*, 2008). Se ha demostrado por ejemplo que NoV GI requiere 30 copias de RNA viral/L de agua para conseguir una bioacumulación de 1 copia de RNA/g de tejido de ostra, mientras que para NoV GII se necesitaron ~1200 copias de RNA viral/L de agua para una acumulación de 1 copia de RNA/g de tejido de ostra (Le Guyader *et al.*, 2012; Maalouf *et al.*, 2011).

De hecho, y como ya se ha mencionado, los datos epidemiológicos muestran una predominancia de las cepas de GI en los brotes de gastroenteritis asociados al consumo de moluscos, mientras que las de GII predominan en transmisiones alimentarias mas relacionadas con la infección durante la manipulación o por contacto persona-persona (Le Guyader *et al.*, 2012; Maalouf *et al.*, 2011; Verhoef *et al.*, 2010). Otros genogrupos de NoV, como el GIII bovino, presentes en aguas costeras en altas concentraciones no son bioacumulados de manera eficiente, probablemente debido a la falta del ligandos específicos en los moluscos (Zakhour *et al.*, 2009, 2010).

Existen además otros factores que podrían influir en la mayor o menor presencia viral en bivalvos pero cuya implicación continúa sin estar clara, como por ejemplo la existencia de un número limitado de sitios para la adsorción viral, tanto en el mucus como en los tejidos digestivos (Bedford *et al.*, 1978), la influencia del ciclo gametogénico y el desarrollo gonadal, o el contenido en glucógeno (Burkhardt y Calci, 2000), que a su vez podría influir en ciertos patrones de estacionalidad de brotes por NoV. La gónada y la masa visceral son los principales sitios de acumulación de glucógeno (Ojea *et al.*, 2002), y el nivel de la producción de mucus por lo general se relaciona con el contenido de glucógeno en el tejido conectivo y el desarrollo gonadal (Galtsoff, 1964). Incluso se ha sugerido que la expresión estacional de estos ligandos podría conducir a diferentes eficiencias de bioacumulación de ciertas cepas de NoV a lo largo del año (Maalouf *et al.*, 2010).

#### **1.7.4. Métodos de control y eliminación**

La mayoría de los países desarrollados han adoptado una serie de controles sanitarios sobre la producción de moluscos bivalvos. Su principal característica es el uso de los indicadores bacterianos de contaminación fecal, cuyos niveles determinan el tratamiento apropiado al que se someterá el producto. Estos indicadores fecales son cuantificados bien en los propios moluscos (UE) o en sus aguas de producción (EEUU) (Lees *et al.*, 2010). La medida más eficaz para evitar la contaminación de los moluscos bivalvos es su cultivo en áreas con una buena calidad microbiológica, sin embargo, el procesamiento posterior del producto proporciona una opción práctica para los casos en los que exista dicha contaminación. Las estrategias para prevenir, controlar y reducir la contaminación microbiana en los bivalvos pueden agruparse en: medidas previas a su recolección (es decir, el control de sus zonas de producción) y estrategias posteriores a su recolección.

#### *1.7.4.1. Estrategias de control previas a la recolección*

Estas estrategias están enfocadas a obtener una mejora en la calidad de las aguas de cultivo y la prevención de vertidos de aguas residuales, principal vía de contaminación de los bivalvos. Identificar las fuentes de contaminación y los factores y condiciones responsables del riesgo de contaminación viral en un lugar específico, así como la adopción de medidas de carácter temporal como el cierre de determinadas zonas de producción son cruciales para reducir los riesgos.

En este sentido, el modelado microbiano en ambientes costeros y los sistemas de alerta temprana (SAT) pueden ser herramientas útiles para limitar o prevenir dicha contaminación (Pommepuy *et al.*, 2005).

Los sistemas de modelado microbiano se clasifican en dos categorías principales: los modelos estadísticos y los modelos dinámicos basados en procesos. Los modelos estadísticos se basan en una modelización lineal o análisis de regresión logística entre los parámetros medioambientales y la contaminación fecal, prediciendo la contaminación microbiana que resulta de aportes de aguas residuales o de fuentes no puntuales en una zona determinada, de acuerdo con las condiciones ambientales (Gourmelon *et al.*, 2010). Otro tipo de modelo estadístico son las Redes Neuronales Artificiales (ANN, del inglés *Artificial Neural Networks*). Las redes neuronales son una alternativa eficaz a las técnicas más tradicionales de análisis estadístico cuando se trata de hacer aproximaciones hacia funciones no lineales.

Estos modelos estadísticos tienen ciertas limitaciones debido a que no tienen en cuenta el tipo de entrada de la contaminación, el transporte, la tasa de descomposición microbiana o distribución espacial y temporal.

Los modelos dinámicos basados en procesos se desarrollaron en parte para superar las limitaciones anteriores (Brion *et al.*, 2005). Estos modelos se basan en el desarrollo a su vez de diferentes submodelos: (i) un modelo hidrodinámico que proporciona los coeficientes de mezcla y distribución de la contaminación, (ii) un modelo de dispersión que integra el transporte y la

difusión de las bacterias/virus, y (iii) un modelo biológico de descomposición microbiana dependiente de las condiciones ambientales (luz, temperatura y asociación a los sedimentos) (Gourmelon *et al.*, 2010).

Con respecto a los SAT, su objetivo principal es obtener datos en tiempo real y en puntos clave, cerca de las zonas de producción, de ciertos parámetros como las precipitaciones, variaciones de salinidad, red de alcantarillado, actividades agrícolas, condiciones climáticas en la cuenca, brotes de enfermedades virales en la población local, procesos de mezcla y transporte dominantes. La información se recopila en una base de datos y es enviada de manera inmediata a un ordenador, que sintetiza la información y da la alarma si los parámetros exceden unos valores predefinidos. Sus funciones serían la gestión del riesgo, notificación de eventos, cierre de zonas de producción, cálculo del tiempo de cierre y fecha de re-apertura (Le Saux *et al.*, 2006;. Gourmelon *et al.*, 2010).

El control de la entrada de contaminación fecal en las propias zonas de producción, sería el enfoque más eficaz contra la presencia de virus entéricos en los moluscos. Sin embargo, la creciente urbanización costera y el elevado coste de inversión para la implementación de EDAR, especialmente cuando el cultivo de bivalvos es muy disperso o el coste no guarda proporción con el valor del producto, hace difícil evitar esta contaminación. Por el contrario, otras vías de entrada de contaminación fecal son más fáciles de evitar, como las descargas de aguas residuales desde las embarcaciones, mediante la adopción de sencillas medidas como una mayor concienciación de los trabajadores, la instalación de contenedores para los desperdicios en los muelles o la adopción de sanciones por su incumplimiento.

Aunque las normas actuales aplicables a los moluscos bivalvos son eficaces contra la transmisión de enfermedades bacterianas, su cumplimiento no garantiza la ausencia de virus entéricos en el producto final (Romalde *et al.*, 2002). Los sistema de clasificación de las zonas de producción determinan si la zona se puede utilizar o no para la producción y el nivel de tratamiento

(depuración, reinstalación, tratamiento térmico) que debe ser aplicado a los bivalvos cosechados antes de su comercialización.

Hay dos sistemas principales en uso en el mundo. Uno de ellos es el de la UE (Regulación EC No 854/2004) y el otro es el de EEUU (Programa Nacional de Saneamiento de Moluscos bivalvos, NSSP). Tanto la legislación de la UE como la de EEUU utilizan métodos de clasificación basados en concentraciones de indicadores bacterianos establecidos para cada nivel de contaminación o categoría. Sin embargo, en la UE los indicadores fecales se miden en la carne de los moluscos mientras que en los EEUU los indicadores se miden en las aguas de cada zona de producción (Tablas 4 y 5).

Tabla 4: Criterios de la UE para la clasificación de las zonas de cultivo de moluscos bivalvos.

Clase <sup>1</sup>	Criterio microbiológico <sup>2</sup>	Tratamiento post-recolección requerido
<b>A</b>	Los moluscos bivalvos vivos de estas áreas no deben exceder 230 (NMP*) <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intravalvar <sup>3</sup> .	Ninguno
<b>B</b>	Los moluscos bivalvos vivos de estas áreas no deben exceder, en un 90% de las muestras, 4.600 <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intravalvar. En el 10% restante de las muestras, los moluscos bivalvos vivos o deben exceder los 46.000 <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intravalvar <sup>4</sup> .	Depuración, reinstalación o procesado por un método aprobado
<b>C</b>	Los moluscos bivalvos vivos de estas áreas no deben exceder los límites de 46.000 <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intravalvar de un ensayo de 5 tubos, tres diluciones NMP <sup>5</sup> .	Reinstalación o procesado por un método aprobado

\*(NMP) número más probable. <sup>1</sup> La autoridad competente tiene la potestad para prohibir cualquier producción o recogida de moluscos bivalvos en áreas consideradas no adecuadas por razones de salud. <sup>2</sup> El método de referencia viene dado por la ISO 16649-3. <sup>3</sup> Por referencia cruzada a partir de la Regulación (EC) N° 854/2004, vía Regulación (EC) N° 853/2004, y Regulación (EC) No 2073/2005. <sup>4</sup> Regulación (EC) N° 1021/2008. <sup>5</sup> Regulación (EC) N° 854/2004.

Table 5: Criterios NSSP para la clasificación de las áreas de cultivo de moluscos bivalvos.

Clasificación	Coliformes totales/100 mL agua		Coliformes fecales/100 mL agua		Tratamiento requerido
	Media geométrica	90% confianza <sup>1</sup>	Media geométrica	90% confianza <sup>1</sup>	
Área autorizada <sup>2</sup>	≤70	≤230	≤14	≤43	Ninguno
Área restringida <sup>3</sup>	≤700	≤2300	≤88	≤260	Depuración o reinstalación en un área autorizada
Área prohibida	Sin estudio sanitario o incumplimiento de las condiciones para zonas autorizadas o restringidas <sup>4</sup>				Recolección no permitida

<sup>1</sup> Valores para el ensayo de 5 tubos dilución decimal. Los valores son diferentes al 90% de confianza para los ensayos de 3-tubos NMP y filtración en membrana mTEC. <sup>2</sup> La determinación del estado del área aprobada debe estar basada en un mínimo de 15 muestras para cada estación de muestreo. <sup>3</sup> Las áreas pueden ser restringidas condicionalmente cuando éstas están sujetas a eventos de contaminación predecibles: estas zonas permanecen cerradas durante el evento de contaminación y un período posterior que permita su limpieza natural. <sup>4</sup> Se pueden utilizar otras consideraciones distintas a la concentración de contaminantes para declarar una zona prohibida.

En otros países como Nueva Zelanda y Canadá, se han adoptado sistemas híbridos como enfoque práctico para el comercio con Europa o Estados Unidos. Estos programas consisten esencialmente el seguimiento de la contaminación tanto en el agua de mar como en los tejidos del molusco. El control del agua puede establecer la clasificación basal para una zona de producción, sin embargo tras un evento de contaminación la reapertura de las zonas de producción se basarían en un retorno de la concentración de los indicadores bacterianos en los tejidos a niveles predefinidos.

#### 1.7.4.2. Estrategias de control posteriores a la recolección

A pesar de que la reducción de la contaminación a través de procedimientos posteriores a la recolección es menos eficaz que la prevención de la contaminación en las zonas mismas de producción, estos procesos representan una opción práctica cuando las aguas están sujetas a cierto grado de contaminación. Aunque la contaminación viral puede ser debida a malas

prácticas higiénicas y de manipulación tras la recolección del producto, la mayoría de los brotes virales tienen un origen previo a la recolección. Como consecuencia los virus han sido bioacumulados e internalizados dentro de los tejidos. En estos casos, el producto no puede ser desinfectado por tratamientos superficiales como el lavado, radiación ultravioleta (UV) o desinfectantes químicos. Tradicionalmente, son tres los procesos aplicados comercialmente: la depuración, la reinstalación y el tratamiento térmico. Además de estos tratamientos utilizados de manera convencional, existen otros más novedosos como la HHP y la irradiación.

#### Depuración y reinstalación

Ambos métodos aprovechan la actividad natural de bombeo de los bivalvos para purgar los microorganismos patógenos presentes en su aparato digestivo mediante su actividad filtradora, reduciendo así la probabilidad de infección (Richards, 2001). Los procesos de reinstalación y depuración, a diferencia del tratamiento térmico o cocción, permiten la comercialización del producto vivo o en fresco y, a pesar de que la depuración es a menudo la opción preferida, ambas estrategias se practican ampliamente en todo el mundo (Lees *et al.*, 2010). Se ha aceptado que la depuración y los procesos de reinstalación son sólo medidas de control de eficacia parcial por lo que no se usan para corregir los efectos de la contaminación excesiva. Por esta razón, la UE y los EEUU establecen un límite de contaminación por encima del cual no se permiten ambos procesos y los moluscos deben ser sometidos a un procesamiento térmico.

La depuración se realiza en depósitos con un suministro de agua de mar limpia y desinfectada y bajo condiciones de funcionamiento específicas y favorables a los moluscos. Los sistemas de depuración también varían e incluyen procesos de circuito abierto (donde el agua de mar es recogida y eliminada de manera continua) y circuito cerrado (donde el agua se recicla a través de diferentes sistemas de esterilización y desinfección). Los métodos

más comunes de desinfección del agua son mediante cloración, luz UV, ozonización, y yodóforos (Lees, 2000; Richards, 2001) (Tabla 6).

Tabla 6: Comparación de los tres principales sistemas de desinfección de agua utilizados durante el proceso de depuración (Lee *et al.*, 2008).

<b>Operación/ condición</b>	<b>Luz ultravioleta</b>	<b>Cloro/ compuesto clorado</b>	<b>Ozono</b>
Costes de capital	Bajos	Medios	elevados
Costes operativos	Los más bajos	Bajos	elevados
Instalación	Simple	Compleja	Compleja
Facilidad de mantenimiento	Fácil	Moderada	Difícil
Costes de mantenimiento	Bajos	Medios	elevados
Funcionamiento	excelente	posible crecimiento	no fiable
Claridad de la fuente de agua	elevada	Baja	Media
efecto virucida	Bueno	Malo	Bueno
Riesgo para el personal	Medio (ojos, piel)	elevado	Medio (oxidante)
toxicidad química	no	Sí	Sí
efecto residual	no	Sí	Algo
efecto sobre el agua	ninguno	trialometanos	Subproductos tóxicos
problemas operativos	pocos	Medio	Muchos
tiempo de contacto (mm)	1–5 seg	30–60 mm	10–20 mm
efecto en los moluscos	ninguno	Irritante	Oxidante

Bajo condiciones fisiológicas correctas, los bivalvos excretan los contaminantes en sus heces, que se depositan en el fondo del tanque y son retiradas al final del ciclo.

El tiempo de depuración aplicado comercialmente es por lo general de 2-3 días (Lees *et al.*, 2010). El buen estado de los bivalvos y su correcto manejo, como evitar temperaturas extremas y golpes, buenas prácticas de cosecha, transporte, lavado, separación de individuos muertos etc., son aspectos cruciales para mantener una actividad normal de filtración y por lo tanto una correcta depuración.

Entre los factores que pueden influir en la actividad fisiológica de los bivalvos están: el oxígeno disuelto (se recomienda un mínimo del 50% de

saturación oxígeno disuelto), la cantidad de molusco en los tanques en relación al volumen de agua (que puede variar según la especie de molusco y el tipo de sistema, y afecta al oxígeno disuelto y la concentración de productos metabólicos), el flujo de agua, la salinidad, temperatura, turbidez (que reduce la eficacia de ciertos métodos de desinfección), o la perturbación de los bivalvos (que produce estrés y afecta a su actividad filtradora) (Lees *et al.*, 2010).

Desde su introducción, hace más de un siglo (Herdman y Scott, 1896), la depuración ha reducido significativamente las enfermedades de etiología bacteriana transmitidas por los bivalvos. Generalmente, las bacterias entéricas son reducidas rápida y eficazmente a niveles no detectables en los periodos de depuración aplicados comercialmente (Richards, 2001). Históricamente, el estudio de las ETA asociadas con el consumo de bivalvos se ha centrado principalmente en los patógenos bacterianos. Como resultado, el desarrollo de los controles sanitarios, y prácticas de depuración se han visto fuertemente influenciadas por este propósito y se basan aún a día de hoy en indicadores bacterianos (ver apartado 1.7.5).

El cumplimiento de estos parámetros bacterianos en el producto final suele ser visto como una evidencia de un diseño de los sistemas de depuración y prácticas operacionales satisfactorias. Se ha visto que la eliminación viral mediante depuración es mucho menos eficiente que la bacteriana, presumiblemente debido procesos explicados previamente como la unión específica de las partículas virales a ligandos específicos en el tejido digestivo de los moluscos o su internalización en hemocitos o tejido conectivo (Le Guyader *et al.*, 2006b; McLeod *et al.*, 2009a; Romalde *et al.*, 1994; Schwab *et al.*, 1998). Como consecuencia, los controles bacterianos no aseguran la completa eliminación viral (Dore y Lees, 1995; Jaykus *et al.*, 1994; Loisy *et al.*, 2005b; McLeod *et al.*, 2009b; Richards *et al.*, 2010; Schwab *et al.*, 1998; Romalde *et al.*, 2002; Ueki, 2007), hecho evidenciado por los brotes periódicos de enfermedades de etiología viral, principalmente gastroenteritis y hepatitis A, asociados con el consumo de bivalvos depurados que cumplían con todos los requisitos legales (Ang, 1998; Chalmers y McMillan, 1995; Conaty *et al.*,

2000; Grohmann *et al.*, 1981; Heller *et al.*, 1986; Le Guyader *et al.*, 2003, 2006a, 2008).

Por otro lado, la reinstalación es un proceso consistente en la transferencia de los moluscos desde las zonas de cultivo contaminadas a otras áreas marinas libres de contaminación. Es un proceso a largo plazo utilizado como una alternativa a la depuración ya que se pueden mantener durante períodos mucho más largos en el medio natural que en los tanques de depuración. Esto hace de la reinstalación un proceso adecuado para tratar los bivalvos con un grado de contaminación más elevado (Richards, 1988). Los principales inconvenientes de la reinstalación son la escasa disponibilidad de zonas costeras adecuadas y libres de contaminación, la obtención de derechos de uso de esas áreas, la dificultad de controlar la calidad y otros parámetros de sus aguas, su vulnerabilidad ante la pesca furtiva, el menor rendimiento comercial del producto debido al aumento de los costes de producción asociados a la manipulación adicional, y un suministro más dependiente de las variaciones ambientales (Lees *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2010).

Los reglamentos de la UE contienen pocas estipulaciones detalladas sobre el procedimiento de depuración a seguir. El principal requisito relacionado con el propio sistema es que: «El sistema de depuración deberá permitir que los moluscos reanuden rápidamente y mantengan su alimentación por filtración y que queden limpios de residuos cloacales, no vuelvan a contaminarse y se mantengan con vida en condiciones adecuadas para el envasado, almacenamiento y transporte que precedan a su puesta en el mercado». Estos aspectos están relacionados con los principios generales de la depuración.

Los Estados miembros de la UE han ido especificando los principios de la depuración y otros criterios generales a través de la aplicación de la legislación a nivel nacional. La normativa local puede exigir niveles inferiores después de la depuración y un sistema bien diseñado y en buen funcionamiento debe ser capaz de producir de manera uniforme niveles de  $\leq 80$  *E. coli*/100 g de carne y líquido intravalvar.

La evaluación satisfactoria del sistema de depuración y la comprobación de que los factores que afectan a la actividad fisiológica estén dentro del rango adecuado para las especies en cuestión no siempre consigue que el sistema reduzca de manera adecuada la carga bacteriana. Por este motivo, la normativa local puede llegar a exigir que se demuestre en la práctica la efectividad del sistema antes de ser utilizado para la depuración de un producto destinado al mercado. Estos requisitos difieren notablemente. Normalmente se basan en pruebas bacteriológicas de las muestras recogidas del sistema, antes y después de la depuración, así como un análisis para determinar si la reducción en las concentraciones de bacterias fecales indicadoras (coliformes fecales o *E. coli*) es satisfactoria. En Europa, los requisitos varían según países: en algunos los sistemas de diseño estándar pueden necesitar tan solo un ciclo de verificación satisfactoria antes de la aprobación total, mientras que los diseños no estándar pueden requerir una validación muy completa. Además, se estipula que los moluscos bivalvos deben depurarse continuamente durante un período suficiente para cumplir con el estándar microbiológico del producto final.

#### Tratamiento térmico

El tratamiento térmico parece ser el, hasta el momento, el método más eficaz para reducir la capacidad infectiva de los virus en cualquier producto alimenticio, sin embargo no son aplicables para la comercialización del producto en fresco. Se han descrito diversos tratamientos térmicos para el procesamiento de los bivalvos, desde la simple cocción hasta la pasteurización o la esterilización durante el enlatado. Aunque los procesos de tratamiento térmico regulados comercialmente parecen haber demostrado su eficacia en el control de los virus entéricos, no ocurre lo mismo en el ámbito doméstico o de la restauración.

Los cambios organolépticos, debido a una cocción excesiva, resultan en una menor aceptación por parte del consumidor. El cocinado ligero, a pesar de tener un cierto efecto protector contra la contaminación superficial causada por la manipulación, y sobretodo en comparación con otros hábitos como el consumo

en crudo, es generalmente inadecuada para la eliminación de virus entéricos presentes en el interior de los tejidos (Lees, 2000; Richards *et al.*, 2010). El tipo de virus y la matriz desempeñan un papel significativo en la sensibilidad viral al calor (Crocì *et al.*, 1999; Millard *et al.*, 1987). Además, ciertos componentes o aditivos presentes en los alimentos como un alto contenido en proteínas o grasas pueden estabilizar el virus, protegiéndolo de la inactivación (Bidawid *et al.*, 2000).

El establecimiento de un tiempo mínimo de cocción para la inactivación completa del virus es difícil, ya que pueden influir muchos factores. La especie de molusco, su composición, su tamaño, el nivel de contaminación, las condiciones y el tipo de cocción y la temperatura final alcanzada en el interior de los tejidos son factores importantes para la inactivación (Hewitt y Greening, 2006; Richards *et al.*, 2010). A pesar de cierta variabilidad en los resultados de diferentes estudios sobre resistencia térmica de los virus en moluscos bivalvos, en líneas generales, parece que una temperatura interna de 90°C mantenida durante 2-3 min es eficaz para la inactivación de NoV y HAV (Flannery *et al.*, 2014; Hewitt y Greening, 2006).

#### Alta Presión Hidrostática

La HHP es un proceso no térmico propuesto como método alternativo para la inactivación de los virus entéricos y otros patógenos resistentes como los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Kingsley *et al.*, 2002a). El producto final mantiene la apariencia, la calidad nutricional, sabor y textura del producto crudo. Además, la HHP facilita el proceso de pelado y extiende la vida útil en refrigeración (Murchie *et al.*, 2005). Recientemente, un estudio con voluntarios llevado a cabo para examinar la eficacia de los tratamientos de HPP para la inactivación de NoV en ostras crudas contaminadas artificialmente mediante inyección, mostró que una exposición de las ostras a una presión de 600 MPa a 6°C y durante 5 min previene el riesgo de infección (Leon *et al.*, 2011). De nuevo los resultados pueden variar en función de la especie viral o incluso cepa, duración, temperatura, propiedades de la matriz utilizada, salinidad, pH y

contenido de agua (Grove *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010; Kingsley, 2002a, 2006, 2007; Kingsley y Chen, 2009). Aún no está claro si las altas presiones requeridas para la reducción de NoV en los moluscos (600 MPa) serán viables desde el punto de vista comercial y/o aceptadas por los consumidores pues induce una apariencia blanquecina y de cocción ligera.

### Irradiación

Existen otros métodos pero de incierta o dudosa eficacia para la eliminación de virus en moluscos, como la irradiación UV o radiación ionizante. De nuevo la variabilidad en los resultados entre estudios puede de ser atribuida, a la utilización de diferentes virus, especie de molusco, métodos de exposición y composición de la matriz. La radiación UV es eficaz en la reducción viral en la superficie del producto, pero no tiene poder de penetración para inactivar los virus en el interior de los tejidos (de Roda Husman *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2010). En cuanto a la radiación ionizante, los niveles requeridos para inactivar un 90-95% de estos virus ( $\geq 3$  kGy) deteriora las propiedades organolépticas del producto además de tener unos costes elevados (Di Girolamo *et al.*, 1972; Jung *et al.*, 2009; Mallet *et al.*, 1991).

#### **1.7.5. Legislación y control microbiológico para el producto final.**

Según el reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, los moluscos bivalvos destinados al consumo fresco no deben superar las 230 *E. coli* (NMP)/100 g de carne y líquido intravalvar. Deberán a su vez carecer de *Salmonella* en 25 g de producto.

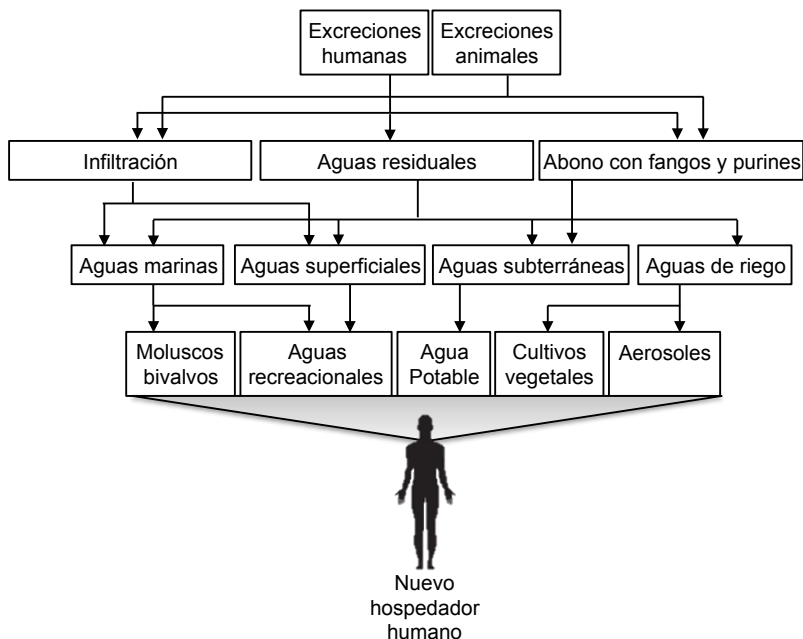
En algunos países hay requisitos adicionales para los moluscos procesados. Por ejemplo, en Japón, además del requisito estándar de 230 *E. coli* (NMP)/100 g de carne y líquido intravalvar, el recuento de bacterias no debe superar los 50.000 por gramo y *V. parahaemolyticus* no debe superar los 100 NMP/g.

## 1.8. Virus entéricos en agua

### 1.8.1. El agua como vector de transmisión de virus entéricos

La escasez de agua es uno de los principales problemas con los que se enfrentan las sociedades humanas en este siglo. El crecimiento de la población y la industrialización están aumentando las presiones sobre los suministros locales y regionales de agua necesarios para el riego, usos industriales y domésticos. A esto hay que sumarle nuevas incertidumbres en el suministro de agua dulce y las futuras demandas consecuencia del cambio climático (ONU, 2013). La presencia de virus entéricos en el agua constituye un problema de especial preocupación debido a su alcance y complejidad y cuyas consecuencias aún no han sido plenamente evaluadas. El desarrollo tecnológico e industrial, el aumento de la calidad y ritmo de vida, y la concentración poblacional en zonas de alta densidad durante las pasadas décadas, en especial en los países en vías de desarrollo, han provocado la necesidad de diversificación de las fuentes de abastecimiento tanto de agua potable como para fines agrícolas, llevando a una intensificación del uso de aguas superficiales y acuíferos subterráneos. Sin embargo, las aguas superficiales reciben el impacto de las aguas residuales urbanas o comunitarias contaminadas con material fecal, aumentando el riesgo de contaminación viral a través de diferentes rutas (Figura 16).

Cuando el agua contaminada es utilizada directamente como agua de bebida representa un importante peligro para el consumidor. Sin embargo, la infección puede ocurrir también como consecuencia de su utilización para la irrigación de cultivos, el lavado y procesado de alimentos o la producción de hielo. Además de la infección a través de la ruta alimentaria, la infección con virus entéricos puede ser adquirida a través de la exposición ambiental, como aguas recreacionales o aerosoles (Koopmans *et al.*, 2002; Sinclair *et al.*, 2009; Wyn-Jones *et al.*, 2011).



**Figura 16: Vías de contaminación de los virus entéricos transmitidos a través del agua**  
(Modificado de Melnick *et al.*, 1978)

### 1.8.2. Virus entéricos en agua de consumo

La escasez de agua y la falta de acceso a servicios de saneamiento en los países pobres y/o en desarrollo siguen siendo un problema de salud global. El consumo de agua no tratada o tratada de forma inadecuada es una de las principales rutas de transmisión de enfermedades entéricas, sobretudo en los países pobres o en vías de desarrollo (Boschi-Pinto *et al.*, 2009; Fewtrell *et al.*, 2005). A pesar de ciertos avances hacia los Objetivos de Desarrollo del Milenio, más de 768 millones de personas (~ 11% de la población mundial) carecen de acceso a una fuente saneada de agua potable (ONU, 2013).

Los estudios indican que la contaminación fecal del agua de consumo está muy extendida en todo el mundo. Una gran proporción de la población

mundial, especialmente en países del África subsahariana, el sur de Asia o América Latina y el Caribe, así como de zonas rurales utiliza agua contaminada con material fecal. Se cree además que esta contaminación fecal del agua de consumo está incluso subestimada por asumir el riesgo cero en fuentes de agua saneadas (Bain *et al.*, 2014). Las fuentes de agua saneadas son aquellas que protegen el agua, tanto subterránea como superficial, de la contaminación exterior por medio de tuberías u otros sistemas. Sin embargo, muchos de estos sistemas son de mala calidad o de plástico mucho más vulnerables a las agresiones y daños físicos externos (Dongdem *et al.*, 2009). Se ha documentado un alto grado de contaminación en sistemas saneados de países de bajos ingresos y zonas rurales debido por ejemplo a un suministro de agua intermitente o de larga distancia, recarga artificial de acuíferos de aguas subterráneas con aguas superficiales contaminadas o con aguas residuales, revestimientos de pozos defectuosos, etc. (Center y Knox, 1991; Chapron *et al.*, 2000; Bain *et al.*, 2014; Dongdem *et al.*, 2009).

Junto a otros patógenos bacterianos como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, y parásitos como *Cryptosporidium* y *Giardia*, un gran porcentaje de los casos de morbilidad y mortalidad por enfermedad diarreica y/o gastrointestinal asociada al consumo de agua son causados por los virus entéricos. A pesar de que NoV y HAV son las principales causas de brotes virales transmitidos por el agua a nivel mundial, la infección por RV es la principal causa de morbilidad y mortalidad infantil en países en desarrollo.

A pesar de que el abastecimiento de agua potable en los países desarrollados es por lo general seguro, los brotes de asociados al consumo de agua siguen documentándose periódicamente. Mead *et al.* (1999) estimaron que un 60 % de las infecciones por NoV en EEUU se producen a través de agua contaminada. La mayoría de los brotes asociados con agua potable en EEUU desde 1971 hasta 2006 (87,2%) tuvieron su origen en los suministros de agua públicos (Craun *et al.*, 2010). Muchos de ellos se produjeron como consecuencia del consumo de agua subterránea sin tratar (30%) o tratada inadecuadamente (22%), agua superficial tratada inadecuadamente (16%), deficiencias en los

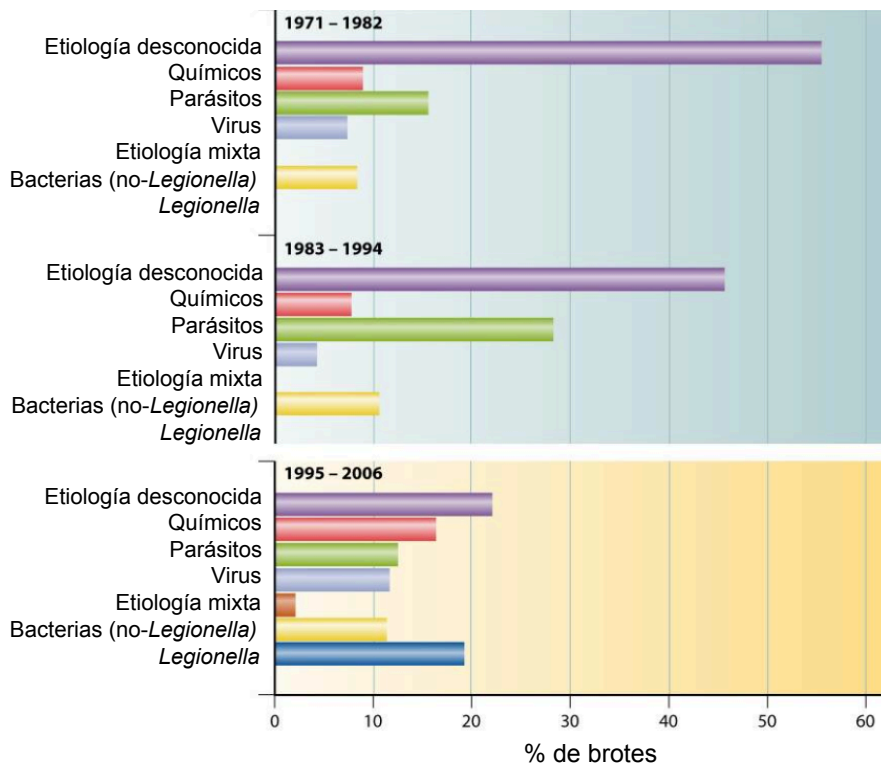
sistemas de distribución (10%) o por consumo de aguas superficiales sin tratar (3%). El agente etiológico causante de estos brotes solo fue determinado en el 55,4 % de los casos (Figura 17).

Las técnicas de desinfección utilizadas comúnmente para el agua de consumo, como la cloración (mediante el uso de cloro y derivados), UV-C y la ozonización, que son en general altamente eficientes contra las bacterias y relativamente efectivos contra virus (dependiendo del tipo) y muchos protozoos, tienen sin embargo una serie de desventajas. La desinfección mediante radiación UV-C o el empleo de ozono, tienen asociados unos elevados costes de instalación, electricidad y de mantenimiento. Además la ozonización y el uso del cloro puede producir compuestos secundarios peligrosos para la salud, como los trihalometanos, por lo cual siguen siendo muy criticados como tratamientos de agua de consumo e incluso de agua para irrigación.

Se hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos para la desinfección de agua de consumo para solventar los problemas y limitaciones anteriormente mencionadas. Los métodos alternativos deben ser de bajo coste, de bajo consumo energético, sostenibles medioambientalmente y no presentar efectos adversos para la salud. En este sentido, la desinfección solar y los Procesos Avanzados de Oxidación (AOP) (del inglés *Advanced oxidation processes*) como la foto-catálisis han emergido recientemente como estrategias prometedoras.

La desinfección solar, también denominada SODIS, es un método para el tratamiento descentralizado de agua y su almacenamiento recomendado entre otros por la OMS como método alternativo de uso doméstico en países en vías de desarrollo y tras catástrofes naturales (Acra *et al.*, 1989; McGuigan *et al.*, 2012; Sommer *et al.*, 1997). Consiste en la exposición de pequeños volúmenes de agua (hasta 2 L) contenidos en botellas transparentes de plástico (normalmente de polietileno-tereftalato, PET) a la acción directa de la radiación solar durante al menos 6 h (o 2 días consecutivos si hay más de un 50 % de nubosidad) durante el periodo de máxima intensidad solar (McGuigan *et al.*,

2012). El efecto biocida del método SODIS se debe a la acción combinada y sinérgica de la porción UV de la radiación solar y la temperatura alcanzada en el agua. La eficacia del proceso depende principalmente de la irradiación, temperatura, turbidez, oxígeno disuelto y la resistencia del microorganismo (Malato *et al.*, 2009).



**Figura 17: Porcentajes de las etiologías de los brotes asociados a los sistemas públicos de agua desde 1971 hasta 2006 (n = 680).** Los brotes asociados con *Legionella* sólo se registraron entre 2001 y 2006. (Modificado de Craun *et al.*, 2010).

### **1.8.3. Virus entéricos en agua para irrigación.**

Además del consumo de agua no tratada o tratada de forma inadecuada como ruta de transmisión de virus entéricos, el consumo de diferentes productos vegetales, consumidos crudos o mínimamente procesados, proporcionan un importante foco de transmisión de virus entéricos, principalmente debido a la utilización de agua contaminada con material fecal para la irrigación de dichos cultivos.

La utilización de aguas residuales, lodos de depuradora y material fecal humano o animal, diluido o en crudo, es una práctica muy extendida y con una larga tradición, en muchos países de todo el mundo como una fuente de nutrientes para los cultivos (Jiménez *et al.*, 2010). Con los años, se ha vuelto menos popular en los países desarrollados, con la mejora de las tecnologías de tratamiento y una mayor conciencia de los problemas ambientales y de salud asociados con dicha práctica. Por el contrario, en las regiones áridas y los países en vías de desarrollo, los cuales representan actualmente el 75 % de las tierras de regadío mundial, la reutilización de aguas residuales crudas o diluidas sin tratar o parcialmente tratadas para el riego es una práctica muy común contra la escasez y la demanda de agua (Jiménez *et al.*, 2010; WWAP, 2012 ).

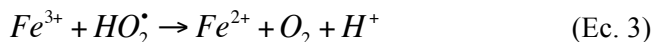
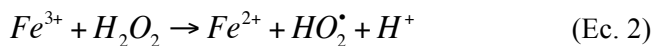
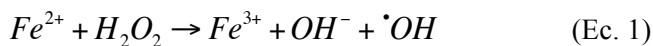
Actualmente, el riego de los cultivos con aguas residuales o agua contaminada con materia fecal desempeña un papel muy importante en la transmisión mundial de patógenos entéricos. El aumento en el número de brotes asociados a este tipo de productos durante las dos últimas décadas se corresponde con un aumento en su demanda, su expansión en el mercado globalizado y su forma de consumo, crudos o mínimamente procesados (Cheong *et al.*, 2009; Gerba y Choi, 2006; Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Una amplia variedad de frutas y vegetales se han asociado con grandes brotes (a menudo internacionales) tanto de NoV como de HAV. Algunos brotes de HAV se han asociado con consumo de tomates (Petrignani *et al.*, 2010), cebollas (Detinger *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 2005), frambuesas (Ramsay y Upton, 1989; Reid y Robinson *et al.*, 1987), fresas (Hutin *et al.*, 1999; Niu *et*

*al.*, 1992) y arándanos (Calder *et al.*, 2003). NoV por su parte es el principal responsable de la mayoría de brotes por consumo de apio (Warner *et al.*, 1991), diversas frutas (Cotterelle *et al.*, 2005; Hjertqvist *et al.*, 2006; Korsager *et al.*, 2005), lechuga (Ethelberg *et al.*, 2010) y melón (Bowen *et al.*, 2006). Katzenelson *et al.* (1976) demostraron que las comunidades israelíes utilizando los efluentes de aguas residuales para el riego tuvieron un aumento de la incidencia de la hepatitis infecciosa, en comparación con otras comunidades. Cheong *et al.* (2009), detectaron y asociaron la presencia de diversos virus entéricos, incluidos AdV, EV, NoV and RV, en agua subterránea utilizada para la irrigación de diferentes vegetales.

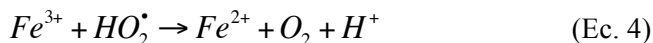
Una de las estrategias emergentes más prometedoras para la desinfección del agua son los AOP. A pesar de que existen diferentes AOP que utilizan diferentes sistemas de reacción, todos ellos están basados en la generación físico-química de especies transitorias, principalmente radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), altamente eficientes en la oxidación de la materia orgánica. Entre los diferentes AOP, los procesos de Fenton homogéneo y foto-Fenton han atraído un gran interés en el campo de la desinfección solar (Malato *et al.*, 2009).

Los procesos de Fenton homogéneo se basan en la formación de  $\cdot\text{OH}$  cuando, en ausencia de radiación solar, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se descompone por la presencia en el agua de iones de  $\text{Fe}^{+2}$  (Chong *et al.*, 2010; Pignatello *et al.*, 2006). Las ecuaciones (Ec.) 1, 2 y 3 representan dicho proceso.



En presencia de radiación UV-visible de longitudes de onda hasta los 600 nm, la reacción mejora en comparación con la reacción en condiciones de

oscuridad debido a la producción adicional de más  $\cdot\text{OH}$  (Mailhot *et al.*, 2002) según la Ec. 4.



Esta reacción ocurre por la foto-reducción de los principales complejos del  $\text{Fe}^{3+}$ , principalmente  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ , hacia  $\text{Fe}^{2+}$ , que cierra el ciclo foto-catalítico y conduce a la generación continua de  $\cdot\text{OH}$ , mientras que elimina la necesidad de adición de más  $\text{Fe}^{2+}$  (Pignatello *et al.*, 2006). En la reacción de foto-Fenton influyen factores como el pH, la cantidad de  $\text{Fe}^{2+}$  disuelto, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , temperatura, radiación y la presencia de otros iones y materia orgánica disuelta (Chong *et al.*, 2010; Malato *et al.*, 2009).

#### **1.8.4. Tratamiento de aguas residuales**

Aunque la recogida de aguas residuales data de tiempos remotos, el tratamiento para su depuración es relativamente reciente, situándose a finales del s. XIX y principios del s. XX (Cooper, 2001). El primer caso que constató la necesidad imperiosa de tratar el agua residual se remonta a 1855, cuando John Snow demostró la vinculación de un brote de cólera en Londres y la contaminación por agua residual del Río Támesis (Cooper, 2001).

El grado de reducción de los virus entéricos varía de acuerdo con el sistema de tratamiento de aguas residuales utilizado, el tiempo de residencia, tipo de virus, la concentración inicial de aguas residuales en bruto, la radiación solar, la temperatura, la adsorción, la destrucción enzimática, y la depredación por bacterias y protozoos (Arraj *et al.*, 2005). Los procesos de tratamiento de aguas residuales incluyen procesos físicos, químicos y biológicos, tales como filtración, y la coagulación, oxidación y cloración.

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales convencionales, los virus entéricos se eliminan mediante una combinación de adsorción irreversible e inactivación mediante desinfectantes (Charles *et al.*, 2008). Los virus presentes en aguas pueden estar libres en flotación o asociados

a partículas sólidas. Los procesos físicos como la sedimentación, filtración, floculación y coagulación eliminan los virus adsorbidos en estas partículas.

La eficacia de la eliminación viral varía dependiendo de las afinidades de adsorción de las partículas virales y los adsorbentes, la saturación de sustrato, potencial redox y el oxígeno disuelto del sistema (Schijven y Hassanizadeh, 2000; Templeton *et al.*, 2008). Los adsorbentes potenciales de los virus en el agua incluyen la arena, la arcilla, las bacterias, coloides en suspensión y sedimentos (Templeton *et al.*, 2008).

La interacción entre la partícula viral y los adsorbentes es una función del punto isoeléctrico del virus, y de la partícula adsorbente, así como de la hidrofobicidad de esta última. Las tasas de extracción viral mediante estos procesos dependen en gran medida del pH, la saturación de sustrato, potencial redox y el oxígeno disuelto del sistema o la velocidad del flujo del efluente (Charles *et al.*, 2008). Estos procesos físicos eliminan alrededor del 90-99% de la carga viral de las aguas residuales (Ueda *et al.*, 2004). La eliminación adicional de contaminantes biológicos se consigue mediante la desinfección, que puede utilizar cloro, ozono, ácido peracético y/o irradiación UV (Mezzanotte *et al.*, 2007).

Los desinfectantes químicos inactivan los virus mediante oxidación o desintegración de la partícula viral, o por inhibición de la actividad celular en el caso de otros microorganismos (Cho *et al.*, 2003). La desinfección por UV, se basa en la formación de dímeros de pirimidina en el DNA/RNA del organismo objetivo, impidiendo su replicación (Kurosaki *et al.*, 2007). La presencia de partículas en suspensión que reducen o impiden por completo el contacto entre el agente desinfectante y el organismo es uno de los principales factores que afectan al proceso de inactivación viral mediante desinfección (Templeton *et al.*, 2008). Las partículas orgánicas afectan negativamente la desinfección viral mediante agentes químicos a causa de un aumento en la demanda de desinfectante a medida que penetran en la superficie de la partícula. La estructura de la partícula viral y la porosidad de las partículas en suspensión

también juegan un papel en la protección de los virus frente a la desinfección (Gehr *et al.*, 2003).

Aunque la combinación de todos estos procesos puede eliminar una carga sustancial de los virus, sus eficiencias varían y pueden conducir a la descarga de virus patógenos en los efluentes. Se ha demostrado ampliamente que los virus entéricos son inherentemente más resistentes a los desinfectantes aplicados convencionalmente que los indicadores bacterianos (Armon *et al.*, 2007; Tree *et al.*, 2003).

Si bien los procesos físicos eliminan una parte de la carga viral asociada con las partículas grandes, otra parte adsorbida a partículas coloidales más pequeñas puede sobrevivir a estos procesos y resistir gracias a esta protección procesos posteriores en las etapas de desinfección (Templeton *et al.*, 2008) Aunque la combinación de todos estos procesos elimina una carga sustancial de virus, sus eficiencias pueden variar, dando lugar a la descarga de los virus patógenos en los efluentes.

#### **1.8.5. Legislación**

Actualmente, la evaluación de la calidad microbiológica del agua se basa, tanto en UE como en EEUU, en indicadores bacterianos. De acuerdo con las regulaciones de la Unión Europea, los microorganismos indicadores de cumplimiento legal actual para el agua potable son las bacterias coliformes totales, *E. coli*, enterococos y *Clostridium perfringens* (Directiva 98/83/CE del Consejo Europeo). En todos los casos la presencia de estas bacterias no debe superar los 0 ufc/100 mL. En Europa, para las aguas recreacionales los indicadores obligatorios se reducen a *E. coli* y enterococos fecales (Directiva del Consejo Europeo 2006/7/CE). En lo que se refiere a la calidad microbiológica del agua de riego utilizada para la producción de productos frescos no existen directrices reconocidas internacionalmente. Sin embargo, sí existen documentos de orientación, tales como las directrices de la OMS para el uso seguro de las aguas residuales, excrementos y aguas grises (OMS, 2006).

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El objetivo general de la tesis fue la adquisición de un mayor conocimiento en lo que concierne al control y eliminación de los principales virus entéricos de transmisión alimentaria mediante procesos, clásicos o novedosos, en los que existe un claro vacío de información. Desde un punto de vista epidemiológico, los virus entéricos de transmisión alimentaria de mayor importancia a nivel global son HAV y NoV y la presente tesis doctoral se circunscribe a ellos. En el caso de NoV, la no disponibilidad de una línea celular para el cultivo de las cepas humanas hace inevitable la utilización de un virus modelo para la consecución de los objetivos. MNV-1, propuesto recientemente como modelo del NoV humano y comúnmente aceptado como la mejor y más racional opción para sustituir a las cepas humanas, ha sido el virus elegido. La utilización de este virus modelo añade cierta novedad a todos los ensayos.

El comportamiento de HAV y NoV durante el proceso de depuración y los factores que gobiernan su persistencia en los tejidos de los bivalvos continúan siendo en gran parte desconocidos. Por otro lado, la creciente demanda de la sociedad para la desinfección de agua contaminada para diversos usos, ha impulsado en la últimos años la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías de purificación y desinfección del agua, energética y económicamente menos costosas y ambientalmente más sostenibles para garantizar la seguridad microbiológica del agua, para disminuir la presión sobre los recursos de agua dulce y para aumentar el suministro de agua en zonas con escasez de agua y semiáridas. Los estudios que evalúan la efectividad del método SODIS y los sistemas foto-Fenton contra los virus entéricos siguen siendo prácticamente inexistentes o restringidos a ciertos virus indicadores, como los bacteriófagos, con características estructurales y/o de resistencia diferentes a HAV y NoV.

La presente tesis doctoral se divide en dos objetivos principales:

- **Evaluar la eficacia y cinética de eliminación de HAV y NoV mediante depuración de moluscos bivalvos y comprender los mecanismos que gobiernan dicho proceso.**
- **Evaluar la eficacia y cinética de eliminación de HAV y NoV en agua mediante sistemas de desinfección emergentes y sostenibles medioambientalmente.**

## **2.1. Objetivos específicos**

### **2.1.1. Depuración de virus entéricos en moluscos bivalvos**

Los objetivos específicos son:

- (i)** Evaluar la eficacia de un sistema de depuración comercial autorizado y homologado para la eliminación de HAV, NoV y bacteriófagos F+RNA (como indicador potencial de los virus entéricos humanos) en dos especies de moluscos bivalvos: almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y Mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*).
- (ii)** Evaluar la eficacia y cinética de eliminación de HAV y MNV-1 en un sistema de depuración experimental.
- (iii)** Comparar y estudiar la existencia de diferencias significativas en la capacidad de depuración de HAV y NoV entre dos especies de bivalvos con hábitos de vida diferentes, infaunal (*Venerupis philippinarum*) y epifaunal (*Mytilus galloprovincialis*).
- (iv)** Evaluar la existencia de un patrón común en la cinética de eliminación viral en los moluscos bivalvos y desarrollar un modelo matemático para su caracterización.

**2.1.2. Eliminación de virus entéricos en agua mediante SODIS y sistemas foto-Fenton**

Los objetivos específicos son:

- (i) Evaluar y comparar la eficacia de la método SODIS para la desinfección de HAV y NoV en agua de bebida bajo condiciones naturales.
- (ii) Evaluar comparativamente la eficacia del método SODIS, y los sistemas Fenton y foto-Fenton para la desinfección de HAV y NoV en agua de riego bajo condiciones naturales.



## RESULTADOS

---



### **3.1. Eliminación de virus entéricos en almeja y mejillón mediante sistemas de depuración**

Artículo 1. Viral elimination during commercial depuration of shellfish.

Artículo 2. Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams.

Artículo 3. Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels (*Mytilus galloprovincialis*).

Artículo 4. Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish.

Artículo 5. Mathematical model for the depuration kinetics of enteric viruses in shellfish: a useful tool to estimate the risk for the consumers.



**Artículo 1: Viral elimination during commercial depuration of shellfish.**

Polo, D., Álvarez, C., Díez, J., Darriba, S., Longa, A., & Romalde, J.L.

**Food Control**, 43, 206–212. (2014)

Índice de impacto 2013: 2,819. Q1 (17/123) en Food Science and Technology

**RESUMEN**

En este estudio se evaluó la eficacia de la depuración para la eliminación del virus de la hepatitis A (HAV), norovirus (NoV) genogrupos I (GI) y II (GII), y bacteriófagos F+RNA (F+RNA) en almeja babosa (*Venerupis pullastra*) y mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). El objetivo principal fue comparar el comportamiento de los diferentes patógenos bajo condiciones de depuración aplicadas comercialmente durante 7 días en un centro homologado. Para la cuantificación de los F+RNA se utilizó el método estándar de doble capa de agar (ISO 10705-1). Para la cuantificación de HAV y NoV GI y GII, se utilizó el método estándar ISO/TS 15216, recientemente publicado y basado en la RT-PCR en tiempo real. La reducción de los F+RNA mostró una cinética de depuración de dos fases. Las tasas medias de reducción fueron de 1 unidad logarítmica (Log) en almeja y 2 Log en mejillón, con niveles residuales después del proceso de  $6,3 \times 10^3$  y  $8,3 \times 10^1$  F+RNA/100 g, respectivamente. Por su parte, HAV, NoV GI y NoV GII se detectaron de forma intermitente a lo largo de todo el proceso, en concentraciones que oscilaron entre  $10^3$  y  $10^5$  copias de RNA/g de tejido digestivo (TD). NoV GI mostró los mayores niveles de contaminación seguido de NoV GII y HAV. Después de siete días de depuración, tanto HAV, como NoV GI y GII se detectaron en almeja, sin embargo, en mejillón sólo se encontró NoV GI al final del proceso. En general, las almejas mostraron tasas de depuración más lenta y mayores niveles de contaminación para todos los virus analizados.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514001479>



**Artículo 2: Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams.**

Polo, D., Álvarez, C., Vilarinho, M.L., Longa, A., & Romalde, J.L.

**Food Microbiology**, 39, 103–107. (2014)

Índice de impacto 2013: 3,374. Q1 (8/123) en Food Science and Technology

**RESUMEN**

En este estudio se evaluó la eficacia de la depuración y la dinámica de eliminación del virus de la hepatitis A (HAV) bajo condiciones experimentales en almejas de Manila sometidas previamente a un proceso de bioacumulación con este virus. Para ello se llevaron a cabo cinco ensayos independientes en un sistema experimental cerrado con un volumen total de aproximadamente 1.750 l, y utilizando lotes de 60 kg de almeja. La técnica utilizada para la cuantificación viral fue la RT-PCR en tiempo real. Se llevaron a cabo ensayos de infectividad al final del proceso de depuración. A pesar de que las concentraciones finales, después de 7 días de depuración, se mantuvieron relativamente altas y con capacidad infectiva, se observó una reducción media en los niveles de HAV de 1,4 Log (93,1%). Esta reducción mostró una cinética de eliminación en dos fases, con una rápida reducción inicial del virus durante las primeras 72 h de depuración, con una disminución media de HAV de 0,6 Log (69%) en el número de copias de RNA/g de tejido digestivo, y una estabilización posterior con una tasa de depuración más lenta en los días restantes.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002013002323>



**Artículo 3: Effectiveness of depuration for hepatitis A virus removal from mussels (*Mytilus galloprovincialis*).**

Polo, D., Álvarez, C., Longa, A., & Romalde, J.L.

**International Journal of Food Microbiology**, 180, 24–29. (2014)

Índice de impacto 2013: 3,155. Q1 (11/123) en Food Science and Technology

## RESUMEN

En este estudio se evaluaron la cinética y la eficacia de la depuración del virus de la hepatitis A (HAV) bajo condiciones experimentales en mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) previamente sometido a procesos de bioacumulación. Se realizaron siete ensayos independientes (cada uno con 70 kg de mejillón) en un sistema experimental cerrado durante 7 días y utilizando dos temperaturas de agua diferentes (13 y 17 °C). Para la cuantificación viral se empleó la técnica de RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Se llevaron a cabo también ensayos cualitativos de infectividad para evaluar la presencia de partículas virales infecciosas al final del periodo de depuración. Los ensayos de depuración mostraron una reducción promedio en los niveles de HAV de aproximadamente 1,1 unidades logarítmicas (Log) (aproximadamente un 90 % de reducción). A pesar de esta reducción, las cargas virales medias en los bivalvos al final del proceso se mantuvieron en niveles relativamente elevados ( $6,5 \times 10^3$  copias de RNA/g de tejido digestivo) y con capacidad infectiva. Se observó también una correlación positiva entre la concentración inicial y final de carga viral. La reducción del HAV mostró una cinética de eliminación bifásica, con una reducción rápida del virus durante las primeras 24-48 h de depuración, y una estabilización posterior con una tasa de depuración más lenta hasta el final del proceso.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514001640>



**Artículo 4: Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish.**

Polo, D., Feal, X., Varela, M.F., Monteagudo, A., Romalde, J.L.

**Food Research International**, 64, 182–187. (2014)

Índice de impacto 2013: 3,050. Q1 (14/123) en Food Science and Technology.

**RESUMEN**

En este estudio se evaluaron y compararon las tasas de bioacumulación y cinéticas de depuración de norovirus murino (MNV-1), como modelo del norovirus humano, en almejas de Manila (*Venerupis philippinarum*) y mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). Se realizaron diez ensayos (cinco con cada molusco) utilizando 70 kg de molusco por ensayo. Los moluscos fueron sometidos a un proceso previo de bioacumulación controlada durante 24 h con  $10^2$  pfu de MNV-1/mL de agua de mar. A continuación los moluscos fueron reubicados en un sistema de depuración experimental durante 7 días. La contaminación viral se cuantificó tras el proceso de bioacumulación y durante la depuración cada 24 horas mediante RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Se llevaron a cabo ensayos de infectividad para probar la presencia de partículas virales infecciosas al final del período de depuración. Los resultados mostraron diferencias significativas en las tasas de acumulación y eliminación viral en almeja y mejillón. Las tasas de bioacumulación viral media de almejas y mejillones fueron de  $5,4 \times 10^6$  y  $4,0 \times 10^5$  copias de RNA/g de tejido digestivo respectivamente, lo que representa una tasa de acumulación un 90 % más elevada en las almejas. Las tasas medias de reducción en relación a los niveles iniciales fueron del 60,5% para las almejas y el 91,6% para el mejillón. Por otra parte, se observó una cinética de depuración similar en los dos moluscos, con dos fases diferenciadas: una rápida reducción inicial de los virus durante la primera 24-72 h de depuración, y una posterior estabilización con una tasa de reducción más lenta. Todos los ensayos mostraron una reducción significativa

del virus, pero con una carga viral residual todavía infecciosa al final del proceso.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914004220>

**Artículo 5: Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful tool to estimate the risk for the consumers.**

Polo, D., Feal, X., & Romalde, J.L.

**Emerging Infectious Diseases.** (*Enviado*)

Índice de impacto 2013: 7,327. Q1 (3/70) en Infectious Diseases.

## RESUMEN

La depuración de virus entéricos en moluscos bivalvos es un proceso biológico complejo que puede estar influido por propiedades biológicas de los moluscos y/o de las especies virales. Sobre la base de los datos experimentales obtenidos previamente, se ha desarrollado un modelo matemático para caracterizar la cinética de eliminación viral durante el proceso de depuración. Se observó que aunque las cargas virales se reducen durante el proceso de depuración, existe una carga viral residual que permanece al final del proceso, lo que sugiere la descomposición de la carga viral en la carga diluida (susceptible de ser depurada) y una carga no diluida (no disponible para su depuración). El modelo produjo una ecuación general, que es capaz de predecir la carga viral en cualquier momento de depuración conociendo la tasa específica de filtración del molusco y propiedades virales específicas. El modelo matemático se puede combinar con los cálculos cuantitativos de evaluación del riesgo para determinar la seguridad de los moluscos depurados, lo cual puede ser muy útil no sólo para los productores de moluscos bivalvos sino también para las autoridades sanitarias.





**Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful tool to estimate the risk for the consumers**

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID:	EID-14-1349
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	12-Aug-2014
Complete List of Authors:	Polo, David; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología Feal, Xabier; Universidad de Santiago de Compostela, Física de Partículas Romalde, Jesus; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología
Keywords:	shellfish depuration, Mathematical model, Hepatitis A virus, Murine norovirus

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1     **Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful**  
2                                   **tool to estimate the risk for the consumers**

3

4                                   David Polo<sup>1</sup>, Xabier Feal<sup>2</sup>, and Jesús L. Romalde<sup>1\*</sup>

5

6     <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, and

7     <sup>2</sup>Departamento de Física de Partículas e IGFAE. Universidad de Santiago de

8     Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain.

9

10

11

12     Submitted to: **Emerging Infectious Diseases**, August 2014

13

14

15

16

17     \* Corresponding author

18             Phone: +34 881816908

19             Fax: +34 881816966

20             E-mail: [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

21

22

23     D. Polo, M.Sc. is currently a Ph.D. student developing his thesis on depuration of

24     enteric viruses from shellfish.

25

26 **Abstract**

27 Enteric virus depuration from shellfish is a complex biological process that may be  
28 influenced by biological properties of the mollusc and/or virus species. On the basis of  
29 previous experimental data, a mathematical model was developed to characterize the  
30 kinetics of viral elimination during the depuration process. It was observed that  
31 although viral loads decay along depuration, a residual viral load remains at the end of  
32 the process suggesting a decomposition of viral load in a diluted load (susceptible of  
33 depuration) and a non-diluted load (unavailable to depurate). The model yielded a  
34 general equation, which can predict the viral load at any depuration time knowing the  
35 specific filtration rate and specific viral properties. The mathematical model can be  
36 combined with quantitative risk assessment calculations to determine the safety of the  
37 depurated shellfish, which can be very helpful not only for shellfish producers but also  
38 to public health authorities.

39

40 **Keywords:** Mathematical model, shellfish depuration, Hepatitis A virus, Murine  
41 norovirus.

42

43

44 Predictive models are increasingly accepted as an integral interdisciplinary knowledge  
45 in microbiology. They can reduce the reliance on culture-based techniques, which are  
46 normally limited in the case of unculturable or hardly culturable viruses like NoV and  
47 HAV, providing a rapid availability of results required in the framework of food  
48 security. From this point of view, they emerge as a useful tool for dealing with the  
49 challenge of sanitary risk of the viral depuration process.

50 Depuration is a statutory requirement in many countries for marketing of fresh shellfish  
51 (1). The process exploits the natural shellfish pumping activity to purge their intestinal  
52 contents, decreasing the likelihood of infectious agents transmission to consumers. Viral  
53 depuration is widely known to be less effective than bacterial depuration and the  
54 compliance of shellfish products with current sanitary standards (uniquely based on  
55 bacterial indicators) cannot guarantee the viral absence (2–5), a fact evidenced by the  
56 periodic outbreaks of Hepatitis A and gastroenteritis following the consumption of  
57 depurated shellfish (6–9). The severe impact of the viral enteric diseases on human  
58 populations has brought awareness by governmental authorities worldwide. From a  
59 viral standpoint, shellfish depuration is a complex biological process that may be  
60 influenced by biological properties of the mollusc and/or viral species. The efficacy of  
61 viral depuration, the time required for a significant reduction of the viral load and the  
62 specific behavior of different viruses in different bivalve species are critical issues for  
63 the development of new and improved shellfish sanitary controls, purification  
64 processes, and the enactment of viral legislation for these products.

65 Previous experimental results obtained with different virus and shellfish species showed  
66 a similar pattern of depuration (see Supplementary Material)(10–12). Data showed that  
67 viral loads at the initial stage of depuration quickly decay until reaching some threshold  
68 of viral contamination that depuration may not removed, suggesting a decomposition of

69 viral load in a diluted viral load (susceptible of being depurated by physical  
70 mechanisms) and a non-diluted viral load (sequestered in non-digestive-tract tissues and  
71 thus unavailable to remove by physical depuration).

72 It was questioned, if an undergoing simple law dictating such behaviour exists, taking  
73 as assumptions how and where virus accumulation occurs and how viral load is  
74 removed. A simple model was derived from the following hypothesis: (I) some amount  
75 of clean flux of water (proportional to the shellfish filtration rate) enters the digestive  
76 tissues (II) the diluted viral load present there randomly diffuses to reach a new  
77 isotropic concentration of equilibrium (III) same amount of contaminated flux is spelled  
78 and (IV) there could be some non-diluted residual viral load. In these hypothesis a linear  
79 differential equation relating viral load variation with time, filtration rate of the shellfish  
80 and residual viral load was deduced. The solution to this equation fitted the behaviour of  
81 the previous experimental data with a high degree of accuracy.

82 We propose the simplest model, in which some part of the viral load is bound to the  
83 gastrointestinal cells of the digestive tissues by specific viral ligands or receptors or  
84 enclosed in the non-conductive parts outside the conductive lumen torrent (and thus  
85 unable to be removed by simple drift)(9, 13–15), while the rest remains diluted in the  
86 lumen of the conductive tissues. Thereby, we decompose virus count in two parts:

$$n = n_d + n_r$$

87 the subscripts meaning diluted and residual. After the bioaccumulation process the  
88 residual viral load goes to a constant value. If environment changes, however, only the  
89 diluted part could vary with time.

$$n(t) = n_d(t) + n_r$$

90 Digestive conductive tissue was idealized as a volume  $v_d$  resulting of the sum of all its  
91 conductive cavities and a volume  $v_r$  representing all the other spaces where the residual

92 viral load could be permanently attached or immobilized. When depuration starts, in a  
 93 infinitesimal time  $\delta t$  digestive tissue absorbs a  $\delta v$  volume of clean water, meaning that  
 94 virus concentration in the  $v_d$  volume of the digestive tissue instantly decreases  
 95 to  $n_d(t)/(v_d + \delta v)$ . At the same time a similar amount of contaminated liquid is  
 96 expelled out which contains  $\delta v n_d(t)/(v_d + \delta v)$  virus. Thereby, in a small  $\delta t$  the  
 97 variation in the virus count at the digestive tissue is

$$\delta n(t) \equiv n(t + \delta t) - n(t) = -\frac{n_d(t)}{v_d + \delta v} \delta v$$

98 Dividing both sides by  $\delta t$  and taking the  $\delta t \rightarrow 0$  limit when  $\delta v \ll v_d$  holds, then

$$\frac{dn_d(t)}{dt} = -\frac{n_d(t)}{v_d} \frac{dv}{dt}$$

99 Interested in the total viral load take it into account that, as  $n_r$  is constant in time then

$$\frac{dn(t)}{dt} = -\frac{n(t) - n_r}{v_d} \frac{dv}{dt}$$

100 The rate of clean water entering the digestive tissue per unit of time,  $dv/dt$ , was  
 101 assumed to be proportional to the filtration rate of the individual, and denoting by  $\alpha$  this  
 102 fraction. Then

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(n(t) - n_r) \frac{\alpha f}{v_d}$$

103 The parameter  $\lambda = \alpha f/v_d$  is denoted as the decay rate of viral load. By solving the  
 104 above first order linear differential equation, the instant viral load at time  $t$  is found

$$n(t) = n_r + (n_0 - n_r)e^{-\lambda t}$$

105

106 It is convenient to take the equation in its concentration form instead of absolute viral  
 107 counts to avoid dependence on initial absolute contamination, by dividing both sides  
 108 by  $n_0$

$$109 \quad c(t) = c_r + (1 - c_r) e^{-\lambda t} \quad [1]$$

110 where  $c(t)$  is the total viral load at instant  $t$ , value 1 meaning initial concentration,  $c_r$  is  
111 the constant residual load,  $\lambda$  the decay rate. A particular case consists in the absence of  
112 residual load, making  $c_r = 0$  in the last equation. Meaning of all used symbols can be  
113 found in Table 1.

114 In this proposed model two separated demeanours were found (Figure 1). The first one  
115 is related to the residual viral load, which can be null or positive, and its value depends,  
116 in principle, on the particular ability of a specific viral species or strain to remain  
117 attached to molecular receptors present on gastrointestinal cells, penetrate to the non-  
118 conductive parts of the digestive tissue like connective tissue or hemocytes, or on the  
119 particular tolerance or capacity of a certain shellfish species to bioaccumulate certain  
120 viral species (e.g. amount and/or distribution of viral ligands or receptors, hemocytes,  
121 etc)(15–18). The second demeanour concerns only to the ability of the host to drift the  
122 dilute content of the viral load, which depends only on kinematic factors like the  
123 fraction of filtration which goes through the digestive gland, the filtration rate of the  
124 species and the size or the structure of the digestive tissues.

125 As  $\lambda$  increases (species with higher filtration rates or smaller digestive tissues) the  
126 quickest the depuration occurs. The biggest/smallest  $c_r$  is, the less/more purified the  
127 specimen could be.

128 The validity of the model could be checked by reproducing (I) the decaying exponential  
129 law and the existence of residual values in Equation 1 and, once accomplished this, (II)  
130 the independence of the decay rate on the particular viral characteristics and its  
131 proportionality with the filtration rate of the host.

132 Experimental data in the case of HAV (Figure 2a) showed decaying rates of  $\lambda = 1.09 \pm$   
133  $0.25 \text{ days}^{-1}$  for mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and  $\lambda = 0.43 \pm 0.07 \text{ days}^{-1}$  in  
134 clams (*Venerupis philippinarum*). Small residual loads of  $4.3 \pm 2.2\%$  were found in

135 mussels and of  $1.3 \pm 3.4\%$  in clams. Experimental data in the case of MNV-1 (Figure  
136 2b) showed decaying rates of  $\lambda = 0.89 \pm 0.22 \text{ days}^{-1}$  in mussels and  $\lambda = 0.58 \pm$   
137  $0.31 \text{ days}^{-1}$  in clams, and bigger residual loads of  $10 \pm 3\%$  in mussels and  $25 \pm 9\%$  in  
138 clams. Although slight differences were found in the decay rates of both viral species,  
139 big uncertainties in the determination of the MNV-1 decay rates make both values  
140 compatible. Thereby, evidence was found that the decay rate does not depend on the  
141 virus (as the model predicts) but it does on the filtration rate of the host. Additionally,  
142 magnitude orders report that the proportionality factor between filtration rate and  
143 filtration rate fraction  $\alpha$  in the digestive tissue is very small, thus only a small amount of  
144 the flux which the shellfish pumps enters the digestive gland.

145 Using our fitted values of the decay rates, a weighted averaged decay rate of  $\lambda =$   
146  $0.985$  was found for *M. galloprovincialis* and  $\lambda = 0.453$  for *V. philippinarum*, yielding a  
147 quotient of  $q = 2.18$ . If the biggest contribution to the possible variation of the decay  
148 rate of a particular species is its own filtration rate, then a similar quotient between the  
149 decay rates should be found in the quotient of filtration rates. Indeed (see supplementary  
150 material) using Labarta *et al.* (19) filtration rate of  $f = 5.25 \text{ l/h}$  for *M. galloprovincialis*  
151 and Nakamura (20) filtration rate of  $f = 2.3 \text{ l/h}$  for *V. philippinarum* a quotient of  $q =$   
152  $2.28$  is found, which is in accordance with the quotient of decay rates. This means that,  
153 as predicted by our model, but without data from more species, the average rapidity in  
154 which depuration occurs in mussels compared with clams (more than a factor 2) is  
155 possibly due to the filtration rate of the species being twice, and thus independent of the  
156 virus characteristics.

157 The advantages of having developed a mechanistic mathematical model from basic  
158 physical principles instead of an empirical model from the experimental data become  
159 now evident. For example, since decay rate of depuration is deduced proportional to

160 filtration rate, decay rates for shellfish species different than those for which decay rates  
161 were empirically found can be predicted (Table 2). Another predictive tool arises  
162 inverting the model equation. By doing so the depuration time needed to achieve a  
163 particular value of virus concentration  $n$  per gram of digestive tissue is found

$$t = \frac{1}{\lambda} \ln \left( \frac{n_0 - n_r}{n - n_r} \right)$$

164 Knowing  $n_0$ , the initial viral count, the decay rate  $\lambda$  of the particular species, and the  
165 residual virus count  $n_r$  calculated through  $n_r = n_0 c_r$ , the minimal time of depuration  
166 from which total viral concentration falls below a desired value is deduced. Values of  
167 typical contamination in a particular environment can be used then to determinate the  
168 requirements of depuration.

169 This integration of predictive microbiology in the process of viral clearance can become  
170 a prediction tool in depuration controls, useful for the rational and efficient design of  
171 new and improved depuration systems. In addition, it can be of great importance for the  
172 regulations on sanitary standards and policy decisions based on quantitative viral risk  
173 assessment during the purification process (see Supplementary Material), as well as for  
174 the establishment of future critic viral values in depurated shellfish.

175

176

#### 177 **Acknowledgements**

178 This work was supported in part by Grant 10MMA200010PR from Xunta de Galicia  
179 (Spain).

180

#### 181 **Conflict of Interest**

182 The authors declare no conflict of interest.

183

184 **REFERENCES**

- 185 1. European Regulation (EC) N° 854/2004 of the European Parliament and of the  
186 Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organization of official  
187 controls on products of animal origin intended for human consumption. Off J Eur  
188 Union 2004;L226: 83–127.
- 189 2. Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Metcalf TG, Atmar RL. Distribution of Norwalk  
190 virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by  
191 detection using RT-PCR. J Food Protect 1998;61:1674–80.
- 192 3. Loisy F, Atmar RL, LeSaux JC, Cohen J, Caprais MP, Pommepuy M. Rotavirus  
193 virus like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. Appl  
194 Environ Microbiol 2005;71:6049–53.
- 195 4. Ueki, Y., Shoji M, Suto A, Tanabe T, Okimura Y, Kikuchi Y, *et al.* Persistence of  
196 Caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. Appl Environ  
197 Microbiol 2007;73:5698–701.
- 198 5. Richards GP, McLeod C, Le Guyader FS. Processing strategies to inactivate viruses  
199 in shellfish. Food Environ Virol 2010; 2:183–93.
- 200 6. Heller D, Gill ON, Raynham E, Kirkland T, Zadick PM, Stabwell-Smith R. An  
201 outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated  
202 oysters. British Med J 1986; 292:1726–27.
- 203 7. Chalmers JWT, McMillan JH. An outbreak of viral gastroenteritis associated with  
204 adequately prepared oysters. Epidemiol. Infect 1995; 115:163–7.
- 205 8. Le Guyader FS, Neil FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, *et al.* A semi-  
206 quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters  
207 implicated in an outbreak. Int J Food Microbiol 2003;87:107–12.

- 208 9. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK., Ruvoen-Clouet N, *et*  
209 *al.* Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*  
210 2006;12:931–6.
- 211 10. Polo D, Álvarez C, Vilariño ML, Longa A, Romalde JL. Depuration kinetics of  
212 Hepatitis A virus in clams. *Food Microbiol* 2014a;39:103–7.
- 213 11. Polo D, Álvarez C, Longa A, Romalde JL. Depuration effectiveness for hepatitis A  
214 virus removal from mussels. *Int J Food Microbiol* 2014b;180:24–9.
- 215 12. Polo D, Feal X, Varela MF, Monteagudo A, Romalde JL. Depuration kinetics of  
216 murine norovirus in shellfish. *Food Res Int* 2014c; 64:182–7.
- 217 13. Tian P, Engelbrektsen AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. Norovirus recognizes  
218 histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters:  
219 a possible mechanism of bioaccumulation. *J Food Protect* 2007;70:2140–7.
- 220 14. McLeod C, Hay B, Grant C, Greening G, Day D. Localization of norovirus and  
221 poliovirus in Pacific oysters. *J Appl Microbiol* 2009;106:1220–30.
- 222 15. Provost K, Ozbay G, Anderson R, Richards GP, Kingsley DH. Hemocytes are sites  
223 of enteric virus persistence within oysters. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:8360–  
224 9.
- 225 16. Nappier SP, Graczyk TK, Schwab KJ. Bioaccumulation, retention, and depuration  
226 of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters.  
227 *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6825–31.
- 228 17. Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, *et al.*  
229 Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol*  
230 2011;77:3189–96.
- 231 18. Le Guyader SF, Atmar RL, Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish:  
232 when specific ligands come into play. *Curr Op Virol* 2012;2:103–10.

- 233 19. Labarta UM, Fernandez-Reiriz J, Babarro, JMF. Differences in physiological  
234 energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*  
235 Mar Ecol Prog Ser 1997;152:167-73.
- 236 20. Nakamura Y. Filtration rates of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*:  
237 dependence on prey items including bacteria and picocyanobacteria J Exp Mar Biol  
238 Ecol 2001;266:181-92.
- 239 21. Møhlenberg F, Riisgård HU. Filtration rate, using a new indirect technique, in  
240 thirteen species of suspension- feeding bivalves. Mar Biol 1979;54:143-8.
- 241 22. Riisgård HU, Møhlenberg F. An improved automatic recording apparatus for  
242 determining the filtration rate of *Mytilus edulis* as a function of size and algal  
243 concentration. Mar Biol 1979;52:61-7.
- 244 23. Griffiths RJ. Filtration, respiration and assimilation in the black mussel  
245 *Choromytilus meridionalis*. Mar Ecol Prog Ser 1980;3:63-70.
- 246 24. Berry PF, Schleyer MH. The brown mussel *Perna perna* on the Natal coast, South  
247 Africa: utilization of available food and energy budget. Mar Ecol Prog Ser  
248 1983;13:201-10.
- 249 25. Riisgård HU. Efficiency of particle retention and filtra- tion rate in 6 species of  
250 northeast American bivalves. Mar Ecol Prog Ser 1988;45:217-23.
- 251 26. Coughlan J, Ansell AD. A direct method for deter- mining the pumping rate of  
252 siphonate bivalves. J Cons Int Explor Mer 1964;29:205-13.
- 253 27. Meyhöfer E. Comparative pumping rates in suspension-feeding bivalves. Mar Biol  
254 1985;85:137-42.
- 255
- 256
- 257

258

259 **Table 1.** Index of symbols and definitions used. \*, Digestive tissue

260

261

<b>Symbol</b>	<b>Definition</b>
$n(t)$	Total viral load
$c(t)$	Relative viral load
$n_d(t)$	Diluted viral load
$c_d(t)$	Relative diluted viral load
$n_r$	Residual viral load
$c_r$	Relative residual viral load
$n_0$	Total initial viral load
$f$	Filtration rate
$v_d$	Volume of the conductive cavities of the DT*
$\alpha$	Ratio of filtration rate entering the DT
$\lambda$	Decay rate
$i$	Infectious factor
$c$	Cooking factor
$n_i$	Infectious dose

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272 **Table 2.** Prediction of decay rates of several molluscan species based on the relation  
 273 found between filtration rate and decay rate of *Mytilus galloprovincialis* and *Venerupis*  
 274 *philippinarum*. (S), Suction method; (P), Photoaquarium method; (C), Clearance  
 275 method; (R), Replacement method; (T), Thermirstor method. \*, experimental result  
 276 obtained with the model presented here.  
 277

<b>Molluscan species (measurement method)</b>	<b><math>\lambda</math> (Days<sup>-1</sup>)</b>	<b>Reference</b>
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.99	*
<i>Venerupis philippinarum</i>	0.45	*
<i>Cardium echinatum</i> (S)	0.81	21
<i>Cardium edule</i> (S)	2.23	21
<i>Mytilus edulis</i> (S)	1.43	21
<i>Modiolus modiolus</i> (S)	1.15	21
<i>Arctica islandica</i> (S)	1.07	21
<i>Mytilus edulis</i> (P)	1.42	22
<i>Choromytilus meridionalis</i> (C)	1.03	23
<i>Perna perna</i> (C)	1.70	24
<i>Crassostrea virginica</i> (C)	1.30	25
<i>Geukensia demissa</i> (C)	1.18	25
<i>Mercenaria mercenaria</i> (R)	0.48	26
<i>Clinocardium nuttallii</i> (T)	0.60	27
<i>Mytilus californianus</i> (T)	1.52	27
<i>Chlamys hastata</i> (T)	1.67	27

278  
 279  
 280  
 281  
 282  
 283

284

285

**Figure Legends**

286

287 **Figure 1.** Behaviour of the total virus load  $c(t)$  with time. At initial time  $t = 0$  virus load  
288 is 1 and it is composed by two parts, a residual viral load and a diluted viral load. As  
289 time increases, viral load decays with a rate proportional to the filtration rate (the higher  
290 the filtration rate the quicker decaying rate) to the constant residual load. After an  
291 infinite time of depuration, residual load is always present in this model.

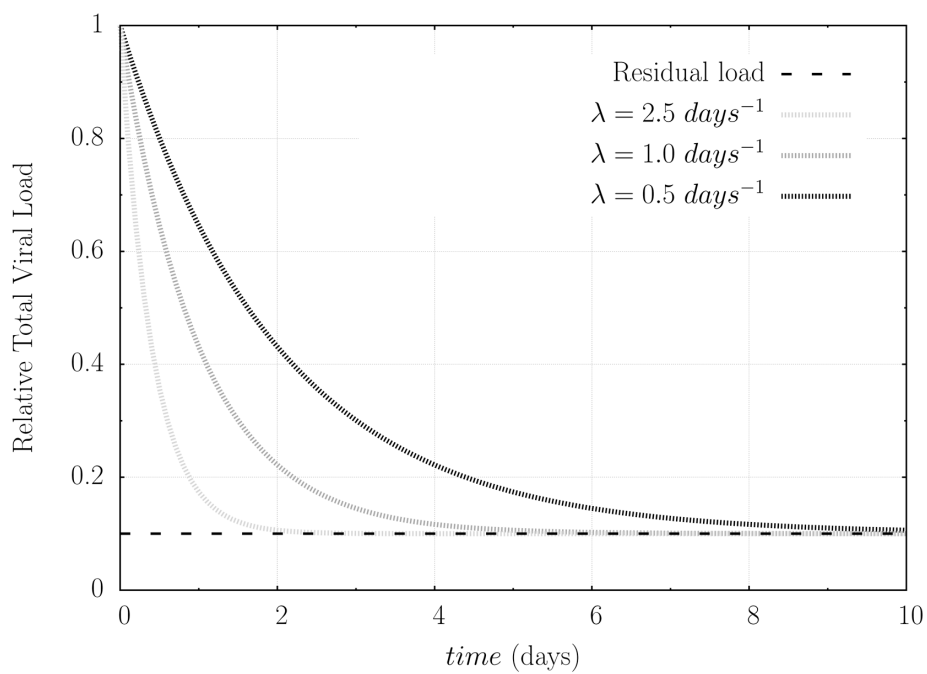
292

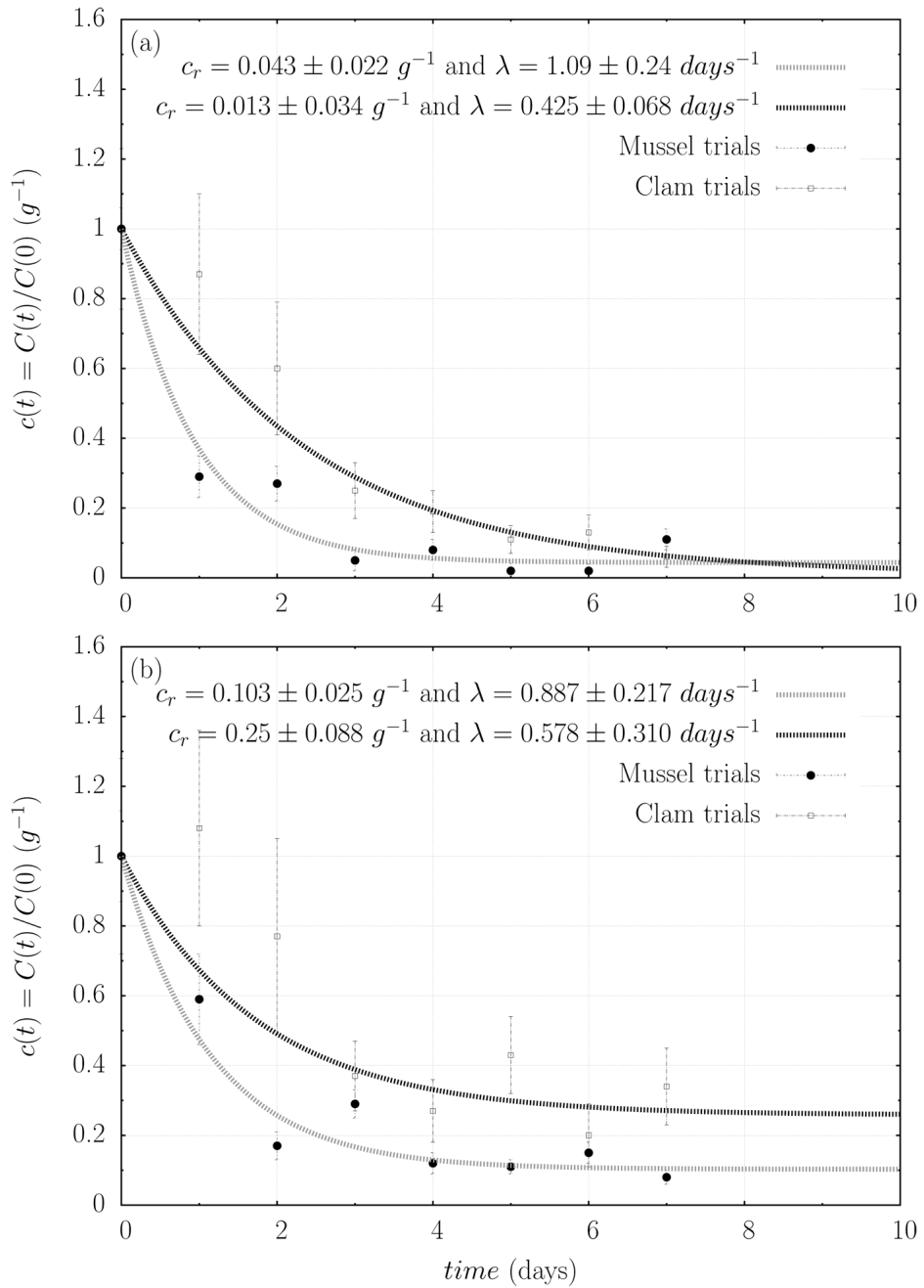
293 **Figure 2.** Experimental data of HAV (a) and MNV-1 (b) virus load in the digestive  
294 tissue of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis philippinarum*)  
295 during depuration and fitted curves using the drift model, from which empirical values  
296 of  $\lambda$  and  $c_r$  are extracted.

297

298

299





**Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: a useful  
tool to estimate the risk for the consumers**

**David Polo<sup>1</sup>, Xabier Feal<sup>2</sup>, and Jesús L. Romalde<sup>1\*</sup>**

**Supplementary Information**

### **1. Experimental data**

The model was based on previous data of HAV and MNV-1 (as a surrogate for human NoV) depuration in clams (*Venerupis philippinarum*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) obtained in an experimental depuration system. A total of 20 depuration trials (5 trials for each shellfish/virus species) were performed (1–3). Different initial viral load for each trial were observed, depending on the bioaccumulation factors, thus every trial in absolute viral load must be regarded as a different experiment. In each trial, relative viral load is obtained by dividing all the viral loads at each time  $t_i$  ( $i = 1, \dots, 7$  days) by the initial viral load. Five elements  $c(t_i)$  of the relative viral load in a sample yielded the mean viral load at time  $t_i$ , and the uncertainty in the mean viral load is calculated by the typical deviation of the sampling distribution of means. The last one was calculated through the population's typical deviation, estimated through the sample with  $5 - 1$  degrees of freedom, and divided by  $\sqrt{5}$ . No subjective sampling was performed, no single trial was discarded, and thus uncertainties were in general big.

Then, for a virus and a shellfish species, 7 values of relative viral load with their corresponding uncertainty were obtained. The procedure to find the unknown  $\lambda$  and  $c_i$  parameters of the non-linear equation for a particular virus and shellfish couple was an implementation of the nonlinear least-squares Marquardt-Levenberg Algorithm (LMA) with weights given by the reciprocal of the previously defined uncertainties.

### **2. Filtration rate justification**

Definition of decay rate involves the fraction of filtration rate entering digestive tissue, the volume of all conductive cavities in digestive tissue and the filtration rate of the

species. The biggest contribution to the decay rate is assumed to be the filtration rate; by that means the quotient between two different species decay rates is approximately equal to the quotient of their filtration rates. Estimation of filtration rate has been several times a source of conflicting data. Briefly, filtration rate is defined as the inhaled volume of water per unit of time. By contrast, clearance rate is defined as volume of water cleared of suspended particles per unit of time. When gills retain suspended particles with full efficiency, for example algae  $> 4 \mu\text{m}$  in bivalves with eu-laterofrontal cirri (4), then clearance rate equals filtration rate. Estimation of filtration rate could be accomplished by direct methods or indirect methods. Most usual indirect methods in experiments are flow-through chambers, suction, clearance, photo-aquarium, thermistor and replacement method (see Table 2 of main text).

Filtration rate may be mainly affected by algae concentration, silk concentration and mechanical flow conditions of the experiment. A brief discussion of filtration rate estimations which best fitted our experimental conditions is required. Clausen and Riisgård (5) have shown that there is no evidence of physiological regulation of the filtration rate in nutritional adverse conditions. In the particular case of *M. edulis* the filtration rate under low algae concentration (from no algae till 6000 cells/ml) remained constant (~30 ml/min) and no physiological regulation was found. Above that concentration (8000-10000 cells/ml) filtration rate is reduced in 40%. Thereby, only those filtration data restricted to measurements under low algae concentrations could be used and, according to Riisgård *et al.* (6), that values can be safely extrapolated to the particular case of null algae concentration. Respectively, presence of mechanical flow has shown to be a source of conflicting data due to wrong experimental setups. Conviction persist in literature that filtration rate is correlated to flow rate when measured indirectly by the suction or flow-through chamber methods. However,

Riisgård (4, 7) realized that correlation is seen only when low values of flow rate are chosen ( $\leq 100$  ml/min). In that case, clearance rate is falsely found equal to flow rate. For increasing flow rates, though, clearance saturates in a plateau departing independently/uncorrelated of the flow rate value. In that plateau, following Riisgård (4), clearance rate is equal to filtration rate, and it is in that region of flow where measurements should be done. Moreover, setups with high values of flow rate must be avoided since if the exhaled water starts to mix with the inhalant water, the filtration rate tends to be underestimated.

Meeting all these two requirements, namely low algae concentration ( $< 6000$  cells/ml) and flow rate above critical value ( $> 100$  ml/min), Labarta *et al.* (8) data was used for *M. galloprovincialis* raft cultured specimens of  $\sim 58$  mm of shell length and  $\sim 0.72$  g of dry weight, measured by a flow-through chamber method under a flow rate of  $\sim 165$  ml/min and under low algae concentrations of  $\sim 1$  mg/l. They obtained a filtration rate for a normalized specimen of 1g of dry weight of  $f = 5.25$  l/h. This value is slightly smaller than the *M. edulis* filtration rate of 7.45 l/h and 7.37 l/h measured by the suction and photoaquarium methods, respectively. For *V. philippinarum* the filtration data of Nakamura (9) was used, who found an average filtration rate of  $f = 2.3$  l/h (varying between  $f=1.5$  l/h and  $f=3.3$  l/h for different trials) for a normalized specimen of 1 g of dry weight under clearance method (thus no flow) in initial algae concentrations of 2-5 mg/m<sup>3</sup>.

### **3. Depuration prediction and risk for the consumer. A practical example.**

The reduction factor of cooking is defined, as in literature (10), as  $c$ , being 1 for raw ingestion or less for light or severe cooking (depending on the virus), and the infectious factor  $i$ , representing in a sample of virus the average fraction of infectious viral

particles vs total viral particles. The minimal dose  $n_i$  is the number of infectious viral particles an individual needs to ingest to be infected. A serve of meat having less or just a number of infectious units below the infectious dose  $n_d$  has in fact a total virus count  $n$ , where both quantities are related by  $n_i = i \cdot c \cdot n$ . From this we derive the following equation

$$t = \frac{1}{\lambda} \ln \left( \frac{1 - c_r}{\frac{n_i}{i \cdot c \cdot n_0} - c_r} \right)$$

relating the time of depuration  $t$  needed to achieve a concentration just below the infectious dose  $n_d$  considering a cooking factor  $c$  and knowing the infectious factor  $i$  of the virus.

As an example with a contaminated sample of *Venerupis philippinarum* with  $10^4$  RNA copies of HAV per gram of digestive tissue, the number of hours of depuration required to lower the virus load under the HAV infectious dose can be estimated. We take from the U.S. Food and Drug Administration (<http://www.seafoodhaccp.com/SeafoodData/BadBugBook/chap31.html>) an estimation of infectious dose of  $n_i = 10 - 100$  units for HAV. The number of infectious HAV in a sample is estimated in the 1.6 % (11, 12), then  $i = 0.016$ . Supposing cooking is applied, then a reduction factor of 99.46% must be applied for light cooking, 99.86% for well cooked (13, 14), thus  $c = 0.0054$  for light cooking or  $c = 0.0014$  for well cooked. Residual load was calculated before  $c_r = 0.013$  and decay rate should be expressed in hours thus  $\lambda = 0.453/24 \text{ h}^{-1}$ . For a typical serving size of 60 g of meat, the corresponding average digestive tissue weight was 3.18 g. As first check, the initial infectious units were calculated, being  $i \cdot c \cdot n_0 = 0.899$  per gram, and 2.86 in a serve of 60 g of meat. This means that light cooking drops total infectious units below infectious dose, then no depuration is required. Instead, if the clams are prepared for

raw consumption then initial infectious units would be  $i \cdot c \cdot n_0 = 166$  per gram, and 528 for a serving of 60 g of meat. Depuration is required now, then the amount of time needed to drop infectious units down 10 units is, using last equation, 271 hours (11 days).

Existence of residual loads of virus is also an important factor. For big initial contaminations (or alternatively for high residual loads too, as in the case of MNV-1), initial infectious units in the residual load above infectious dose may be found. It's the case, for example, of a sample of contaminated clams with more than  $2.7 \cdot 10^6$  HAV counts. Then the amount of infectious units present only in the residual part and even after light cooking is, with limitations because of the uncertainty in the determination of  $c_r$ , above the value of 10 infectious units (minimal infectuous dose). As we concluded before that depuration cannot remove residual load, thus the sample shouldn't be recommended for consumption. Thereby it becomes now important to have more accurate measurments of residual loads to improve precision in depuration plausability and times.

## REFERENCES

1. Polo D, Álvarez C, Vilariño ML, Longa A, Romalde JL. Depuration kinetics of Hepatitis A virus in clams. *Food Microbiol* 2014a;39:103–7.
2. Polo D, Álvarez C, Longa A, Romalde JL. Depuration effectiveness for hepatitis A virus removal from mussels. *Int J Food Microbiol* 2014b;180:24–9.
3. Polo D, Feal X, Varela MF, Monteagudo A, Romalde JL. Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish. *Food Res Int* 214c;, **64**:182–7.
4. Riisgård HU. On measurement of filtration rates in bivalves - the stony road to reliable data: review and interpretation *Mar Ecol Prog Ser* 2001;211: 275-91

5. Clausen IB, Riisgård HU. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar Ecol Prog Ser* 1996;141:37-45.
6. Riisgård HU, Larsen PS, Nielsen NF Particle capture in the mussel *Mytilus edulis*: the role of latero-frontal cirri. *Mar Biol* 1996;127:259-66.
7. Riisgård HU. On measurements of the filtration rates of suspension feeding bivalves in a flow system. *Ophelia* 1977;16:167-73.
8. Labarta UM, Fernandez-Reiriz J, Babarro JMF. Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis* *Mar Ecol Prog Ser* 1997;152:167-73.
9. Nakamura Y. Filtration rates of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: dependence on prey items including bacteria and picocyanobacteria *J Exp Mar Biol Ecol* 2001;266:181-92.
10. Pintó RM., Costafreda MI, Bosch A. Risk Assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7350-5.
11. Jansen RW. 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* 1988;163:299-307.
12. Deng MY. Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1927-33.
13. Abad FX, Pintó RM, Gajardo R, Bosch A. Viruses in mussels: public health implications and depuration *J Food Prot* 1997;60:677-81.
14. Bosch A, Abad XF, Gajardo R, Pintó RM. Should shellfish be purified before public consumption? *Lancet* 1994;344:1024-5.

### **3.2. Eliminación de virus entéricos en agua mediante SODIS y sistemas foto-Fenton**

Artículo 1. Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and norovirus under field conditions

Artículo 2. Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under field conditions



**Artículo 1: Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and norovirus under natural solar conditions.**

Polo, D., García-Fernández, I., Fernández-Ibáñez, P., & Romalde, J.L.

**Journal of Applied Microbiology**, (*Enviado*).

Índice de impacto 2013: 2,386. Q2 (69/165) en Biotechnology and Applied Microbiology

**RESUMEN**

Este estudio evalúa y compara la eficacia de la desinfección solar de agua (SODIS) para la eliminación del virus de la hepatitis A (HAV) y norovirus Murino (MNV-1) bajo condiciones solares naturales. Los experimentos se realizaron en botellas de plástico de polietileno tereftalato (PET) de 330 ml, las cuales contenían agua contaminada con HAV o MNV-1 ( $10^3$  pfu/ml). Las botellas se expusieron a la acción de la luz solar natural de 2 a 8 h. Se incluyeron también ensayos control realizados en paralelo bajo temperatura controlada y/o en condiciones de oscuridad. Las muestras se concentraron mediante filtros electropositivos y analizadas mediante RT-PCR en tiempo real y ensayos de infectividad. La temperatura alcanzada en las botellas durante el período de exposición osciló entre 22 y 40 °C. Después de 8 horas de exposición solar (dosis UV acumulada de  $\sim 828$  kJ/m<sup>2</sup> y radiación UV de  $\sim 20$  kJ/L) los resultados mostraron unas reducciones virales significativas ( $p < 0,05$ ) de  $4,0 (\pm 0,56) \times 10^4$  a  $3,15 (\pm 0,69) \times 10^3$  copias de RNA/100 mL (reducción media del 92.1%, 1.1 Log) para los ensayos realizados con HAV y de  $5,91 (\pm 0,59) \times 10^4$  a  $9,24 (\pm 3,91) \times 10^3$  copias de RNA/100 mL (84,4%, 0,81 Log) para los ensayos realizados con MNV-1. Las condiciones de SODIS produjeron una disminución en la infectividad del 33% después de 4 h, y del 66% después de 6-8h en los ensayos con HAV, y del 33% y 66% tras 6 y 8h, respectivamente, en los ensayos con MNV-1. Los resultados indican una mayor importancia de la radiación solar frente a la temperatura como principal factor para la reducción viral. El método SODIS parece ser una respuesta adecuada, efectiva

y aceptable como intervención contra muchas enfermedades diarreicas transmitidas por el agua.

**Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and  
Norovirus  
under natural solar conditions**

Journal:	<i>Applied Microbiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Journal Name:	Journal of Applied Microbiology
Manuscript Type:	JAM - Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Polo, David; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología García-Fernández, Irene; Plataforma Solar de Almería, Microbiología Fernández-Ibáñez, Pilar; Plataforma Solar de Almería, Microbiología Romalde, Jesus Lopez; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología
Key Words:	Disinfection, Drinking water, Viruses

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

**Solar Water Disinfection (SODIS) of Hepatitis A virus and Norovirus  
under natural solar conditions**

**David Polo<sup>1</sup>, Irene García-Fernández<sup>2</sup>, Pilar Fernández-Ibáñez<sup>2</sup> and Jesús L.  
Romalde<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología.  
Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Plataforma Solar de Almería, CIEMAT, 04200 Tabernas, Almería, Spain

**Running title:** SODIS of HAV and Norovirus

Submitted to: **Journal of Applied Microbiology**, July 2014

\* Corresponding author

Phone: +34 881816908

Fax: +34 881816966

E-mail: [jesus.romalde@usc.es](mailto:jesus.romalde@usc.es)

**29 Abstract**

30 Aims: This study evaluates and compares the effectiveness of solar water disinfection  
31 (SODIS) for the elimination of Hepatitis A virus (HAV) and Murine norovirus (MNV-1)  
32 under natural solar conditions.

33 Methods and Results: Experiments were performed in 330 ml Polyethylene terephthalate  
34 (PET) bottles containing HAV or MNV-1 contaminated waters ( $10^3$  pfu/ml) that were  
35 exposed to natural sunlight for 2 to 8 h. Parallel control assays under controlled  
36 temperature and/or in darkness conditions were also included. Samples were concentrated  
37 by electropositive charged filters and analysed by RT-real time PCR (RT-qPCR) and  
38 infectivity assays. Temperature reached in bottles along the exposure period ranged  
39 between 22 and 40 °C. After 8 h of solar exposure (cumulative UV dose of  $\sim 828$  kJ/m<sup>2</sup> and  
40 UV irradiance of  $\sim 20$  kJ/l) results showed significant ( $p < 0.05$ ) viral reductions from 4.0  
41 ( $\pm 0.56$ ) $\times 10^4$  to 3.15 ( $\pm 0.69$ ) $\times 10^3$  RNA copies/100 ml (average decrease of 92.1%, 1.1 log)  
42 in HAV trials and from 5.91 ( $\pm 0.59$ ) $\times 10^4$  to 9.24 ( $\pm 3.91$ ) $\times 10^3$  RNA copies/100 ml (84.4%,  
43 0.81 log) in MNV-1 trials. SODIS conditions induced an infectivity decrease of 33% after  
44 4 h, and 66% after 6 - 8 h in HAV trials, and 33% after 6 h and 66% after 8 h in MNV-1  
45 trials.

46 Conclusions: Results indicated a greater importance of sunlight radiation over the  
47 temperature as a principal factor for viral reduction.

48 Significance and Impact of the Study: SODIS seems to be an appropriate, effective and  
49 acceptable intervention against many waterborne diarrheal diseases.

50

51

52 **Keywords:** SODIS; Water disinfection; Hepatitis A virus; murine norovirus; RT- real time  
53 PCR; Infectivity

**54 Introduction**

55 Water scarcity and the lack of access to sanitation in developing countries continue to  
56 be global health challenges. Despite progress towards the Millennium Development Goals,  
57 more than 768 million people (~11% of the global population) remain without access to  
58 safe drinking water sources (UN 2013). Consumption of untreated or improperly treated  
59 water is one of the most common routes for enteric disease outbreaks and is a priority issue  
60 to solve in order to reduce morbidity and mortality in the developing world (Fewtrell et al.  
61 2005; Boschi-Pinto et al. 2008).

62 Household water treatment and storage (HWTS) have demonstrated to be one of the  
63 most effective ways to reduce the incidence of waterborne diseases in regions without  
64 access to adequately treated drinking water. It constitutes a low cost, easy to use and  
65 sustainable water treatment, complying with basic criteria for acceptance in these  
66 developing zones (Fewtrell et al. 2005; Clasen et al. 2007; McGuigan et al. 2012). Solar  
67 disinfection (SODIS) is a HWTS method that has been gaining popularity in the last 30  
68 years (Acra et al. 1989; Sommer et al. 1997; McGuigan et al. 2012). The SODIS technique  
69 consists of expose of small-volumes (up to 3 l) of contaminated water with low turbidity (<  
70 30 NTU) in transparent containers (usually polyethylene-terephthalate [PET] bottles) to  
71 direct sunlight for at least 6 h (or 2 consecutive days if there is more than 50% of cloud  
72 cover) during the maximum intensity of radiation (McGuigan et al. 2012). Biocidal effects  
73 of SODIS method are attributed to optical (UVA) and solar mild-heating mechanisms  
74 (Jagger 1981; Boyle et al. 2008). The disinfection efficacy of SODIS process depends  
75 principally on the solar irradiance, water temperature, turbidity, dissolved oxygen and  
76 resistance of the type of microorganism (Malato et al. 2009).

77 Solar UV radiation consists on UV-C ( $\lambda=100-280$  nm), UV-B ( $\lambda=280-320$  nm) and UV-  
78 A ( $\lambda=320-400$ ). However, only UV-A, and a small part of UV-B reach the earth surface

79 (Goodsell 2001; Sinha et al. 2002) UV-B may directly damage nucleic acids through  
80 formation of pyrimidine dimers. UV-A photons, the main component responsible for the  
81 disinfecting action of SODIS, are not sufficiently energetic to modify directly nucleic acids  
82 like UV-B and UV-C. However, it causes indirect damage to structural components and  
83 DNA of cells through photosensitizers and may generate reactive oxygen species (ROS) in  
84 water like singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), superoxide ( $\text{O}_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and hydroxyl  
85 radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), which can form single strand breaks, nucleic base modifications as well as  
86 induce oxidations in proteins and membrane lipids (Jagger, 1981; Eisenstark, 1987; Reed et  
87 al. 2000)

88 Previous studies reported reductions in the incidence of diarrhoea using the SODIS  
89 method (Conroy et al. 1999) Recently, new research proved that SODIS can significantly  
90 reduce rates of childhood dysentery and infantile diarrhoea by 45% (du Preez et al. 2011).  
91 Beyond its health benefits through reduction of waterborne diseases, additional studies also  
92 demonstrated that SODIS has positive health impact for Kenyan children under 5 years as  
93 they showed significant increase of weight and height (du Preez et al. 2011).

94 SODIS efficacy has been already demonstrated for a wide range of microorganisms  
95 including bacteria, fungi and protozoan parasites (Lonnen et al. 2005; Sichel et al. 2007;  
96 Boyle et al. 2008; Gómez-Couso et al. 2009) Studies evaluating SODIS against human  
97 viruses under real field conditions are scarce. Some research has been done using viral  
98 indicators like bacteriophages under simulated sunlight and laboratory conditions or real  
99 sunlight in real conditions (Wegelin et al. 1994; Heaselgrave et al. 2006; Love et al. 2010;  
100 Agulló-Barceló et al. 2013). From a public health perspective, only a few human enteric  
101 viruses have been shown epidemiologically to be waterborne transmitted and widely  
102 detected in the environment. Hepatitis A virus (HAV) (fam. *Picornaviridae*) and Norovirus  
103 (NoV) genogroups I and II (fam. *Caliciviridae*) are among the leading aetiological viral

104 pathogens transmitted by water and food (Bosch et al. 1998). HAV is the main cause of  
105 acute hepatitis worldwide and the WHO regard it as reference pathogen for drinking water  
106 risk analysis (Fewtrell and Bartram 2001). NoV is the most important foodborne infectious  
107 agent of gastroenteritis outbreaks worldwide (Atmar and Estes 2006) Human NoV are non-  
108 culturable under laboratory conditions, however, murine norovirus (MNV) has been  
109 demonstrated to be an useful human NoV surrogate due to its similarity in genetic and  
110 environmental stability properties (Bae and Schwab 2008). Most bacteria are relatively  
111 easy targets for physic-chemical disinfection (Malato et al. 2009). On the other hand, viral  
112 pathogens, especially non-enveloped viruses like hepatitis A virus and noroviruses, besides  
113 possessing a high environmental stability low minimal infective dose, they are resistant to  
114 commonly disinfection process and persistent in water supply systems (Bosch 1998).

115 The main objective of this study was to evaluate and compare the effectiveness of  
116 SODIS method for the disinfection of HAV and MNV-1, two high resistant pathogens, in  
117 distilled water under natural solar conditions.

118

## 119 **Material and methods**

### 120 **Cell culture and viral stocks**

121 HAV HM-175/18f was obtained from the ATCC as a cell culture-adapted cytopathic  
122 clone of strain HM-175. MNV-1, a culturable mammalian virus within the *Caliciviridae*  
123 family and genetically similar to human NoV (Wobus et al. 2006; Bae and Schwab, 2008)  
124 was kindly provided by Dr Herbert W. Virgin IV (University of Washington, USA). A  
125 mutant non-virulent infective strain of Mengovirus (vMC<sub>0</sub>), kindly provided by Dr. Albert  
126 Bosch (University of Barcelona) was employed as RNA extraction control as it was  
127 previously described (Costafreda et al. 2006). Stocks of each viral strain were generated by  
128 inoculation onto confluent monolayers of appropriate cell lines (FrHK-4, RAW 267.4 and

129 HeLa for HAV HM-175, MNV-1 and vMC<sub>0</sub>, respectively). The stocks were purified  
130 previously to their use performing 5 series of freezing/thawing to complete release of the  
131 viral particles from the cells and centrifuged at 2000 x g for about 20 minutes at 37 °C to  
132 remove cellular debris. Final concentration of each viral stock was  $1 \times 10^5$  pfu ml<sup>-1</sup> for  
133 mengovirus vMC<sub>0</sub>, and  $1 \times 10^6$  pfu ml<sup>-1</sup> for HAV and MNV-1.

134

### 135 **Solar experiments**

136 All assays were carried out at Plataforma Solar de Almería, Tabernas dessert (Spain)  
137 (latitude 37.09 °N, longitude 2.36 °W). SODIS experiments were performed contaminating  
138 volumes of 330-ml distilled water contained in PET bottles at initial HAV or MNV-1  
139 concentration of  $10^3$  plaque forming units per ml (pfu ml<sup>-1</sup>) and then exposing the bottles  
140 (from here SODIS-bottles) on concrete surface directly to the action of natural solar  
141 radiation during 2, 4, 6 and 8 hours. The distilled water used had a conductivity of  $<10 \mu\text{S}$   
142 cm<sup>-1</sup>, Cl<sup>-</sup> = 0.7–0.8 mg l<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.5 mg l<sup>-1</sup> and dissolved organic carbon  $<0.5$  mg l<sup>-1</sup>.

143 In order to discriminate the effect of solar radiation and temperature, parallel assays  
144 under controlled temperature and in darkness conditions were also included. Bottles under  
145 controlled temperature (from here Bath-bottles) were maintained at  $25 \pm 1$  °C in a cooled  
146 water bath. The cooled water bath consisted on a plastic container filled with water up to  
147 half of the bottles, which were placed in a horizontal position as the rest of the bottles not  
148 cooled. The water was renewed every so often to maintain the temperature.

149 Bottles in darkness (from here Dark-bottles) were wrapped in opaque aluminium foil  
150 and exposed to solar radiation. Control-bottles were wrapped in opaque aluminium foil and  
151 maintained at  $25 \pm 1$  °C in a cooled water bath. Each test was performed on triplicate (three  
152 bottles per treatment) and in perfectly clear sunny days of July 2012 at Plataforma Solar de  
153 Almería (South of Spain).

154 A solar energy unit,  $Q_{UV}$ , is a term commonly used to compare results under different  
 155 conditions (Fernández-Ibáñez et al. 2005). UV radiation was measured with a global UV-A  
 156 radiometer (295–385 nm, Model CUV3, Kipp & Zonen, Netherlands) on a horizontal  
 157 platform, with a typical sensibility of  $264 \mu\text{VW}^{-1} \text{m}^{-2}$ . The radiometer provides data in  
 158 terms of incident  $\text{W m}^{-2}$ , which is defined as the solar radiant energy rate incident on a  
 159 surface per unit area. UV dose ( $\text{kJ m}^{-2}$ ) is dependent on UV intensity and time, and is  
 160 given by Equation 1:

$$161 \quad \text{dose} = I \times \Delta t \quad (\text{Eq. 1})$$

162

163 where  $I$  is the average irradiation intensity,  $\text{W/m}^2$ , and  $\Delta t$  is the experimental time, in  
 164 seconds. Moreover, the inactivation kinetics can be plotted as function of cumulative  
 165 energy per unit of volume ( $Q_{UV}$ ,  $\text{kJ l}^{-1}$ ) received by the bottles, and calculated by Equation  
 166 2:

$$167 \quad Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \frac{\Delta t_n \overline{UV}_{G,n} A_r}{V_t} \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (\text{Eq. 2})$$

168 where  $Q_{uv,n}$ ,  $Q_{uv,n-1}$ , are the UV energy accumulated per unit volume ( $\text{kJ l}^{-1}$ ) at times  $n$  and  
 169  $n-1$ , respectively,  $UV_{G,n}$  is the average incident irradiation on the irradiated area,  $\Delta t_n$  is the  
 170 experimental time of sample,  $A_r$  is the illuminated area of the solar bottle ( $\text{m}^2$ ), and  $V_t$  is the  
 171 total volume of treated water (l).

172

### 173 **Viral concentration and RNA extraction**

174 Viral recovery from water samples was carried out following the principles outlined in  
 175 the recently developed standard method for virus detection in foodstuffs, included bottled  
 176 water (ISO/TS 15216-1:2013) with minor modifications. The concentration of viral  
 177 particles from each sample was performed by filtration using electro-positive charged

178 filters (Virocap filters, Scientific Methods, USA). After the adsorption to filters, the viral  
179 particles were eluted by an alkaline solution of pH = 9.5 (Beef extract 1.5%, 0.25 mol l<sup>-1</sup>  
180 glycine, Tween 80 0.1%) in a final volume of 5 ml. Then, pH was adjusted to 7.5 with 0.1  
181 mol l<sup>-1</sup> HCl and viral particles were concentrated by PEG 8000 (8%) with a vigorous  
182 stirring for 2 hours. After centrifugation at 10,000 x g for 1 hour the pellet was  
183 resuspended in 1 ml of PBS.

184 The viral RNA from each sample was extracted using a commercial kit (NucleoSpin  
185 RNA virus, Macherey-Nagel, Germany). This method is based on the guanidine  
186 thiocyanate disruption and the adsorption of RNA to silica columns. Known amounts of  
187 mengovirus clone (vMC<sub>0</sub>) (10 µl of mengovirus stock) were previously spiked to each  
188 sample as an independent nucleic acid extraction efficiency control (Costafreda et al.  
189 2006). To determine the extraction efficiency, Cycle threshold (C<sub>t</sub>) value for the  
190 Mengovirus-positive amplification control and the C<sub>t</sub> value of each sample for the  
191 Mengovirus were compared and classified as valid (>5%) or invalid (<5%). Following the  
192 ISO technical specifications, samples with a <5% extraction efficiency were re-extracted  
193 again.

194

#### 195 **Reverse transcriptase-real time PCR (RT-qPCR)**

196 RT-qPCR method was carried out according to the CEN/ISO standard method. RT-  
197 qPCR was performed on an Mx3005p QPCR System (Stratagene, USA) thermocycler,  
198 using TaqMan probes and Platinum Quantitative RT-PCR Thermoscript One-step System  
199 kit (Invitrogen, Saint Aubin, France) (25 µl final volume) with 5 µl of extracted RNA.  
200 Primer set and probe used were: 0.9 µmol l<sup>-1</sup> of reverse primer HAV240 (5'-  
201 GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3'), 0.5 µmol l<sup>-1</sup> of forward primer HAV68 (5'-  
202 TCACCGCCGTTTGCCTAG-3') and 0.45 µmol l<sup>-1</sup> of probe HAV150 (6-FAM-

203 CCTGAACCTGCAGGAATTAA-MGB) for HAV (Costafreda et al. 2006). For MNV-1,  
204 0.2  $\mu\text{mol l}^{-1}$  of reverse primer Rv-ORF1/ORF2 (5'-GCGCTGCGCCATCACTC-3'), 0.2  
205  $\mu\text{mol l}^{-1}$  of forward primer Fw-ORF1/ORF2 (5'-CACGCCACCGATCTGTTCTG-3') and  
206 0.2  $\mu\text{mol l}^{-1}$  of probe MGB-ORF1/ORF2 (6-FAM-CGCTTTGGAACAATG-MGB) (Baert  
207 et al. 2008).

208 Amplification conditions for HAV were: reverse transcription at 55 °C for 1 h,  
209 denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of amplification with a denaturation  
210 at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 1 min.  
211 Amplification conditions for MNV-1 were previously described (Baert et al. 2008) with  
212 minor modifications. Briefly, after a RT step at 45 °C for 1 h, PCR amplification was  
213 carried out with a initial denaturation at 95 °C for 5 min, and 50 cycles of amplification  
214 with a denaturation at 95 °C for 15 s and annealing-extension step at 60 °C for 1 min.

215 The presence of RT-PCR inhibitors and the determination of the RT-qPCR efficiency  
216 were tested by means of the external controls (EC) included for each reaction. Briefly, 2.5  
217  $\mu\text{l}$  of EC, containing  $10^3$  genome copies of appropriated virus (HAV or MNV-1), were  
218 mixed with 2.5  $\mu\text{l}$  of each sample extracted RNA and the  $C_t$  values of these reactions were  
219 compared with the  $C_t$  value obtained for the EC in RNA-free sterile water. Then the  
220 efficiency was classified as valid (>25 %) or invalid (<25 %). Following the ISO technical  
221 specifications, samples with <25% RT-qPCR efficiency were tested again. Negative  
222 controls containing no nucleic acid as well as positive controls were also introduced in  
223 each run. A sample displaying a  $C_t \leq 41$ , with no evidence of amplification in the negative  
224 controls, was considered as positive. Quantification was estimated by standard curves  
225 constructed with serial dilutions of HAV or MNV-1 RNA, plotting the number of genome  
226 copies against the  $C_t$ . This quantification was not corrected with the extraction or RT-  
227 qPCR efficiencies, following the recommendations of the ISO standard method.

**228 Infectivity assays**

229 The infectivity of HAV and MNV-1 remaining in water samples at the end of each  
230 experimental period was evaluated in confluent FRhK-4 cells for HAV and RAW 267.4 for  
231 MNV-1 in 48-well cell culture plates. Assays were performed using 100  $\mu\text{l}$  of water  
232 samples per well. Once inoculated, plates were incubated 1 hour at 37 °C with slow  
233 agitation to promote virus attachment and internalization. After this period, the cells were  
234 washed with PBS (pH 7.4) and maintenance medium was added to each well. Maintenance  
235 medium consisted on DMEM supplemented with 2 % foetal bovine serum, 1X non-  
236 essential amino acids, 2 mmol  $\text{l}^{-1}$  L-glutamine and 100 UI- 100 UI  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Penicillin-  
237 Streptomycin (Lonza-BioWhittaker<sup>®</sup>, Belgium). The plates were then incubated at 37 °C  
238 and 5% of  $\text{CO}_2$  and microscopically examined daily for cytopathic effect (CPE) during 21  
239 days. Negative samples were subjected to a blind passage to avoid false negative results.  
240 Appropriate negative and positive controls were included. Negative controls consist on  
241 FRhK-4 or RAW 267.4 cells inoculated with sterile water filtered and subjected to the  
242 same conditions than the samples. Positive controls consist on the appropriate cell line  
243 inoculated with HAV or MNV-1 stock solution.

244

**245 Statistical analysis**

246 One-way ANOVA analysis was performed to compare the differences in the percentage  
247 of viral elimination obtained between viruses and exposure conditions. Moreover, *post-hoc*  
248 tests were employed to determine the statistical significance of the viral reduction between  
249 each exposure conditions using the Tukey's and Dunnett's tests. Significance level was  
250 established at  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using the SPSS v20.0.0  
251 software statistical package (IBM Corp., Madrid, Spain).

252

**253 Results**

254 The maximum local noon UV irradiances recorded for HAV and MNV-1 experiments  
255 were  $35.4 \text{ W m}^{-2}$  and  $38.2 \text{ W m}^{-2}$ , respectively (Figure 1). The accumulated UV dose and  
256  $Q_{UV}$  at the end of the exposure period were  $820.692 \text{ kJ m}^{-2}$  and  $19.9 \text{ kJ l}^{-1}$  for HAV, and  
257  $834.876 \text{ kJ m}^{-2}$  and  $20.24 \text{ kJ l}^{-1}$  for MNV-1 (Figure 2). The average water temperature  
258 profiles reached in bottles along the exposure time for HAV and MNV-1 experiments are  
259 shown in Figure 1. Maximum water temperatures recorded within the PET bottles in HAV  
260 trials were  $38.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in SODIS-bottles,  $37.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Dark-bottles,  $29.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Bath-bottles and  
261  $27.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Control-bottles. In MNV-1 trials, the maximum water temperatures reached  
262 were:  $40.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in SODIS-bottles,  $39.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Dark-bottles,  $30.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in Bath-bottles and  $27.8$   
263  $^{\circ}\text{C}$  in Control-bottles.

264 All samples yield valid extraction and RT-qPCR efficiency values. Extraction values  
265 ranged from 20 to 100% for HAV and from 26 to 100% for MNV-1. RT-qPCR efficiencies  
266 ranged from 52 to 100% for HAV and from 43 to 100% for MNV-1.

267 The average viral quantification at initial time (0 h of solar exposure) was  $4.0 (\pm 0.56)$   
268  $\times 10^4$  and  $5.91 (\pm 0.59) \times 10^4 \text{ RNAc } 100 \text{ ml}^{-1}$  for HAV and MNV-1, respectively. After 8h of  
269 solar exposure, average quantification values in SODIS bottles were  $3.15 (\pm 0.69) \times 10^3$  and  
270  $9.24 (\pm 3.91) \times 10^3 \text{ RNAc } 100 \text{ ml}^{-1}$  for HAV and MNV-1, respectively. These values  
271 represent an average decrease of 92.1% (1.1 log) for HAV (Table 1) and 84.4% (0.81 log)  
272 for MNV-1 (Table 2). The average decreases for Bath-, Dark- and Control-bottles were  
273 85.1% (0.83 log), 36.7% (0.20 log) and 17.4% (0.08 log) for HAV; and 61.6% (0.42 log),  
274 37.4% (0.20 log) and 10.3% (0.05 log) for MNV-1 (Table 1 and 2).

275 Statistical analyses did not show significant differences between HAV and MNV-1  
276 removal rates ( $P > 0.05$ ). However, statistical differences were observed between solar  
277 exposure conditions, both in HAV ( $P < 0.001$ ) and MNV-1 ( $P < 0.01$ ) trials. For HAV,

278 Dunnet's test showed significant differences with regard to the control conditions for  
279 SODIS ( $P<0.01$ ) and constant temperature conditions ( $P<0.05$ ), but no in darkness  
280 conditions. For MNV-1, all conditions showed significant differences,  $P<0.001$  for SODIS,  
281  $P<0.01$  in constant temperature conditions and  $P<0.05$  in darkness conditions. In addition,  
282 Tukey's test showed significant differences between all conditions except between SODIS  
283 and constant temperature conditions in HAV and between constant temperature and  
284 darkness conditions in MNV-1 trials.

285 With regard to infectivity assays, water samples from control-bottles and Dark-bottles  
286 maintained their infectivity capacity along the study period for both viruses. Water samples  
287 from bath-bottles showed a one third decrease (33%) in their infectivity capacity after 6  
288 and 8 h of exposure in HAV trials and after 8h in MNV-1 trials. Bottles exposed to SODIS  
289 conditions showed a decrease in the infectivity capacity of their water samples after 4 h  
290 (33% of infectivity decrease), 6 h and 8 h (66% of infectivity decrease) in HAV trials, and  
291 after 6 h (33%) and 8 h (66%) in MNV-1 trials (Table 3). In addition, a delay in the  
292 appearance of the CPE from 2-3 days to ~6 days in water samples from bath-bottles (after  
293 8 h of exposure) and SODIS-bottles (after 4, 6 and 8 h of exposure) was observed (data not  
294 shown).

295

## 296 **Discussion**

297 The aim of this study was to obtain a preliminary picture of the water disinfection for  
298 HAV and MNV-1 by SODIS method. To our knowledge, this is the first study that  
299 evaluates and compares by RT-qPCR the efficacy of this method to eliminate HAV and  
300 MNV-1 under natural solar conditions. The procedures employed involved the inclusion of  
301 reliable controls of RNA extraction and amplification steps. Results showed that extraction  
302 and RT-qPCR efficiencies did not showed important variations between HAV and MNV-1,

303 making data consistent and suitable for quantification.

304 SODIS is recommended to be practiced in regions with  $>500 \text{ W}\times\text{m}^2$  of global sunlight  
305 irradiance during 3-5 hour (EAWAG 2008). Here, global sunlight irradiance values  
306 between 800 and 1,000  $\text{W}\times\text{m}^2$  were recorded during 3-4 h (data not shown). A strong  
307 synergistic effect was described between optical and thermal processes at temperatures  
308 above 45 °C (Wegelin et al. 1994; McGuigan et al. 1998). However, the maximum  
309 temperatures reached in SODIS bottles were between 38 and 40 °C. In addition, at least 4 h  
310 were necessary to reach the temperatures between 35-40 °C from the beginning of the  
311 exposure. This is an important fact since, as it was also previously suggested (Boyle et al.  
312 2008) may be a cause of the disparity between simulated and natural sunlight results.

313 Results showed a significant reduction in RNA levels after 8 h under SODIS conditions  
314 (1.1 log units for HAV and 0.81 log units for MNV-1) although final RNA counts  
315 remained relatively high ( $\sim 10^4 \text{ RNAc } 100 \text{ ml}^{-1}$ ). In addition, infectivity assays reflected an  
316 absence of CPE in some water samples from bottles in SODIS conditions 4 h after the  
317 beginning of the exposure (Table 3). Harding and Schwab (2012) reported 0.4 log and 1.4  
318 log reduction in infectious MNV by plaque assay after a 2.5 and 6 hour of SODIS,  
319 respectively. They also reported better reductions in MS2 than MNV, suggesting that  
320 MNV is highly resistant to damage by SODIS. Here, RNA removal rate and infectivity  
321 assays seem to indicate a higher resistance of MNV-1 than HAV, but without statistical  
322 differences.

323 SODIS principle relies on the action of the solar UV radiation and the water  
324 temperature. The comparison between exposure conditions suggests a greater importance  
325 of sunlight radiation over the temperature as a principal factor of viral reduction. Previous  
326 studies reported that high temperatures have a major effect on viral capsids proteins but  
327 limited effect on the viral genome (Nuanualsuwan and Cliver 2003; Baert et al. 2008;

328 Hewitt et al. 2009). Wolf et al. (2009) reported that heat inactivation at 72 °C has limited  
329 effect on RT-qPCR MNV-1 titres. In addition, it was reported a synergistic effect between  
330 heating and UV inactivation over 45 °C which leads to improved disinfection (Wegelin et  
331 al. 1994; McGuigan et al. 1998) Although these temperatures never were reached in this  
332 study, better results were achieved with the combination of radiation and heat. García-  
333 Fernández et al. (2014), studied the effect of controlled temperature over *Escherichia coli*  
334 cells and *Fusarium solani* spores in a photocatalytic wastewater disinfection under natural  
335 sunlight in 60 l CPC reactor obtaining better results as temperature increasing from 15 to  
336 45 °C. Wegelin et al. (1994), reported similar results with other viruses at comparable  
337 temperatures (<40 °C).

338 Viral inactivation by heat relies basically in the loss of ability to bind with its host cell,  
339 by structural changes in the viral capsid proteins that disrupt the specific structures needed  
340 to recognize and bind the host cells (Nuanualsuwan and Cliver 2003; Wigginton et al.  
341 2012). Nevertheless, in this study, water samples from bottles maintained in darkness  
342 retained its infectivity capacity. Although high temperatures clearly denature capsids, the  
343 natural mode of indirect transmission of enteric viruses like HAV and NoV confers high  
344 stability in harsh environments outside the host's body, including food and water at  
345 physiological temperatures as recorded here.

346 On the other hand, UV radiation seems to be crucial in this study for viral reduction.  
347 The mechanisms involved in viral inactivation may be either by direct UV damage on viral  
348 components, by indirect damage by reactive intermediates, like ROS, or both (Silverman et  
349 al. 2013). The main components of non-enveloped viruses (proteins and nucleic acids) do  
350 not absorb light at wavelengths >320 nm, so direct damage mechanisms are conducted by  
351 UV-B light portion. The ROS mechanism, on the other hand, is initiated by UV-A light  
352 (Kawanishi et al. 2001). ROS mechanism was the major destroying viral capsid, as  $\cdot\text{OH}$

353 have a high reactivity and the oxidative action alters membrane permeability reacting and  
354 oxidising capsid proteins, therefore diffusion of viral components to the medium occur,  
355 ending in viral inactivation.

356 It was reported that, although certain modifications in viral proteins can occur, exposure  
357 to UV irradiation and ROS damages by  $^1\text{O}_2$  seems to be a more strong-genome damage  
358 component, since transforms RNA itself by dimers or RNA–RNA and RNA–protein cross-  
359 links (Wigginton et al. 2013). This suggests that RT-qPCR amplification loss by UV  
360 genome damages could be an appropriate proxy for SODIS evaluations in certain  
361 conditions, like low or middle temperatures, when damages to viral capsids are minimal.  
362 However, it is important to take into account that other genome damages outside the  
363 amplification regions can be underestimated. In this sense, long range RT-qPCR could be a  
364 useful solution (Wolf et al. 2009).

365 From a viral perspective, subtle differences in viral genome and capsid composition  
366 affect disinfection kinetics and mechanisms between closely related viruses (Sigstam et al.  
367 2013). Differences in nucleic acid type (single- or double-stranded DNA or RNA), genome  
368 length and structure (longer genomes offer more targets for attack) and composition (% of  
369 adjacent pyrimidines or content of guanines, the most easily oxidized base) could account  
370 for the variability in direct and indirect sunlight damages and inactivation rates (Kawanishi  
371 et al. 2001; Lytle and Sagripanti et al. 2005; Sigstam et al. 2013). HAV HM-175 (GenBank  
372 accession n° M14707.1) and MNV-1 (GenBank accession n° AY228235.2) have similar  
373 genome lengths (7478 and 7382 bases, respectively) and with a similar % of pyrimidine  
374 bases (51 and 48 %, respectively) but with different base composition (HAV 32.9% U;  
375 16.1% C; 29.3% A; 21.8% G and MNV-1 22.2% U; 28.9 C; 21.1% A; 27.8 G). How these  
376 differences in genomic composition could affect to the disinfection rates remains unclear  
377 and future research is needed in this sense.

378 SODIS is an appropriate, effective and acceptable intervention against many waterborne  
379 diarrheal diseases. Viral disinfection rates seem to be relatively lower, in comparison with  
380 bacterial rates reported in other studies and longer exposure periods appear to be required.  
381 ROS cause damage to cells by direct attack to the external cell membrane by initiating  
382 lipid peroxidation chain reactions, this leads to a loss of viability (García-Fernández et al.  
383 2012). Insomuch as for total microbial inactivation the first point of attack is cell wall, and  
384 once damaged by ROS generated in the process, death occur easily. In this case the outer  
385 layer is a strong and resistant protein capsid. It could be the critical point in viral  
386 disinfection. However, results reported here point out that SODIS could also contribute to  
387 reduce the risk of infection from a viral point of view, supporting its use as an emergency  
388 intervention for vulnerable communities. Further research is required to determinate the  
389 efficacy and limits of the SODIS method to eliminate different viruses and in different  
390 conditions.

391

392

### 393 **Acknowledgements**

394 This work was supported in part by Grants of the Ministerio de Ciencia e Innovación  
395 (Spain) for financing stays at the PSA (by DP and JLR). Authors wish to thank the  
396 European Commission funds under SFERA program (Solar Facilities for the European  
397 Research Area, EC Grant agreement no. 228296).

398

399 **References**

- 400 Acra, A., Jurdi, M., Mu'Allem, H., Karahagopian, Y. and Raffoul, Z. (1989) Sunlight as  
401 disinfectant. *Lancet* **1**, 280.
- 402 Argulló-Barceló, M., Polo-López, M.I., Lucena, F., Jofre, J. and Fernández-Ibáñez, P.  
403 (2013) Solar advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real  
404 wastewater: implications for water reclamation. *Appl Catal B: Environ* **136-137**, 341–  
405 350.
- 406 Atmar, R.L. and Estes, M.K. (2006) The epidemiologic and clinical importance of  
407 norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* **35**, 275–290.
- 408 Bae, J. and Schwab, K.J. (2008) Evaluation of Murine Norovirus, feline Calicivirus,  
409 poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence  
410 in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol* **74**, 477–484.
- 411 Baert, L., Wobus, C.E., Van Coillie, E., Thackray, L.B., Debevere, J. and Uyttendaele, M.  
412 (2008) Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and  
413 real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ*  
414 *Microbiol* **74**, 543–546.
- 415 Bosch, A. (1998) Human enteric viruses in the water environment: A minireview. *Int*  
416 *Microbiol* **1**, 191–196.
- 417 Boschi-Pinto, C., Velebit, L. and Shibuya, K. (2008) Estimating child mortality due to  
418 diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ* **86**, 710–717.
- 419 Boyle, M., Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., Arias-Quiroz, G.B., Iriarte-Puña, M.,  
420 Ubomba-Jaswa, E. and McGuigan, K.G. (2008) Bactericidal effect of solar water  
421 disinfection under real sunlight conditions. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2997–3001.
- 422
- 423

- 424 Clasen, T., Cairncross, S., Haller, L., Bartram, J. and Walker, D. (2007) Cost-effectiveness  
425 of water quality interventions for preventing diarrhoeal disease in developing  
426 countries. *J Water Health* **5**, 599–608.
- 427 Conroy, R.M., Elmore-Meegan, M., Joyce, T., McGuigan, K.G. and Barnes, J. (1999)  
428 Solar disinfection of water reduces diarrhoeal disease: An update. *Arch Dis Child* **81**,  
429 337–338.
- 430 Costafreda, M.I., Bosch, A. and Pintó, R.M. (2006) Development, evaluation, and  
431 standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for  
432 quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ*  
433 *Microbiol* **72**, 3846–3855.
- 434 du Preez, M., Conroy, R.M., Ligondo, S., Hennessy, J., Elmore-Meegan, M., Soita, A. and  
435 McGuigan, K.G. (2011) Solar disinfection of drinking water (SODIS) in the  
436 prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years. *Environ Sci Technol*  
437 **45**, 9315–9323.
- 438 EAWAG. (2008) Solar water disinfection: the method. <http://www.sodis.ch/Text2002/T->  
439 [TheMethod.html](http://www.sodis.ch/Text2002/T-TheMethod.html).
- 440 Eisenstark, A. (1987) Mutagenic and lethal effects of near-ultraviolet radiation (290-  
441 400nm) on bacteria and phage. *Environ Mol Mutagen* **10**, 317–337.
- 442 Fernández-Ibáñez, P., Blanco, J., Sichel, C. and Malato, S. (2009) Water disinfection by  
443 solar photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catal Today* **101**, 345–352.
- 444 Fewtrell, L. and Bartram, J. (2001) *Water quality: guidelines, standards and health.*  
445 *Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease.* IWA  
446 Publishing, London.
- 447
- 448

- 449 Fewtrell, L., Kaufmann, R., Kay, D., Enanoria, W., Haller, L. and Colford, J. (2005)  
450 Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed  
451 countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **5**, 42–52.
- 452 García-Fernández, I., Fernández-Calderero, I., Polo-López, I. and Fernández-Ibáñez, P.  
453 (2014) Disinfection of urban effluents using solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis: a study of  
454 significance of dissolved oxygen, temperature, type of microorganism and water  
455 matrix. *Catal Today*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.03.026>.
- 456 García-Fernández, I., Polo-López, M.I., Oller, I. and Fernández-Ibáñez, P. (2012) Bacterial  
457 and fungi inactivation using Fe<sup>+3</sup>/sunlight, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight and near neutral photo-  
458 Fenton: a comparative study. *Appl Catal B: Environ* **121-122**, 20–29.
- 459 Gómez-Couso, H., Fontán-Saínez, M., Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P. and Ares-Mazás, E.  
460 (2009) Efficacy of the solar water disinfection method in turbid waters experimentally  
461 contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under real field conditions. *Trop*  
462 *Med Int Health* **14**, 620–627.
- 463 Goodsell, D.S. (2001) The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine  
464 dimmers. *Oncologist* **6**, 298–299.
- 465 Harding, A.S. and Schwab, K.J. (2012) Using limes and synthetic psoralens to enhance  
466 solar disinfection of water (SODIS): a laboratory evaluation with norovirus,  
467 *Escherichia coli*, and MS2. *Am J Trop Med Hyg* **86**, 566–572.
- 468 Heaselgrave, W., Patel, N., Kehoe, S.C., Kilvington, S. and McGuigan, K.G. (2006) Solar  
469 disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water – a laboratory  
470 study using simulated sunlight. *Lett Appl Microbiol* **43**, 125–130.
- 471 Hewitt, J., Rivera-Aban, M. and Greening, G.E. (2009) Evaluation of murine norovirus as  
472 a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J*  
473 *Appl Microbiol* **107**, 65–71.

- 474 Jagger, J. (1981) Near-UV radiation effects on microorganisms. *Photochem Photobiol* **34**,  
475 761–768.
- 476 Kawanishi, S., Hiraku, Y. and Oikawa, S. (2001) Mechanism of guanine-specific DNA  
477 damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* **488**,  
478 65–76.
- 479 Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S.C., Al-Touati, F. and McGuigan, K.G. (2005) Solar  
480 and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in  
481 drinking water. *Water Res* **39**, 877–883.
- 482 Love, D.C., Silverman, A. and Nelson, K.L. (2010) Human virus and bacteriophage  
483 inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage  
484 inactivation at a Southern California beach. *Environ Sci Technol* **44**, 6965–6970.
- 485 Lytle, C.D. and Sagripanti, J.L. (2005) Predicted inactivation of viruses of relevance to  
486 biodefense by solar radiation. *J Virol* **79**, 14244–14252.
- 487 Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Bláncorn J. and Gernjak, W. (2009)  
488 Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview  
489 and trends. *Catal Today* **147**, 1–59.
- 490 McGuigan, K.G., Conroy, R.M., Mosler, H.J., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E. and  
491 Fernandez-Ibáñez, P. (2012) Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-  
492 top to roof-top. *J Hazard Mater* **235–236**, 29–46.
- 493 McGuigan, K.G., Joyce, T.M., Conroy, R.M., Gillespie, J.B. and Elmore-Meegan, M.  
494 (1998) Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles:  
495 characterizing the bacterial inactivation process. *J Appl Microbiol* **84**, 1138–1148.
- 496 Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O. (2003) Capsid functions of inactivated human  
497 picornaviruses and feline caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* **69**, 350–357.
- 498

- 499 Reed, R.H., Mani, S.K. and Meyer, V. (2000) Solar photo-oxidative disinfection of  
500 drinking water: preliminary field observations. *Lett Appl Microbiol* **30**, 432–436.
- 501 Sichel, C., Tello, J., de Cara, M. and Fernandez-Ibañez, P. (2007) Effect of UV solar  
502 intensity and dose on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi. *Catal*  
503 *Today* **129**, 152–160.
- 504 Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B.M., Wigginton, K.R. and Kohn, T.  
505 (2013) Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and  
506 mechanisms. *Appl Environ Microbiol* **79**, 3455–3467.
- 507 Silverman, A.I., Peterson, B.M., Boehm, A.B., McNeill, K. and Nelson, K.L. (2013)  
508 Sunlight inactivation of human viruses and bacteriophages in coastal waters containing  
509 natural photosensitizers. *Environ Sci Technol* **47**, 1870–1878.
- 510 Sinha, R.P. and Hader, D.P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review.  
511 *Photochem Photobiol Sci* **1**, 225–236.
- 512 Sommer, B., Mariño, A., Solarte, Y., Salas, M.L., Dierolf, C., Valiente, C., Mora, D.,  
513 Rechsteiner, R., Setter, P., Wirojanagud, W., Ajarmeh, H., Al-Hassan, A. and  
514 Wegelin, M. (1997) SODIS - an emerging water treatment process. *J Water SRT –*  
515 *Aqua* **46**, 127–137.
- 516 United Nations (UN). (2013) *The Millennium Development Goals Report*. United Nations,  
517 New York.
- 518 Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F. and Metzler, A.  
519 (1994) Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation  
520 experiments. *J Water SRT – Aqua* **43**, 154–169.
- 521 Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F. and Khon, T. (2012) Virus  
522 inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural  
523 integrity. *Environ Sci Technol* **46**, 12069–12078.

- 524 Wobus, C.E., Thackray, L.B. and Virgin, H.W. (2006) Murine norovirus: a model system  
525 to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* **80**, 5104–5112.
- 526 Wolf, S., Rivera-Aban, M. and Greening, G.E. (2009) Long-range reverse transcription as  
527 a useful tool to assess the genomic integrity of Norovirus. *Food Environ Virol* **1**, 129–  
528 136.
- 529

530

531 Table 1. Quantification data of HAV expressed as viral RNA copies 100 ml<sup>-1</sup> for each  
 532 solar exposure condition along the study period (t). Each data corresponds to the geometric  
 533 mean of three replicates. Standard deviation is shown in brackets. \*, Percentage (and log  
 534 units) of total viral removal.

535

HAV t	RNA copies 100 ml <sup>-1</sup>			
	SODIS	Bath	Dark	Control
0h	4.00 (±0.56)×10 <sup>4</sup>	4.00 (±0.56)×10 <sup>4</sup>	4.00 (±0.56)×10 <sup>4</sup>	4.00 (±0.56)×10 <sup>4</sup>
2h	1.27 (±0.41)×10 <sup>4</sup>	1.66 (±1.74)×10 <sup>4</sup>	3.70 (±3.77)×10 <sup>4</sup>	3.64 (±0.21)×10 <sup>4</sup>
4h	3.27 (±0.75)×10 <sup>3</sup>	1.28 (±3.10)×10 <sup>4</sup>	3.18 (±1.92)×10 <sup>4</sup>	4.00 (±1.21)×10 <sup>4</sup>
6h	2.65 (±0.31)×10 <sup>3</sup>	7.30 (±1.78)×10 <sup>3</sup>	2.58 (±6.23)×10 <sup>4</sup>	3.97 (±1.40)×10 <sup>4</sup>
8h	3.15 (±0.69)×10 <sup>3</sup>	5.97 (±0.11)×10 <sup>3</sup>	2.53 (±3.79)×10 <sup>4</sup>	3.30 (±0.43)×10 <sup>4</sup>
%r*	92.1 (1.1 Log)	85.1 (0.83 Log)	36.7 (0.20 Log)	17.4 (0.08 Log)

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548 Table 2. Quantification data of MNV-1 expressed as viral RNA copies  $100\text{ ml}^{-1}$  for each  
 549 solar exposure condition along the study period (t). Each data is the geometric mean of  
 550 three replicas. Standard deviation is shown in brackets. \*, Percentage (and log units in  
 551 brackets) of total viral removal.

MNV-1 t	RNA copies $100\text{ ml}^{-1}$			
	SODIS	Bath	Dark	Control
0h	$5.91 (\pm 0.59) \times 10^4$	$5.91 (\pm 0.59) \times 10^4$	$5.91 (\pm 0.59) \times 10^4$	$5.91 (\pm 0.59) \times 10^4$
2h	$2.52 (\pm 3.20) \times 10^4$	$4.52 (\pm 0.72) \times 10^4$	$4.73 (\pm 0.60) \times 10^4$	$5.58 (\pm 0.71) \times 10^4$
4h	$1.68 (\pm 3.01) \times 10^4$	$4.06 (\pm 0.40) \times 10^4$	$4.21 (\pm 0.43) \times 10^4$	$5.91 (\pm 0.21) \times 10^4$
6h	$1.88 (\pm 2.07) \times 10^4$	$3.36 (\pm 0.50) \times 10^4$	$4.85 (\pm 0.51) \times 10^4$	$5.85 (\pm 0.51) \times 10^4$
8h	$9.24 (\pm 3.91) \times 10^3$	$2.27 (\pm 3.92) \times 10^4$	$3.70 (\pm 0.33) \times 10^4$	$5.30 (\pm 0.41) \times 10^4$
% r*	84.4 (0.81 Log)	61.6 (0.42 Log)	37.4 (0.20 Log)	10.3 (0.05 Log)

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564 Table 3. Infectivity assays carried out with HAV and MNV-1. Results are expressed as  
 565 bottles that showed infectivity/total bottles.

Treatment	HAV					MNV-1				
	Solar exposed for					Solar exposed for				
	0h	2h	4h	6h	8h	0h	2h	4h	6h	8h
Control	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Dark		3/3	3/3	3/3	3/3		3/3	3/3	3/3	3/3
Bath		3/3	3/3	2/3	2/3		3/3	3/3	3/3	2/3
SODIS		3/3	2/3	1/3	1/3		3/3	3/3	2/3	1/3

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

### Figure legends

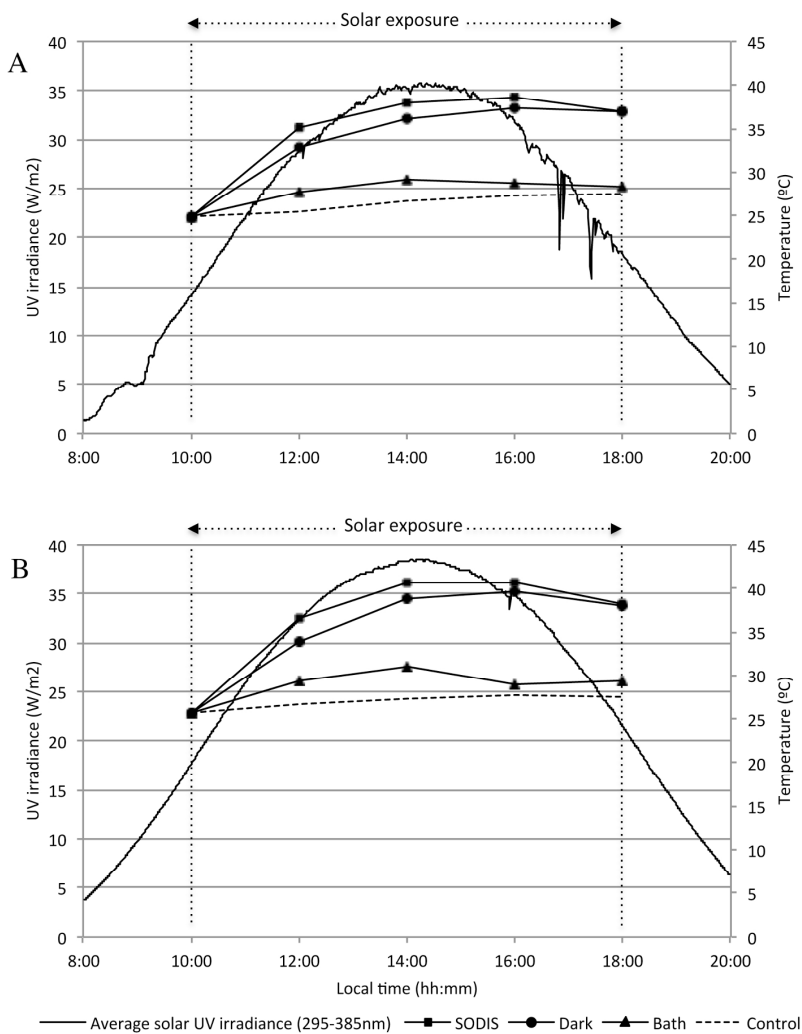
582

583 **Figure 1.** Average solar UV irradiance (295-385 nm) along the solar exposure period and  
584 profiles of the mean water temperatures recorded in bottles for each exposure condition  
585 performed with HAV (A) and MNV-1 (B).

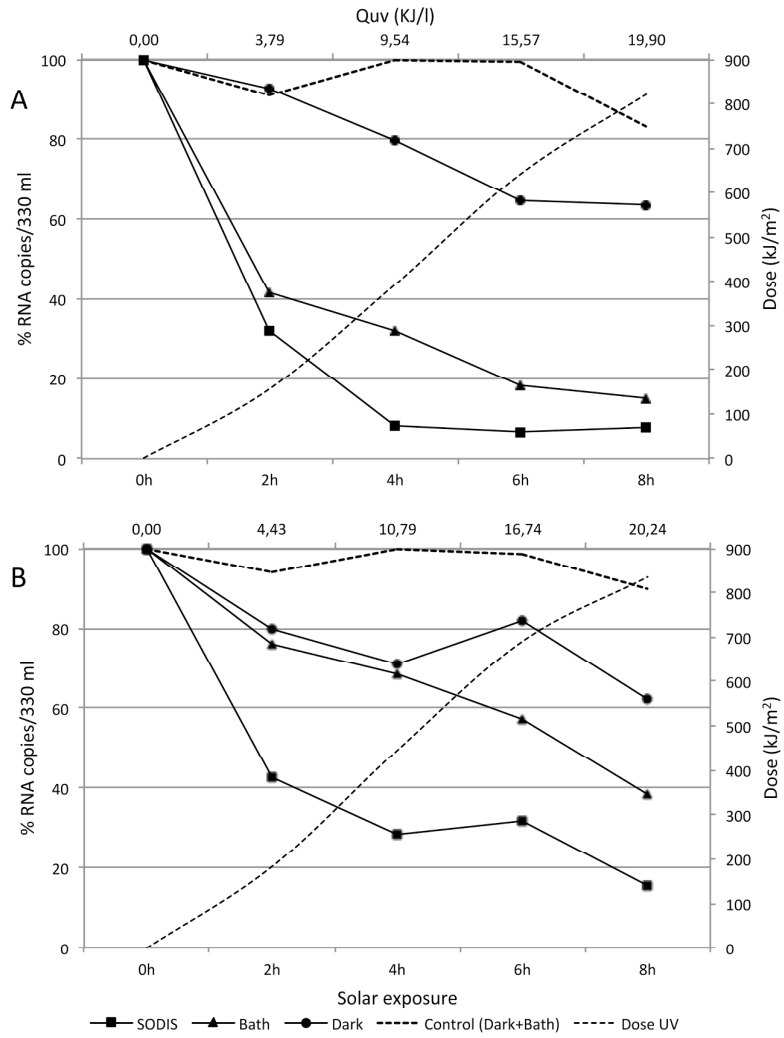
586

587 **Figure 2.** HAV (A) and MNV-1 (B) RNA removal expressed as % RNA copies  $100 \text{ ml}^{-1}$   
588 along the exposure time (2, 4, 6 and 8h). Solar UV dose ( $\text{W m}^{-2}$ ) and cumulative UV  
589 radiation ( $Q_{UV}$ ,  $\text{kJ l}^{-1}$ ) are also shown in secondary axis.

590



162x208mm (300 x 300 DPI)



194x214mm (300 x 300 DPI)



**Artículo 2: Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under natural solar conditions.**

Polo, D., García-Fernández, I., Fernández-Ibáñez, P., & Romalde, J.L.

**Environment International.** (Enviado).

Índice de impacto 2013: 5,664 Q1 (7/215) en Environmental Sciences

## RESUMEN

En este estudio se evalúa y compara la eficacia de tres tratamientos: la radiación solar (SODIS), Fenton y foto-Fenton para la inactivación del virus de hepatitis A (HAV) y norovirus Murino-1 (MNV-1) en agua destilada. Los experimentos, desarrollados en Octubre, se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 200 mL, contaminadas con una concentración inicial de virus de  $10^5$  pfu/mL. Las botellas se mantuvieron expuestas a la acción de la radiación solar durante 6h y en constante agitación. En los sistemas foto-Fenton, se evaluaron diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (2,5/5, 5/10 y 10/20 mg/L). La cinética de desinfección se determinó mediante RT-PCR en tiempo real y ensayos de infectividad. La temperatura media del agua osciló entre 25 y 27,3 °C. La reducción viral fue insignificante en los ensayos bajo condiciones Fenton, y sólo se consiguió una desinfección parcial bajo condiciones de SODIS (0,25 y 0,29 Log para HAV y MNV-1, respectivamente). Los ensayos realizados empleando sistemas foto-Fenton aumentaron significativamente el poder de desinfección. Las tasas medias de reducción de RNA fueron de ~ 1,8 Log en el caso de HAV (con una radiación UV de 19,1 kJ/L) y 1,1 Log en el caso de MNV-1 (radiación UV de 14,9 kJ/L). Además, la capacidad infectiva de HAV y MNV-1 se redujo en un 80 y 40%, respectivamente, utilizando 10/20 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (a pH libre entre 6.3 y 3.6). Los resultados mostraron un fuerte efecto sinérgico entre el  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  y la luz solar, y demostraron que mediante sistemas foto-Fenton se pueden conseguir tasas de desinfección significativas para HAV y MNV-1 con una eficiencia relativamente alta a temperaturas ambientales medias y sin una fuente de luz intensa.



Elsevier Editorial System(tm) for Environment International  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Hepatitis A virus and norovirus disinfection by solar photo-Fenton systems under natural solar conditions

Article Type: Research Paper

Keywords: Photo-Fenton; Hepatitis A virus; Murine norovirus; water disinfection

Corresponding Author: Prof. Jesus L. Romalde, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad de Santiago de Compostela

First Author: David Polo, M. Sc.

Order of Authors: David Polo, M. Sc.; Irene Gracia-Fernández, M. Sc.; Pilar Fernández-Ibáñez, Ph.D.; Jesus L. Romalde, Ph.D.

**Abstract:** This study evaluates and compares the effectiveness of three treatments: solar radiation (SODIS), Fenton and photo-Fenton systems for the inactivation of hepatitis A virus (HAV) and Murine norovirus-1 (MNV-1) in water. Experiments were carried out in stirred glass bottle reactors (initial concentration of 105 plaque forming units per mL [pfu/mL]) during 6 h. In photo-Fenton systems, different concentrations of Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5/5, 5/10 and 10/20 mg/L) were tested. Disinfection kinetics were determined by RT-real time PCR (RT-qPCR) and infectivity assays. Average water temperatures ranged from 25 to 27.3 °C. Negligible viral reduction was achieved in Fenton systems, and only partial disinfection (0.25 and 0.29 Log-units for HAV and MNV-1, respectively) under SODIS conditions was achieved. Photo-Fenton systems significantly increased the disinfection power. Average RNA reduction rates of ~1.8 Log-units for HAV (UV irradiance 19.1 kJ/L) and 1.1 Log-units for MNV-1 (UV irradiance 14.9 kJ/L) were observed. Moreover, infectivity capacities of HAV and MNV-1 were reduced in 80 and 40 % respectively, under conditions of 10/20 mg/L of Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (at free pH between 6.3 and 3.6). Results showed a synergistic effect between Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and sunlight and demonstrated that significant disinfection rates of HAV and MNV-1 by photo-Fenton systems may occur with relatively high efficiency at middle environmental temperatures and without an intensive energy-light source requirement.



26 **Abstract**

27 This study evaluates and compares the effectiveness of three treatments: solar  
28 radiation (SODIS), Fenton and photo-Fenton systems for the inactivation of hepatitis A  
29 virus (HAV) and Murine norovirus-1 (MNV-1) in water. Experiments were carried out in  
30 stirred glass bottle reactors (initial concentration of  $10^5$  plaque forming units per mL  
31 [pfu/mL]) during 6 h. In photo-Fenton systems, different concentrations of  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$   
32 (2.5/5, 5/10 and 10/20 mg/L) were tested. Disinfection kinetics were determined by RT-  
33 real time PCR (RT-qPCR) and infectivity assays. Average water temperatures ranged from  
34 25 to 27.3 °C. Negligible viral reduction was achieved in Fenton systems, and only partial  
35 disinfection (0.25 and 0.29 Log-units for HAV and MNV-1, respectively) under SODIS  
36 conditions was achieved. Photo-Fenton systems significantly increased the disinfection  
37 power. Average RNA reduction rates of ~1.8 Log-units for HAV (UV irradiance 19.1  
38 kJ/L) and 1.1 Log-units for MNV-1 (UV irradiance 14.9 kJ/L) were observed. Moreover,  
39 infectivity capacities of HAV and MNV-1 were reduced in 80 and 40 % respectively,  
40 under conditions of 10/20 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  (at free pH between 6.3 and 3.6). Results  
41 showed a synergistic effect between  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  and sunlight and demonstrated that  
42 significant disinfection rates of HAV and MNV-1 by photo-Fenton systems may occur  
43 with relatively high efficiency at middle environmental temperatures and without an  
44 intensive energy-light source requirement.

45

46

47

48 **Keywords:** photo-Fenton, Hepatitis A virus, Murine norovirus, water disinfection

49

50

51 **1. Introduction**

52 Water scarcity is one of the main problems to be faced by human societies in this  
53 century. The growth of population and industrialization are increasing demand pressures  
54 on local and regional water supplies required for domestic purposes, irrigation and  
55 industrial uses. In addition, climate change is creating new uncertainties in freshwater  
56 supplies and future demands (UN 2013). The lack of access to adequately treated drinking  
57 water and sanitation in developing countries continue to be the most important issue to  
58 reduce morbidity and mortality due to diarrheic and gastrointestinal diseases (Boschi-Pinto  
59 et al.2008; Fewtrell et al., 2005). Agriculture purposes, including irrigation, constitute the  
60 greatest pressure on freshwater resources (WWAP 2012) and, therefore, disinfection and  
61 water recycling are also critical issues. In arid regions and developing countries (75% of  
62 the global irrigated land) reuse of raw, partially treated or diluted sewage to irrigate crops  
63 is a common practice as a livelihood reality or water scarce situations (Jiménez et al.,  
64 2010). Besides the consumption of untreated or improperly treated water, irrigation of food  
65 crops with wastewater or fecal contaminated water plays a role in the worldwide  
66 transmission of enteric pathogens, as a result of the globalized market (Cheong et al., 2009;  
67 Gerba and Choi, 2006; Sivapalasingam et al., 2004). This has led to investigate new  
68 alternative environmentally sustainable and low-cost water disinfection technologies to  
69 guarantee the proper microbial water safety, to decrease the pressure on freshwater  
70 resources and to increase water supply in water-scarce and semi-arid zones.

71 Advanced oxidation processes (AOPs) have been recently considered as promising  
72 treatments for water disinfection (Malato et al., 2009). Although AOPs can use different  
73 reacting systems, all of them are based on the physicochemical generation of powerful *in*  
74 *situ* transitory species, principally hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), highly efficient in organic  
75 matter oxidation. Among different AOPs, homogeneous Fenton and photo-Fenton

76 processes have attracted great interest in the field of solar water disinfection (Malato et al.,  
77 2009). Homogeneous Fenton process is based on the formation of  $\cdot\text{OH}$  when, in absence of  
78 a light, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) is decomposed by  $\text{Fe}^{2+}$  ions present in the aqueous (aq)  
79 phase (Chong et al., 2010; Pignatello et al., 2006):



83 In presence of UV-vis irradiation wavelengths of up to 600 nm, the reaction is enhanced  
84 compared with dark conditions due to the additional production of  $\cdot\text{OH}$  (Mailhot et al.,  
85 2002):



87 This occurs by the efficient photo-reduction of the main dissolved  $\text{Fe}^{3+}$  species, the  
88 aquacomplex of  $\text{Fe}^{3+}$ , mainly  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ , to  $\text{Fe}^{2+}$  that close the photo-catalytic cycle, reset  
89 the Fenton reaction and lead to continuous  $\cdot\text{OH}$  generation while eliminating the need for  
90 further addition of iron (Pignatello et al., 2006). The photo-Fenton process is affected by  
91 the pH, the amount of dissolved iron,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, temperature, irradiance and the  
92 presence of other ions (Chong et al., 2010; Malato et al., 2009).

93 The ability of homogeneous photo-Fenton to remove certain microorganisms, including  
94 bacteria, fungi and protozoa, in water and wastewater has been demonstrated (Argulló-  
95 Barceló et al., 2013; García-Fernández et al., 2012; Ortega-Gómez et al., 2012; Polo-López  
96 et al., 2012; Spuhler et al., 2010). However, studies evaluating the efficacy of this process  
97 against virus remain scarce and restricted to some indicator viruses, like bacteriophages,  
98 and using UV lamps and simulated sunlight (Nieto-Juarez et al., 2010), and also using  
99 concentrated solar light (Argulló-Barceló et al., 2013).

100 Human enteric viruses are the most common aetiological agents of food- and water-

101 borne gastroenteritis and diarrhea, remaining as a sanitary challenge both in developing  
102 and industrialized countries. From a public health perspective, Hepatitis A virus (HAV,  
103 fam. *Picornaviridae*) and Norovirus (NoV, fam. *Caliciviridae*) are the leading viral  
104 pathogens transmitted by water and food, and the main cause of acute hepatitis and  
105 gastroenteritis outbreaks worldwide (Atmar and Estes, 2006; Koff, 1998). Many outbreaks  
106 of enteric viral diseases associated with fruits, like minimally processed berries (Calder et  
107 al., 2003; Le Guyader et al., 2004; Fell et al., 2007), and raw vegetables, such as green  
108 onions, have been reported (Long et al., 2002; Wheeler et al., 2005). The contamination  
109 may occur in pre-harvest fruits and vegetables subjected to irrigation with reclaimed  
110 wastewater and/or fertilizers contaminated with sewage sludge (Croci et al., 2002; Fiore,  
111 2004), and therefore the availability of an efficient disinfection method for irrigation  
112 waters become essential.

113 The aim of this study was to comparatively evaluate the effectiveness of SODIS, Fenton  
114 and solar photo-Fenton (at free pH, which varied from 6.3 to 3.6) systems for the  
115 disinfection of HAV and murine Norovirus (MNV)(as human NoV surrogate) in water  
116 under field conditions.

## 117 **2. Experimental**

### 118 *2.1. Experimental setup*

119 Experiments were carried out on November at Plataforma Solar de Almería, Tabernas  
120 dessert (Spain) (latitude 37.09 °N, longitude 2.36 °W) in 250-mL DURAN-glass (Schott)  
121 batch stirred bottle reactors filled with 200 mL of sterile distilled water. Water was  
122 contaminated with HAV (strain HAV-175 18f) or MNV (strain MNV-1) at an initial  
123 concentration of  $10^5$  plaque forming units (pfu/mL). For photo-Fenton experiments, reactor  
124 bottles were then spiked with three  $\text{Fe}^{2+}$  concentrations (2.5, 5 and 10 mg/L) using ferrous  
125 sulphate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , PANREAC, Spain) and three  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations (5,

126 10 and 20 mg/L) at 35 wt %. pH was not adjusted in photo-Fenton experiments; it ranged  
127 from 3.6 to 6.3 depending on the different amounts of added ferrous sulphate for each  
128 experimental condition (Table 1). Experiments under SODIS conditions (reactor bottles  
129 containing HAV or MNV but not  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Fenton conditions (reactor bottles  
130 containing HAV or MNV, 10-20 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  and wrapped in aluminium foil to  
131 maintain the reactors in darkness and discriminate the effect of sunlight) and Control  
132 conditions (reactor bottles containing HAV or MNV and stored in the dark) were also  
133 performed in parallel.

134 After the first sampling (0h), the bottle-reactors were exposed to sunlight for 6 h and  
135 magnetically stirred at 100 rpm during all the period. Glass covers were used instead of  
136 plastic lids, to allow the solar radiation entering in the bottle reactor from all directions.  
137 Fenton and control experiments were treated in the same manner, exposed to  
138 environmental conditions but maintained in darkness. Samples, which consisted on 2 mL  
139 of water, were withdrawn at regular intervals of 1 h from bottle reactors. Each test was  
140 performed by triplicate and in perfectly clear sunny days.

## 141 2.2. Solar radiation

142  $Q_{UV}$ , a solar energy unit, is a term commonly used to compare results under different  
143 conditions (Fernández-Ibáñez et al., 2005). UV radiation was measured with a global UV-  
144 A pyranometer (295–385 nm, Model CUV3, Kipp & Zonen, Netherlands) on a horizontal  
145 platform, with a typical sensibility of  $264 \mu\text{VW}^{-1}\text{m}^{-2}$ . The pyranometer provides data in  
146 terms of incident  $\text{W}/\text{m}^2$ , which is defined as the solar radiant energy rate incident on a  
147 surface per unit area. UV dose ( $\text{kJ}/\text{m}^2$ ) is dependent on UV intensity and time, and it is  
148 given by Equation 5:

$$149 \text{dose} = I \times \Delta t \quad (5)$$

150 where  $I$  is the average irradiation intensity,  $\text{W}/\text{m}^2$ , and  $\Delta t$  is the experimental time

151 in seconds. The inactivation kinetics can be plotted as function of cumulative energy per  
 152 unit of volume ( $Q_{UV}$ , kJ/L) received by the bottles, and calculated by Equation 6:

$$153 \quad Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \frac{\Delta t_n \overline{UV}_{G,n} A_r}{V_t} \quad \Delta v_p = v_p - v_{p-3} \quad (6)$$

154 where  $Q_{uv,n}$ ,  $Q_{uv, n-1}$ , are the UV energy accumulated per unit volume (kJ/L) at times  $n$   
 155 and  $n-1$ , respectively,  $UV_{G,n}$  is the average incident irradiation on the irradiated area  
 156 ( $W/m^2$ ),  $\Delta t_n$  is the experimental time of sample,  $A_r$  is the illuminated area of the solar bottle  
 157 ( $m^2$ ), and  $V_t$  is the total volume of treated water (L). UV-A transmission in the reactor  
 158 (borosilicate glass) is 90% (cut-off at 280 nm). Total irradiated volume was 0.2 L and the  
 159 illuminated surface, calculated as the cross section area of the bottle reactor facing the sun,  
 160 was 0.0095  $m^2$ .

### 161 2.3. Reagents and physicochemical parameters measurement

162 Temperature, pH and dissolved oxygen (DO) were measured during the experiment  
 163 with WTW probes (Germany, series multi 720). The distilled water used had a  
 164 conductivity <10  $\mu S/cm$ ,  $Cl^- = 0.7-0.8$  mg/L,  $NO_3^- = 0.5$  mg/L and dissolved organic  
 165 carbon <0.5 mg/L. The iron concentrations were measured according to ISO 6332. All  
 166 samples were filtered with 0.20  $\mu m$  CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PET-20/25 (PANREAC, Spain)  
 167 and measured with a spectrophotometer (PG Instruments Ltd. T-60-U) at 510 nm.  $H_2O_2$   
 168 concentration was measured by a colorimetric method according to the norm DIN 38409  
 169 H15 based on the absorbance of the yellow complex formed between titanium (IV)  
 170 oxysulfate and  $H_2O_2$  by using a spectrophotometer (PG Instruments Ltd. T-60-U) at 410  
 171 nm. Titanium (IV) oxysulfate solution (Riedel-de Häen, Germany) was used to measure  
 172  $H_2O_2$  concentration by a spectrophotometric method.

### 173 2.4. Viral RNA extraction

174 The viral RNA from each sample was extracted by duplicate using the commercial kit  
175 NucleoSpin® RNA virus (Macherey-Nagel, Germany). This method is based on the  
176 guanidine thiocyanate disruption and the adsorption of RNA to silica columns. Known  
177 amounts of mengovirus clone vMC<sub>0</sub> (10 µl of a mengovirus stock of 10<sup>5</sup> pfu/mL) were  
178 previously spiked to each sample as an independent nucleic acid extraction efficiency  
179 control (Costafreda et al., 2006). To determine the extraction efficiency, Cycle threshold  
180 (*C<sub>t</sub>*) value for the Mengovirus-positive amplification control and the *C<sub>t</sub>* value for the tested  
181 virus were compared and classified as valid (> 5 %) or invalid (< 5 %). Following the ISO  
182 technical specifications, samples with a < 5 % extraction efficiency were re-extracted  
183 again.

#### 184 2.5. Reverse transcriptase-real time PCR (RT-qPCR)

185 RT-qPCR method was carried out according to the ISO/TS 15216:2013 standard  
186 method in a Mx3005p QPCR System (Stratagene, USA) thermocycler, using TaqMan  
187 probes and Platinum® Quantitative RT-PCR Thermoscript™ One-step System kit  
188 (Invitrogen, Saint Aubin, France) (25 µl final volume) with 5 µl of extracted RNA. Primer  
189 set and probe used were: 0.9 µM of reverse primer HAV240 (5'-  
190 GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3'), 0.5 µM of forward primer HAV68 (5'-  
191 TCACCGCCGTTTGCCTAG-3') and 0.45 µM of probe HAV150 (6-FAM-  
192 CCTGAACCTGCAGGAATTAA-MGB) for HAV (Costafreda et al., 2006). For MNV-1,  
193 0.2 µM of reverse primer Rv-ORF1/ORF2 (5'-GCGCTGCGCCATCACTC-3'), 0.2 µM of  
194 forward primer Fw-ORF1/ORF2 (5'-CACGCCACCGATCTGTTCTG-3') and 0.2 µM of  
195 probe MGB-ORF1/ORF2 (6-FAM-CGCTTTGGAACAATG-MGB) (Baert et al., 2008).

196 Amplification conditions for HAV were: reverse transcription at 55 °C for 1 h,  
197 denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of amplification with a denaturation  
198 at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 1 min.

199 Amplification conditions for MNV-1 were as previously described by Baert et al. (2008)  
200 with minor modifications. Briefly, after a RT step at 45 °C for 1 h, PCR amplification was  
201 carried out with an initial denaturation at 95 °C for 5 min, and 50 cycles of amplification  
202 with a denaturation at 95 °C for 15 s and annealing-extension step at 60 °C for 1 min.

203 The RT-qPCR efficiency was tested by means of the external controls (EC) included  
204 for each reaction. Briefly, 2.5 µl of EC, containing 10<sup>3</sup> genome copies of appropriated virus  
205 (HAV or MNV-1), were mixed with 2.5 µl of each sample extracted RNA and the  $C_t$   
206 values of these reactions were compared with the  $C_t$  value of the EC mixed only with  
207 RNA-free sterile water. Then the efficiency was classified as valid (> 25 %) or invalid (<  
208 25 %). Following the ISO technical specifications, samples with < 25 % RT-qPCR  
209 efficiency were tested again. Negative controls containing no nucleic acid as well as  
210 positive controls were also introduced in each run.

211 Quantification was estimated by standard curves constructed with serial dilutions of  
212 HAV or MNV-1 RNA, plotting the number of genome copies against the  $C_t$ . This  
213 quantification was not corrected with the extraction or RT-qPCR efficiencies, following  
214 the ISO standard method.

#### 215 *2.6. Infectivity assays*

216 The infectivity of HAV and MNV-1 remaining in water samples was evaluated in 48-  
217 well cell culture plates with confluent FRhK-4 and RAW 267.4 cells respectively (100  
218 µl/well of water samples). Once inoculated, plates were incubated 1 hour at 37 °C with  
219 slow agitation to promote virus attachment and internalization. After this period, the cells  
220 were washed with PBS (pH 7.4) and maintenance medium was added to each well.  
221 Maintenance medium consisted on DMEM supplemented with 2 % foetal bovine serum,  
222 1X non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine and 100 UI- 100 UI µg/mL Penicillin-  
223 Streptomycin (Lonza-BioWhittaker®, Belgium). The plates were then incubated at 37°C

224 and 5% of CO<sub>2</sub> and microscopically examined daily for cytopathic effect (CPE).  
225 Appropriate negative and positive controls were included. Negative controls consist on  
226 FRhK-4 or RAW 267.4 cells inoculated with sterile water subjected to the same conditions  
227 but not contaminated with viruses. Positive controls consist on the appropriate cell line  
228 inoculated with HAV or MNV-1 stock solutions.

### 229 2.7. Statistical analysis

230 One-way ANOVA analyses were performed to compare differences in global sunlight  
231 irradiances between HAV and MNV-1 experiments and in the percentage of viral  
232 elimination obtained among exposure conditions. Moreover, *post-hoc* tests were employed  
233 to determine the statistical significance of the viral reduction between each exposure  
234 conditions using the Tukey's and Dunnett's tests. Significance level was established at  $P <$   
235 0.05. All statistical analyses were performed using the SPSS v20.0.0 software statistical  
236 package (IBM Corp., Madrid, Spain).

## 237 3. Results

238 The maximum local noon UV irradiances recorded for HAV and MNV-1 experiments  
239 within the solar exposure period were 22.36 W/m<sup>2</sup> and 17.81 W/m<sup>2</sup>, respectively (Figure  
240 1). The accumulated UV *dose* and  $Q_{UV}$  at the end of the exposure period were 402.2 kJ/m<sup>2</sup>  
241 and 19.11 kJ/L for HAV and 314.5 kJ/m<sup>2</sup> and 14.94 kJ/L for MNV-1 (Figure 2). Maximum  
242 global sunlight irradiance values for HAV and MNV-1 experiments were 606.91 W×m<sup>2</sup>  
243 (average per hour 573.18 W×m<sup>2</sup>) and 300.16 W×m<sup>2</sup> (average per hour 136.41 W×m<sup>2</sup>),  
244 respectively.

245 The average water temperatures reached in bottles along the exposure time for HAV  
246 experiments were 25.7 °C for SODIS, 26.2 °C for Fenton and 26.9, 26.6 and 27.3 °C for  
247 solar photo-Fenton with 2.5-5, 5-10 and 10-20 mg/L Fe<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. For  
248 MNV-1 experiments, the mean water temperatures reached were 25.0 °C (SODIS), 24.1 °C

249 (Fenton) and 26.2, 26.1 and 26.4 °C for solar photo-Fenton (2.5-5, 5-10 and 10-20 mg/L  
250 Fe<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively). The minimum and maximum water temperatures besides  
251 initial and final concentration of pH, dissolved oxygen, dissolved Fe and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recorded  
252 within the glass bottles in HAV and MNV-1 experiments for each treatment are shown in  
253 Table 1.

254 All samples yield valid extraction and RT-qPCR efficiency values according to the ISO  
255 technical specifications. The average viral quantification at initial (0h) and final (6h) times  
256 for HAV and MNV-1 and their correspondent reduction values in Log-units and  
257 percentage are shown in Table 1. Average viral reductions at the end of the exposure time  
258 in HAV experiments were: 0.01 Log-units (2.47 %) in Fenton, 0.25 Log-units (43.9 %) in  
259 SODIS, and 0.75, 1.13 and 1.83 Log-units (82.2, 92.5 and 98.5 %) in photo-Fenton for 2.5-  
260 5, 5-10 and 10-20 mg/L Fe<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. In MNV-1 experiments, the average  
261 final reductions were: 0.05 Log-units (10.1 %) in Fenton, 0.29 Log-units (49.0 %) in  
262 SODIS, and 0.27, 0.39 and 1.06 Log-units (45.3, 60.3 and 91.4 %) in photo-Fenton for 2.5-  
263 5, 5-10 and 10-20 mg/L Fe<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. The HAV and MNV-1 RNA  
264 reduction trend-lines for each treatment are shown in Figure 2.

265 One-way ANOVA analyses showed significant differences between global sunlight  
266 irradiance values per hour of exposure reached in HAV and MNV-1 experiments ( $P <$   
267 0.001). Significant higher removal rates ( $P < 0.05$ ) for HAV over MNV-1 were observed  
268 in the three solar photo-Fenton treatments, but not in SODIS or Fenton conditions ( $P >$   
269 0.05). Statistical differences ( $P < 0.05$ ) were also observed among treatments, for both  
270 HAV and MNV-1 reduction rates.

271 Dunnet's test showed significant differences with regard to the Fenton treatment for all  
272 treatments both in HAV ( $P < 0.0001$ ) and MNV-1 ( $P < 0.01$ ) trials. In HAV trials, Tukey's  
273 test showed significant differences ( $P > 0.05$ ) between all conditions except between

274 photo-Fenton with 2.5-5 and 5-10 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  and between 5-10 and 10-20 mg/L  
275  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ . On the other hand, in MNV-1 trials, Tukey's test only showed significant  
276 differences ( $P > 0.05$ ) between photo-Fenton with 10-20 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  and the other  
277 treatments.

278 With regard to infectivity assays (Figure 3), HAV and MNV-1 maintained their  
279 infectivity capacity along the study period under control and Fenton conditions. However,  
280 a decrease of 20 % in HAV infectivity was observed after 5 and 6 h of exposure in SODIS  
281 conditions. Samples under photo-Fenton conditions with 2.5-5 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  showed a  
282 decrease of 20 % in HAV infectivity after 3, 5 and 6 h. However, MNV-1 maintained 100  
283 % of infectivity capacity along the 6 h of exposure under these conditions. Samples  
284 subjected to photo-Fenton with 5-10 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  showed a decrease of 20 % in their  
285 infectivity capacity after 3 and 4 h, a decrease of 40 % after 5 h and a decrease of 60 %  
286 after 6 h in HAV trials. Samples from MNV-1 trials only showed lack of CPE after 5 and 6  
287 h with an infectivity decrease of 20 %. Samples subjected to photo-Fenton with 10-20  
288 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  showed an infectivity decrease of 20 % after 2 and 3 h, of 40 % after 4 h  
289 and 80 % after 5 and 6 h in HAV trials. Samples from MNV-1 trials under these conditions  
290 showed a decrease in their infectivity capacity of 20 % after 3 h, and 40 % after 4, 5 or 6 h  
291 of solar exposure.

#### 292 4. Discussion

293 The effectiveness of various disinfection methods in reducing viral contamination of  
294 fresh fruits and vegetables is an area of active investigation (Fiore, 2004). However,  
295 commonly applied treatments to handling or sale fruits, like washing with different  
296 sanitizers, freezing or frozen storage, are not completely efficient to remove or inactivate  
297 enteric viruses (Butot et al., 2008). Therefore, the best approach to avoid pre-harvest

298 contamination of these products is the treatment of irrigation waters to eliminate enteric  
299 viruses.

300 This study aims to provide a picture of the efficiency of homogeneous photo-Fenton  
301 systems in comparison with Fenton and SODIS conditions for the disinfection of HAV and  
302 MNV-1 in water. To our knowledge, this is the first study that evaluates and compares (by  
303 RT-qPCR and infectivity assays) the efficacy of these processes for HAV and MNV-1  
304 inactivation under field conditions. Viral quantification was performed following the  
305 principles outlined in the recently developed ISO/TS 15216 standard method for the  
306 quantification of HAV and NoV in food (including water) using RT-qPCR. The method  
307 confers high robustness and reliability to the analysed data.

308 Negligible reduction in viral RNA counts and infectivity was achieved in Fenton  
309 conditions despite of the acidic pH values reached and maintained during the 6 h of  
310 treatment. This is in compliance with the natural resistance of these viruses to acidic pH  
311 levels and harsh environments. The stability of HAV and MNV-1 under pH values < 3 was  
312 previously reported (Bae and Schwab, 2008; Cannon et al., 2006; Hollinger and Emerson,  
313 2007). In Fenton conditions  $\text{Fe}^{2+}$  is rapidly oxidized by  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\cdot\text{OH}$  radicals are  
314 generated (eq. 1). The absence of light limits the  $\text{Fe}^{2+}$  regeneration and the production of  
315  $\cdot\text{OH}$ , and subsequently, the viral disinfection rates.

316 SODIS experiments showed only partial disinfection capacity. Viral elimination under  
317 sunlight relies on the effect of solar irradiation and the temperature of the water. In  
318 addition, a synergistic effect between these factors was previously demonstrated at  
319 temperatures > 40 °C (Wegelin et al., 1994). Previously, we observed a moderate removal  
320 of HAV (1.1 Log-unit) and MNV-1 (0.8 Log-unit) under SODIS conditions in PET bottles  
321 (unpublished results). However, those experiments were carried out under higher  
322 irradiation levels ( $\sim 800\text{-}1000 \text{ W}\times\text{m}^2$  during 3-4 h) and temperature ( $\sim 38\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$  as

323 maximum). In the present study, performed in November, lower values of global sunlight  
324 irradiance and temperature were recorded, especially in MNV-1 trials, which could  
325 explain, at least in part, the lower reduction rates reached for this virus in comparison with  
326 HAV. In addition, the higher removal rates observed in SODIS with regard to Fenton,  
327 highlight that the mild increase of temperature reached do not inactivate these viruses,  
328 indicating that irradiation and temperature acting together were necessary for significant  
329 reduction of RNA counts.

330 Overall, photo-Fenton significantly increases the disinfection rates with regard to  
331 Fenton and SODIS conditions due to the much higher production of  $\cdot\text{OH}$  in the presence of  
332 solar light, reaching viral reduction rates of  $\sim 1.8$  and  $1.1$  log units, respectively, with the  
333 highest concentration of  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ . This strong synergistic effect was also reported for the  
334 inactivation of MS2 coliphage (Nieto-Juarez et al., 2010) and other resistant  
335 microorganisms (García-Fernández et al., 2012; Polo-López et al., 2012). Results highlight  
336 that sunlight plays a crucial role in the efficiency of the process and that viral disinfection  
337 by photo-Fenton systems may occur with relatively high efficiency at middle  
338 environmental temperatures and without an intensive energy-light source requirement. This  
339 could have important implications for its application in solar disinfection practices in  
340 places and latitudes with less appropriated sunlight conditions.

341 On the other hand, since solar exposure by itself can also produce damages over the  
342 microorganisms (including viruses) depending on the UV dose and the water temperatures,  
343 removal rates achieved here could be enhanced in months with higher solar radiation doses  
344 and temperatures.

345 The influence of iron and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations was not evaluated separately.  
346 Synergistic effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and sunlight or iron and sunlight have been previously reported  
347 for bacteria and fungi (García-Fernández et al., 2012; Polo-López et al., 2012; Sciacca et

348 al., 2010; Spuhler et al., 2010). In the solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetrates and diffuses into  
349 the cells where it induces internal Fenton and Haber–Weiss reactions, generating reactive  
350 species. This intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can generate •OH radicals by internal Fenton and photo-  
351 Fenton reactions with free iron or loosely bound iron from sulfur cluster, proteins (e.g.  
352 enterobactin or ferritin) or siderophores (Spuhler et al., 2010). In the solar/Fe<sup>3+</sup> system, the  
353 iron could diffuse freely into the bacterial cells (Fe<sup>2+</sup>) or bind to highly specific proteins  
354 (Fe<sup>3+</sup>) and damage by the Haber–Weiss reactions due to the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the  
355 cellular aerobic metabolism (García-Fernández et al., 2012). Bacteria and viruses clearly  
356 differs in their biology and the lack of a viral metabolism makes improbable the same  
357 mechanisms, but other interactions between iron or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and viral components cannot be  
358 ruled out. Previous studies indicated that only the simultaneous presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe  
359 leads to an efficient MS2 inactivation (Nieto-Juarez et al., 2010), supporting a completely  
360 different inactivating mechanism.

361 Overall, higher viral elimination was obtained increasing the Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations,  
362 although in MNV-1 trials, removal rates were similar for SODIS conditions and photo-  
363 Fenton performed with 2.5-5 and 5-10 mg/L of Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Differences in the aggregation  
364 state and colloidal behaviour of viruses (dependent principally on the specific isoelectric  
365 point of each virion, and the pH of the medium) together with the lower radiation levels  
366 reached in MNV-1 trials could explain this lack of efficacy in certain photo-Fenton  
367 treatments, although further research is needed in this sense (Abad et al., 1994; Michen and  
368 Graule, 2010; Mattle et al., 2011; Mattle and Kohn, 2012). Moreover, results seem to  
369 indicate a lower efficacy of RNA removal after the first hours of the photo-Fenton  
370 treatments which could indicate that an accumulation of damages is required to show a  
371 clear injury on virus. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was mostly consumed within the first 2-3 h of the treatment  
372 (data not shown) and, therefore, the main damage produced by the photo-Fenton reagents

373 occurred at the early stages (hours) of the process. Once the  $\text{H}_2\text{O}_2$  is consumed,  $\text{Fe}^{2+}$  could  
374 not be transformed to  $\text{Fe}^{3+}$  (eq. 1). At the same time, the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  by light occurs  
375 until all iron is transformed into  $\text{Fe}^{2+}$ , which progressively stops the photo-Fenton reaction.

376 Nevertheless, significant higher inactivation rates were achieved with 10-20 mg/L of  
377  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ . This can be attributed to the maintenance of higher amounts of dissolved iron  
378 throughout the experiment than in the lower concentrated systems. This behaviour could be  
379 explained by the change of iron speciation in water at different pH. Photo-Fenton is  
380 strongly dependent on water pH, with an optimum pH around 2.8 (Pignatello et al., 2006).  
381 The iron is more stable and soluble at more acidic pH, which promotes the presence of  
382 dominant iron species of  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  in water and enhance the generation of  $\cdot\text{OH}$  radicals. At  
383  $\text{pH} > 4$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ions are easily transformed into  $\text{Fe}^{3+}$ , forming hydroxyl-complexes and  
384 causing precipitation of iron (Chong et al., 2010; Pignatello et al., 2006). Although these  
385 hydroxyl-complexes are less reactive, their participation in viral inactivation should not be  
386 discarded (Nieto-Juarez et al., 2010).

387 Bearing in mind the toxicity of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or  $\text{Fe}^{2+}$ , water treated by certain photo-Fenton  
388 concentration would be not adequate for human consumption. Nevertheless guidelines of  
389 safety standards for wastewater reuse are different depending on the intended final use,  
390 being more tolerant for irrigation water. The absence of technical and economical  
391 resources in developing countries make raw or diluted wastewater reuse a long-term future  
392 strategy. In this sense, photo-Fenton processes could be a sustainable and low cost solution  
393 to avoid, at least in part, health impacts from wastewater irrigation and other treated  
394 wastewater re-uses. One of the major challenges for scientists using photo-Fenton as a  
395 water treatment for drinking or recreational waters is to find the conditions of greatest  
396 process efficiency at neutral or near-neutral pH. Solar photo-Fenton water disinfection for

397 drinking or recreational purposes could be considerably improved using higher radiation  
398 and water temperatures values, reducing the cost and concentration of reagents.

399 Fenton and photo-Fenton processes can also take place in natural waters, due to the  
400 presence of both dissolved iron ions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leading to the disinfection of pathogens by  
401 naturally occurring oxidative processes (Silverman et al., 2013; Vaughan and Blough,  
402 1998). Further studies are needed to evaluate its efficacy and limitation in natural waters,  
403 raw or diluted wastewater, and their influence on disinfection rates and kinetics, exposure  
404 time and reagents concentration.

405 Some questions remain unclear with regard to molecular mechanisms involved in  
406 photo-Fenton viral inactivation, like the metal-virus interaction, which virus constituents  
407 are the most susceptible to degradation by <sup>•</sup>OH, or how subtle differences in viral  
408 composition (nucleic acid type, genome length, structure, base and capsid composition)  
409 could affect disinfection kinetics of closely related viruses (Kawanishi et al., 2001; Lytle  
410 and Sagripanti et al., 2005; Nieto-Juarez et al., 2010; Sigstam et al., 2013). Despite of this,  
411 results presented here indicate that homogeneous photo-Fenton system could be an  
412 efficient disinfection process for the elimination of enteric viruses in water and contribute  
413 to fill certain knowledge gap in this area.

414

## 415 **5. Conclusions**

- 416 • Solar photo-Fenton processes have been demonstrated to significantly reduce both  
417 RNA counts and infectivity capacity of HAV and MNV-1 in distilled water.
- 418 • The best viral disinfection results were obtained with photo-Fenton using 10 mg/L  
419 of Fe<sup>2+</sup> and 20 mg/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reaching average RNA reduction rates of 1.8 Log-  
420 units (HAV) and 1.1 Log-units (MNV-1) at *Q<sub>uv</sub>* of 19.1 and 14.9 kJ/L.

- 421 • A reduction of 80 % (HAV) and 40 % (MNV-1) of the infectivity capacity in water  
422 samples with the highest concentrated photo-Fenton treatment (10 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}$   
423 and 20 mg/L of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).
- 424 • A strong synergistic effect between  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  and sunlight was observed,  
425 demonstrating for the first time that significant disinfection rates for HAV and  
426 MNV-1 by photo-Fenton systems may occur with relatively high efficiency at  
427 middle environmental temperatures and without an intensive energy-light source  
428 requirement.
- 429 • Further research in other types of water or wastewater are needed to evaluate the  
430 efficacy and limitations of the process from a virological point of view.  
431 Nevertheless results presented here suggest solar photo-Fenton technology as a  
432 promising alternative water treatment for viruses.

433

434

#### 435 **Acknowledgements**

436 We gratefully acknowledge Dr. Albert Bosch (University of Barcelona, Spain) and Dr.  
437 Herbert W. Virgin IV (University of Washington, USA) for kindly donation of the  
438 Mengovirus clone (vMC0) and MNV-1 strain, respectively. This work was supported in  
439 part by Grant of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), for financing stays at the  
440 PSA (by DP and JLR). The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and  
441 Competitiveness for financial support under the AQUASUN project (reference: CTM2011-  
442 29143-C03-03).

443

444 **References**

- 445 Abad FX, Pinto RM, Diez JM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses in water by  
446 copper and silver in combination with low-levels of chlorine. *Appl Environ Microbiol*  
447 1994; 60: 2377-83.
- 448 Argulló-Barceló M, Polo-López MI, Lucena F, Jofre J, Fernández-Ibáñez P. Solar  
449 advanced oxidation processes as disinfection tertiary treatments for real wastewater:  
450 implications for water reclamation. *Appl Catal B: Environ* 2013; 136-137: 341-50.
- 451 Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection.  
452 *Gastroenterol. Clin North Am* 2006; 35: 275-90.
- 453 Bae J, Schwab KJ. Evaluation of Murine Norovirus, Feline Calicivirus Poliovirus, and  
454 MS2 as Surrogates for Human Norovirus in a Model of Viral Persistence in Surface  
455 Water and Groundwater. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 477-84.
- 456 Baert L, Wobus ChE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. Detection  
457 of Murine Norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse  
458 transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:  
459 543-6.
- 460 Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in  
461 developing countries. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 710-7.
- 462 Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric  
463 viruses in berries and herbs. *Int J Food Microbiol* 2008; 126: 30-5.
- 464 Calder L, Simmons G, Thornley C, Taylor P, Pritchard K, Greening G, et al. An outbreak  
465 of hepatitis A associated with the consumption of raw blueberries. *Epidemiol Infect* 2003;  
466 131: 745-51.

- 467 Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. Surrogates for the  
468 study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of  
469 murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Protect* 2006; 69: 2761-5.
- 470 Cheong S, Lee C, Song SW, Choim WC, Lee CH, Kim SJ. Enteric viruses in raw  
471 vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol*  
472 2009; 75: 7745-51.
- 473 Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C. Recent developments in photocatalytic water  
474 treatments technology: a review. *Water Res* 2010; 44: 2997-3027.
- 475 Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a  
476 real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A  
477 virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3846-55.
- 478 Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. The survival of hepatitis A virus in  
479 fresh produce. *Int J Food Microbiol* 2002; 73: 29-34.
- 480 Fell G, Boyens M, Baumgarte S. Frozen berries as a risk factor for outbreaks of norovirus  
481 gastroenteritis. Results of an outbreak investigation in the summer of 2005 in Hamburg.  
482 *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2007; 50: 230-6.
- 483 Fernández-Ibáñez P, Blanco J, Sichel C, Malato S. Water disinfection by solar  
484 photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catal Today* 2005; 101: 345-52.
- 485 Fewtrell L, Kaufmann R, Kay D, Enanoria W, Haller L, Colford J. Water, sanitation, and  
486 hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic  
487 review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 42-52.
- 488 Fiore AE. Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 705-15.
- 489 García-Fernández I, Polo-López MI, Oller I, Fernández-Ibáñez P. Bacterial and fungi  
490 inactivation using  $Fe^{+3}$ /sunlight,  $H_2O_2$ /sunlight and near neutral photo-Fenton: a  
491 comparative study. *Appl Catal B: Environ* 2012; 121-122: 20-9.

- 492 Gerba CP, Choi CY. Role of irrigation water in crop contamination by viruses. In: Goyar  
493 S, Editor. *Viruses in foods*. US: Springer; 2006. p. 257-63.
- 494 Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A Virus. In: Knipe DM, Howley PM, Editors. *Fields*  
495 *virology* 5th ed. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 911-47.
- 496 International Organization for Standardization (ISO). ISO 15216-1. Microbiology of food  
497 and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and  
498 norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification. Geneva,  
499 Switzerland, 2013.
- 500 International Organization for Standardization (ISO). ISO 6332. Water quality-  
501 Determination of iron - Spectrometric method using 1,10-phenanthroline. Geneva,  
502 Switzerland, 1988.
- 503 Jiménez B, Drechsel P, Koné D, Bahri A, Raschid-Sally L, Qadir M. Wastewater, sludge  
504 and excreta use in developing countries: an overview. In: Drechsel P, Scott CA,  
505 Raschid-Sally L, Redwood M, Bahri A, Editors. *Wastewater Irrigation and Health.*  
506 *Assessing and mitigating risk in low-income countries*. London; Earthscan: 2010. p. 3-  
507 27.
- 508 Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by  
509 oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 2001; 488: 65-76.
- 510 Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998; 351: 1643-9.
- 511 Le Guyader FS, Mittelholzer C, Haugarreau L, Hedlund KO, Alsterlund R, Pommeputy M,  
512 et al. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak.  
513 *Int J Food Microbiol* 2004; 97: 179-86.
- 514 Long SM, Adak GK, Brien SJ, Gillespie IA. General outbreaks of infectious intestinal  
515 disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992-2000. *Commun.*  
516 *Dis Public Health* 2002; 5: 101-5.

- 517 Lytle CD, Sagripanti JL. Predicted Inactivation of Viruses of Relevance to Biodefense by  
518 Solar Radiation. *J Virol* 2005; 79: 14244-52.
- 519 Mattle MJ, Crouzy B, Brennecke M, Wigginton KR, Perona P, Kohn T. Impact of virus  
520 aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants  
521 *Environ Sci Technol* 2011; 45: 7710-7.
- 522 Mattle MJ, Kohn T. Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses:  
523 contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and  
524 recombination. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 10022-30.
- 525 Mailhot G, Sarakha M, Lavedrine B, Caceres J, Malato S. Fe(III)-solar light induced  
526 degradation of diethyl phthalate (DEP) in aqueous solutions. *Chemosphere* 2002; 49:  
527 525–32.
- 528 Malato S, Fernández-Ibáñez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W. Decontamination and  
529 disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catal Today*  
530 2009; 147: 1–59.
- 531 Michen B, Graule T. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol* 2010; 109: 388-97.
- 532 Nieto JI, Pierzchala K, Sienkiewicz A, Kohn T. Inactivation of MS2 coliphage in Fenton  
533 and Fenton-like systems: role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight.  
534 *Environ Sci Technol* 2010; 44: 3351-6.
- 535 Ortega-Gómez E, Fernández-Ibáñez P, Ballesteros-Martín MM, Polo-López MI, Esteban-  
536 García B, Sánchez-Pérez JA. Water disinfection using photo-Fenton: Effect of  
537 temperature on *Enterococcus faecalis* survival. *Water Res* 2012; 46: 6154-62.
- 538 Pignatello JJ, Oliveros E, McKay A. Advanced oxidation processes for organic  
539 contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit. Rev.*  
540 *Env Sci Technol* 2006; 36: 1-84.

- 541 Polo-López MI, García-Fernández I, Velegraki T, Katsoni A, Oller I, Mantzavinos D, et al.  
542 Mild solar photo-Fenton: an effective tool for the removal of Fusarium from simulated  
543 municipal effluents. *Appl Catal B: Environ* 2012; 111-112: 545-54.
- 544 Sciacca F, Rengifo-Herrera JA, Wéthé J, Pulgarin C. Dramatic enhancement of Solar  
545 Disinfection (SODIS) of wild Salmonella sp. in PET bottles by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition on natural  
546 water of Burkina Faso containing dissolved iron. *Chemosphere* 2010; 78: 1186-91.
- 547 Sigstam T, Gannon G, Cascella M, Pecson BM, Wigginton KR, Kohn T. Subtle  
548 Differences in Virus Composition Affect Disinfection Kinetics and Mechanisms. *Appl*  
549 *Environ Microbiol* 2013; 79: 3455-67.
- 550 Silverman AI, Peterson BM, Boehm AB, McNeill K, Nelson KL. Sunlight Inactivation of  
551 Human Viruses and Bacteriophages in Coastal Waters Containing Natural  
552 Photosensitizers. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 1870-8.
- 553 Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of  
554 outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Protect*  
555 *2004*; 67: 2342-53.
- 556 Spuhler D, Rengifo-Herrera JA, Pulgarin C. The effect of Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the photo-  
557 Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures  
558 of water containing Escherichia coli K12. *Appl Catal B: Environ* 2010; 96: 126-41.
- 559 United Nations (UN). The Millennium Development Goals Report 2013, ISBN 978-92-1-  
560 101284-2, 2013.
- 561 Vaughan PP, Blough NV. Photochemical formation of hydroxyl radical by constituents of  
562 natural waters. *Environ Sci Technol* 1998; 32: 2947-53.
- 563 Wheeler C, Vogt TM, Armstrong GL, Vaughan G, Weltman A, Nainan OV, et al. An  
564 outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N Engl J Med* 2005; 353: 890-7.

- 565 Wegelin M, Canonica S, Mechsner K, Fleischmann T, Pesaro F, Metzler A. Solar water  
566 disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *J Water SRT –*  
567 *Aqua* 1994; 43: 154-69.
- 568 Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study  
569 norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80: 5104-12.
- 570 World Water Assessment Programme (WWAP). The United Nations World Water  
571 Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk. Paris, UNESCO,  
572 2012.
- 573

574 Table 1. Minimum (*min*) and maximum (*max*) temperatures (°C) and initial (*i*) and final (*f*) values of pH, dissolved oxygen (O<sub>2</sub>), total dissolved  
 575 Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reached for each treatment assayed (SODIS, photo-Fenton and Fenton) along the study period in HAV and MNV-1 trials. Initial and  
 576 final viral quantification expressed as RNAc/100mL (average of three replicates with the correspondent Standard deviation shown in brackets)  
 577 and Log-units of viral removal at the end of the exposure period (6 h) are also shown.

578

Virus	Treatment Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C) <i>min/max</i>	pHi/pHf	O <sub>2</sub> i/O <sub>2</sub> f (mg/L)	Fei/Fe <sub>f</sub> (mg/L)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> i/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> f (mg/L)	RNAc/100mL <i>i</i> (0h)	RNAc/100mL <i>f</i> (6h)	Log units
HAV	SODIS (0/0)	22.2/28.5	6.2/6.2	7.6/6.6	—/—	—/—	1.5(±0.7) 10 <sup>7</sup>	8.2(±3.1) 10 <sup>6</sup>	0.25
	Pho-F (2.5/5)	22.2/31.6	4.2/5.6	7.6/6.7	2.78/0.48	5.66/3.60	2.0(±0.6) 10 <sup>7</sup>	3.6(±0.5) 10 <sup>6</sup>	0.75
	Pho-F (5/10)	22.2/31.7	3.8/4.5	8.3/6.9	4.86/1.45	7.22/3.08	3.1(±1.1) 10 <sup>7</sup>	2.3(±0.7) 10 <sup>6</sup>	1.13
	Pho-F (10/20)	22.2/33.3	3.6/4.1	10.1/6.7	8.13/5.38	10.32/3.08	5.3(±0.7) 10 <sup>7</sup>	7.8(±4.7) 10 <sup>5</sup>	1.83
	Fenton (10/20)	22.2/30.6	3.7/3.8	9.6/6.2	8.87/2.19	10.32/4.63	1.5(±0.5) 10 <sup>7</sup>	1.4(±0.8) 10 <sup>7</sup>	0.01
MNV	SODIS (0/0)	21.2/27.0	6.1/6.2	7.3/7.0	—/—	—/—	1.4(±0.7) 10 <sup>7</sup>	7.2(±0.7) 10 <sup>6</sup>	0.29
	Pho-F (2.5/5)	21.2/28.9	4.1/6.3	7.6/6.8	2.71/0.63	5.15/4.11	1.8(±0.2) 10 <sup>7</sup>	1.0(±0.2) 10 <sup>7</sup>	0.27
	Pho-F (5/10)	21.2/28.5	3.9/5.4	7.8/6.7	4.04/1.89	6.70/3.60	4.1(±1.7) 10 <sup>7</sup>	1.7(±0.5) 10 <sup>7</sup>	0.39
	Pho-F (10/20)	21.2/29.6	3.7/4.1	8.7/6.7	7.38/6.57	11.36/3.60	2.8(±0.4) 10 <sup>7</sup>	2.4(±1.6) 10 <sup>6</sup>	1.06
	Fenton (10/20)	21.2/25.8	3.7/3.8	9.2/5.4	8.94/7.38	10.84/3.60	1.8(±0.3) 10 <sup>7</sup>	1.6(±0.8) 10 <sup>7</sup>	0.05

579

580

581

582

**Figure legends**

583

584 **Figure 1.** Average solar UV irradiance (295-385 nm) along the solar exposure period  
585 performed with HAV and MNV-1.

586

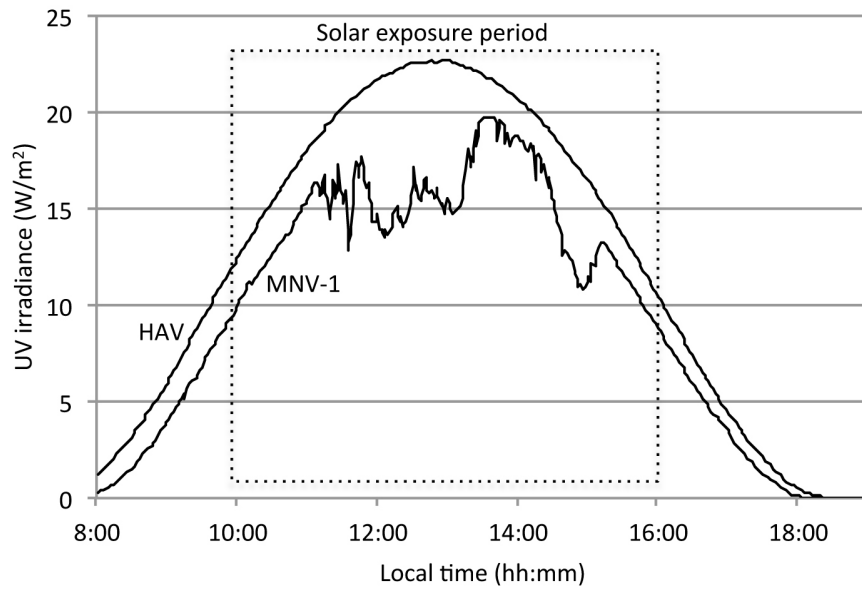
587 **Figure 2.** HAV (A) and MNV-1 (B) RNA removal kinetics along the exposure period  
588 under the different treatments assayed: Fenton (with 10-20 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ ), SODIS  
589 and solar photo-Fenton (with three different concentrations: 2.5-5; 5-10 and 10-20 mg/L  
590  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Results are expressed as % of viral RNA copies/100 mL. Each data point is  
591 the average of three replicates. Solar UV dose ( $\text{kJ/m}^2$ ) and cumulative UV radiation ( $Q_{UV}$ ,  
592 kJ/L) are also shown in secondary axis.  $R^2$  for each trend-line are: For HAV, 0.82  
593 (SODIS), 0.86 (2.5-5 mg/L), 0.77 (5-10 mg/L), 0.99 (10-20 mg/L) and 0.99 (Fenton). For  
594 MNV-1: 0.80 (SODIS), 0.95 (2.5-5 mg/L), 0.93 (5-10 mg/L), 0.87 (10-20 mg/L) and 0.97  
595 (Fenton).

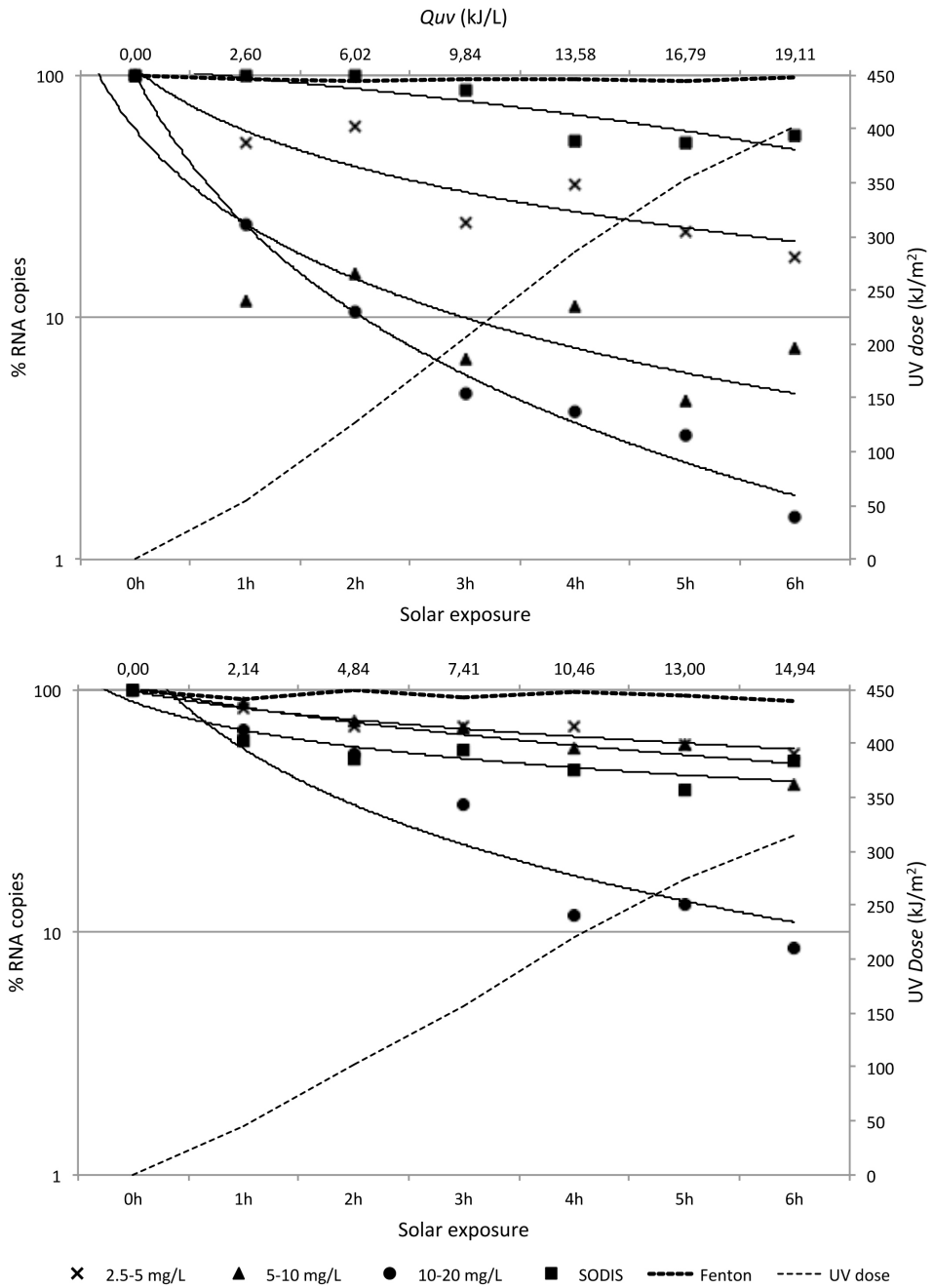
596

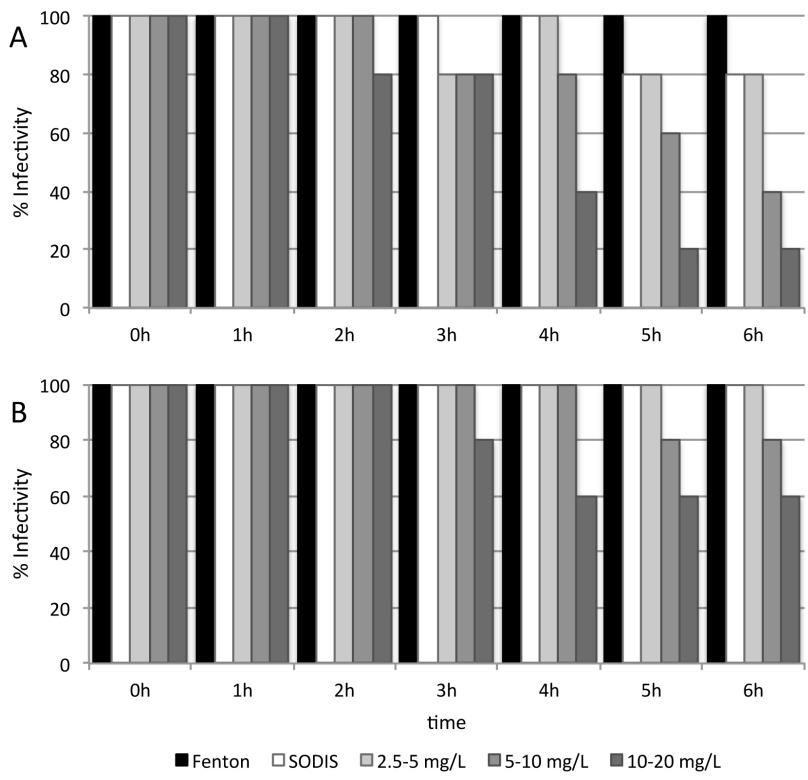
597 **Figure 3.** Percentage of infectivity for HAV and MNV-1 along the exposure period under  
598 the different treatments assayed: Fenton (with 10-20 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$ ), SODIS and solar  
599 photo-Fenton (with three different concentrations: 2.5-5; 5-10 and 10-20 mg/L of  $\text{Fe}^{2+}$ -  
600  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectively). The % was calculated as the relation between the water samples that  
601 showed infectivity and total water samples analysed.

602

603







# DISCUSIÓN GENERAL

---



#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

En las últimas dos décadas, se ha puesto de manifiesto, no sólo la importancia de los virus como patógenos causantes de una gran parte de las ETA, sino también la ineficacia, desde un punto de vista virológico, de los mecanismos actuales de control microbiológico en alimentos y la vulnerabilidad actual de nuestro mercado alimentario global. Uno de los principales retos o limitaciones dentro de la virología alimentaria era la ausencia de una metodología estándar para la detección viral en alimentos lo suficientemente fiable y sensible. En este sentido, la reciente publicación de la ISO/TS 15216 para la detección de HAV y NoV mediante RT-qPCR en productos alimentarios (incluidos moluscos bivalvos y agua embotellada) supone un importante avance y perfila la línea base sobre la que se asentarán gran parte de los estudios venideros en este campo de estudio.

En lo que se refiere a la técnica empleada y salvo modificaciones menores, todos los ensayos que componen la presente tesis doctoral se han realizados siguiendo las directrices del método ISO anteriormente citado. Este procedimiento implica la inclusión de controles fiables de extracción viral y amplificación del RNA con el fin de evitar falsos negativos y verificar el grado de inhibición en cada muestra. Esto garantiza cierta robustez y consistencia en los datos obtenidos y proporciona la fiabilidad y reproducibilidad necesaria para su posterior análisis e interpretación. Estos datos se han completado además con ensayos de infectividad para obtener de manera cualitativa el grado de infectividad de las muestras.

Uno de los objetivos principales de esta tesis consistía en obtener una visión amplia de la dinámica de eliminación de HAV y NoV en almeja y mejillón sometidos a procesos de depuración extendiendo el periodo de purificación de las aproximadamente 48 horas utilizadas comercialmente hasta los 7 días. Las especies utilizadas *Venerupis* spp. y *Mytilus galloprovincialis* fueron elegidas por su importancia en el sector acuícola gallego y porque sus diferentes hábitos de vida (infaunal en el caso de las almejas y epifaunal en el

caso del mejillón) proporcionan una visión más completa del proceso depurativo y posibilitan la comparación de sus habilidades depurativas.

En general, los resultados ponen de manifiesto que la depuración reduce de manera significativa la carga viral y por lo tanto parte del riesgo de infección asociado. Sin embargo, no lo suficiente para garantizar la ausencia de HAV o NoV en el producto final, incluso tras 7 días de depuración. La presencia de virus en los moluscos representa un riesgo para la salud humana sólo si las partículas virales presentes son infectivas. La presencia de ECP mostrado por las muestras después de la depuración reveló que tanto HAV como MNV-1 seguían siendo infectivos después de haber sido bioacumulados y posteriormente depurados durante 7 días en ambas especies de bivalvos.

Los ensayos llevados a cabo en el centro autorizado de depuración hicieron patente la necesidad de desarrollar un protocolo mejorado para la depuración comercial, que incluya estrategias de muestreo más adecuadas y representativas, con una mejor comprensión de las diferencias en los niveles de contaminación entre individuos y/o lotes. Es esencial que el desarrollo de este plan o estrategia de muestreo esté enfocado a los patógenos virales y la matriz en la que se han de analizar. En el caso de los moluscos bivalvos, dicha matriz es la glándula digestiva o hepatopáncreas, de naturaleza compleja y en la cual los virus pueden estar presentes en pequeñas cantidades y/o distribuidos de manera heterogénea entre individuos de un mismo lote. Estos aspectos deberían ser considerados en el futuro a la hora de definir y establecer protocolos para el control y verificación de la eficacia de los procesos de depuración viral.

A pesar de que diferentes organismos como la ISO, el Comité Europeo para la Normalización (CEN) o la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han definido ciertos principios de muestreo en agua y alimentos, éstos se basan principalmente en criterios bacterianos y no hacen mención a los virus entéricos (revisado en Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012).

Las diferencias en la habilidad depurativa de diferentes moluscos y la cinética de eliminación de diferentes virus bajo condiciones de depuración son

puntos cruciales para la mejora del proceso y el desarrollo de una nueva legislación que incluya a estos patógenos.

Todos los ensayos mostraron una cinética de depuración de dos fases, tanto en almeja como en mejillón. Dicha cinética mostró una rápida reducción de la carga viral inicial durante los 2 o 3 primeros días y, a continuación, una estabilización en la tasa depurativa hasta el final del proceso.

La primera fase de eliminación rápida podría atribuirse a la excreción de parte de la carga viral durante la evacuación, desde el lumen del tracto digestivo, del material por digestión extracelular y la defecación. En este sentido, la optimización de las condiciones de depuración y el estado fisiológico de los moluscos son aspectos cruciales para maximizar su actividad de bombeo y consecuentemente alcanzar los niveles residuales en un menor tiempo, teniendo en cuenta que el periodo aplicado comercialmente suele ser de 48 h.

Los resultados también indican que, en general, los mejillones alcanzan el umbral de la segunda fase antes que las almejas, lo que indica una mayor capacidad depurativa. La menor sensibilidad al estrés ambiental, en parte posiblemente consecuencia de una adaptación a un hábitat epifaunal menos estable que el infaunal, y la mayor capacidad de bombeo de mejillones con respecto a otros bivalvos como las almejas (Bayne *et al.*, 1976; Gosling *et al.*, 2003) podría favorecer su capacidad de adaptación al proceso de depuración, y facilitar, al menos durante procesos depurativos cortos, la eliminación viral con respecto a otros bivalvos como las almejas. Otras características fisiológicas relacionadas con la tasa de filtración, capacidad de reactivación tras el cierre de las valvas, ritmos digestivos y/o variaciones entre especies debidas a la capacidad de adaptarse a condiciones sub-óptimas como la baja disponibilidad de alimento, típica de los procesos de depuración, ciclo gametogénico anual e incluso diferencias estructurales en el aparato digestivo, podrían modular el proceso depurativo, y deben ser estudiadas más en profundidad.

En la segunda fase, se observa una clara ralentización de la eliminación viral, lo que indica que existe una carga viral residual no disponible para su

eliminación mediante la simple función de la digestión y la defecación, y sugiere la implicación de otros factores.

Estos factores podrían corresponderse con propiedades biológicas propias de los tejidos digestivos de los moluscos, como la unión específica de las partículas virales a ligandos o receptores específicos en las células gastrointestinales, o mediante procesos de internalización de los virus (fagocitosis y acumulación en hemocitos) hacia zonas interiores dentro del tejido digestivo, pero fuera del lumen de conductos y divertículos digestivos, y por lo tanto no disponibles para su eliminación directa (Le Guyader *et al.*, 2006b, 2012; Mcleod *et al.*, 2009a; Provost *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

En este sentido, en función de la cantidad, distribución y/o expresión estacional de estos receptores, ciertos virus o cepas virales podrían acumularse y transmitirse en mayor o menor medida dependiendo del molusco bivalvo.

Comparando las tasas de eliminación de HAV, se observó que la segunda fase de eliminación lenta se alcanza antes en los mejillones que en las almejas, sin embargo tras los 7 días de depuración las tasas de eliminación son muy similares, entre 0,81 y 1,87 Log (una media de 1,44 Log; 93 %) en almeja y entre 0,8 y 1,7 Log (una media de 1,2 Log; 92 %) en mejillón.

En los ensayos con MNV-1, se observa de nuevo que el umbral de la segunda fase se alcanza antes en los mejillones que en las almejas, pero en este caso los niveles residuales en almeja son mucho más elevados. Las tasas de eliminación oscilaron entre 0,13 y 0,92 Log (una media de 0,56 Log; 60,5 %) para almeja y entre 0,79 y 1,35 Log (una media de 1,13 Log; 91 %) para mejillón.

En este sentido, ciertos virus, como HAV, podrían presentar ciertas diferencias en sus tasas de eliminación en diferentes moluscos durante procesos de depuración cortos, influidos principalmente por la capacidad fisiológica del molusco y su adaptación al proceso. Sin embargo, durante una depuración más a largo plazo estas diferencias se diluirían. A diferencia de NoV, en el caso de HAV no se han encontrado receptores específicos en los tejidos de digestivos

de los bivalvos, pero si se ha detectado la presencia viral en hemocitos. De hecho, los hemocitos han sido recientemente propuestos como lugar de persistencia viral en moluscos (Provost *et al.*, 2011). Los hemocitos de los bivalvos interactúan con las vacuolas digestivas en la fase terminal del proceso de digestión de los bivalvos, poseen la capacidad de fagocitar tanto bacterias como virus, y constituyen un ambiente hostil por su acidez para ambos (Bayne *et al.*, 1976; Gosling *et al.*, 2003), por lo que la resistencia específica a este entorno también afectará a la reducción de patógenos.

Provost *et al.* (2011) demostraron que la tolerancia a condiciones ácidas de HAV>MNV-1>PV>FCV, está estrechamente relacionada con su capacidad para resistir la digestión ácida dentro de estas vesículas y persistir dentro de los hemocitos de las ostras. Sin embargo otros virus, como NoV humano o MNV, además de poder persistir dentro de hemocitos y otras partes del tejido digestivo, presentan ciertos receptores específicos (similares a los HBGA humanos) en los tejidos de los moluscos. En función de la presencia, distribución y cantidad de estos receptores en diferentes especies, ciertos virus podrían ser más o menos bioacumulados y depurados.

Los ensayos realizados con MNV-1 mostraron diferencias significativas entre almeja y mejillón tanto para la tasa de bioacumulación (un 90 % más elevada en almeja) como para la tasa de depuración (un 30 % menos efectiva en almeja).

Ciertos virus como HAV y NoV podrían haber evolucionado para explotar a los moluscos como vectores de infección humana utilizando mecanismos tales como unión a receptores específicos o una mayor resistencia a las condiciones ácidas, que otros microorganismos como los indicadores bacterianos u otros virus más fácilmente depurables (PV, FCV) no poseen (Abad *et al.*, 1994; Bae y Schwab, 2008; McLeod *et al.*, 2009b; Scholz *et al.*, 1989; Ueki *et al.*, 2007).

La dinámica de eliminación de los bacteriófagos, evaluada mediante depuración comercial, parece reflejar las de los virus entéricos en una forma más representativa que la observada para *E. coli* (de tipo lineal) (datos no mostrados), y por lo tanto podrían complementar el uso de los indicadores

bacterianos en procesos de depuración. Es importante señalar la utilización de sistemas de depuración diferentes y que la cuantificación utilizada para los bacteriófagos (basada en la infectividad) y la de HAV y NoV (basada en copias genómicas) difieren substancialmente, por lo que las comparaciones deben ser hechas con cautela.

En general, estos resultados ponen de relieve, no sólo la importancia de establecer un límite viral crítico antes y después del proceso de depuración, sino la posibilidad, bajo la observación de esta cinética de depuración viral compartida, de desarrollar un modelo matemático que caracterice y defina, en cierta medida, el proceso de depuración viral.

El modelo aquí propuesto, se adapta con gran exactitud a los datos obtenidos en los ensayos de depuración experimental e indica, como se ha mencionado, que la primera fase de rápida eliminación esta íntimamente relacionada con las características fisiológicas del molusco en cuestión, concretamente es proporcional a la tasa de filtración de cada bivalvo, mientras que es independiente de la especie viral que se esté depurando.

La expresión matemática desarrollada describe un patrón común de eliminación proporcional a la tasa de filtración del molusco, por lo que del mismo modo, mediante la determinación experimental de los valores de filtración de otras especies facilitaría la comparación de los procesos de depuración en diferentes organismos filtradores.

El modelo permite también la predicción del tiempo de depuración necesario para alcanzar una determinada concentración viral por g de tejido digestivo en función de una concentración viral inicial. Esto puede tener importantes implicaciones para la evaluación del riesgo de cara al consumidor, el establecimiento de valores críticos virales que determinen el requerimiento o no de un proceso de depuración, así como ser una herramienta de control y verificación de los procesos de depuración.

La existencia de una carga viral residual dependiente de variables que actualmente se desconocen en gran medida, hacen necesario futuros estudios para la precisión de las tasas de eliminación y persistencia de cargas virales

residuales. Dada la evidente complejidad del proceso, este modelo no pretende describirlo todo pero si intenta ser una base para un futuro modelo más completo.

Los modelos de predicción son cada vez más aceptados como una parte integral de la mezcla de disciplinas y conocimientos necesarios para mejorar la seguridad alimentaria, cada vez más dependiente de un enfoque cuantitativo para la predicción y el análisis de los riesgos hacia el consumidor. El desarrollo de modelos matemáticos puede reducir la dependencia de las técnicas basadas en el cultivo y proporcionar una rápida disponibilidad de resultados.

La integración de la microbiología predictiva en los procesos de depuración viral pueden ser de gran utilidad para el diseño racional y eficaz de nuevos y mejores sistemas de depuración, desde una visión menos reduccionista y más holística y de mayor alcance y no tan enfocada a la eliminación de patógenos bacterianos.

En lo que se refiere a los ensayos de desinfección solar, el objetivo principal de esta parte de la tesis fue obtener una visión preliminar de la eficacia del método SODIS y sistemas foto-Fenton para la desinfección de agua contaminada con HAV y MNV-1 bajo condiciones de exposición solar natural.

Los ensayos de SODIS mostraron una reducción significativa de los niveles de HAV y MNV-1 tras de 8 h de exposición solar (1,1 Log para HAV y 0,81 Log para MNV-1). Los ensayos de infectividad reflejaron también la ausencia de ECP en algunas muestras de agua de botellas en condiciones de SODIS 4 h después del comienzo de la exposición. La comparación entre las diferentes condiciones de exposición sugiere una mayor importancia de la radiación solar frente a la temperatura como factor principal de la reducción viral.

El efecto sinérgico entre radiación y temperatura ocurre cuando se alcanzan temperaturas superiores a 45°C (McGuigan *et al.*, 1998; Wegelin *et al.*, 1994). Sin embargo, las temperaturas máximas alcanzadas durante los ensayos oscilaron entre 38 y 40°C y fueron necesarias aproximadamente 4 h para alcanzar dichas temperaturas. Esta es una observación importante ya que puede

ser una causa de la disparidad entre estudios cuando se comparan resultados en ensayos bajo condiciones de luz simuladas y naturales (Boyle *et al.*, 2008).

Consiguiendo temperaturas más altas, superiores a 45°C, es muy posible aumentar la eficacia del proceso. La idoneidad de la técnica SODIS para los países con una alta incidencia de enfermedades transmitidas por el agua se ilustra en el hecho de que estos países se encuentran principalmente en latitudes entre los 30° N y 30° S, en los que fácilmente se consiguen mayores radiaciones y temperaturas.

El modo natural de transmisión ambiental de virus como HAV y NoV les confiere una gran estabilidad en diferentes tipos de ambientes hostiles fuera del hospedador, incluyendo temperaturas fisiológicas como las registradas en este ensayo. A pesar de que la estabilidad ambiental de HAV está ampliamente demostrada, la utilización de MNV-1 para este tipo de ensayos es totalmente novedosa. Los resultados parecen indicar una mayor resistencia de MNV-1 en comparación con HAV, pero sin diferencias estadísticas. Esto sugiere que MNV-1 puede llegar a ser un modelo de NoV humano en este tipo de estudios, quizá más adecuado que otros grupos ampliamente utilizados, como los bacteriófagos, con diferencias estructurales notables.

A pesar de que las tasas de desinfección viral parecen ser relativamente bajas, sobretodo en comparación con la eficacia del método para otros tipos de microorganismos como los patógenos bacterianos, pueden tener una importancia crucial en la disminución del riesgo de infección, apoyando su uso como intervención de emergencia en comunidades vulnerables. Son necesarios más estudios para determinar la eficacia y límites del método SODIS para eliminar virus en diferentes condiciones. La colocación de las botellas sobre superficies reflectantes o la utilización de colectores solares son estrategias de mejora del método SODIS que podrían contribuir a aumentar dichas tasas o permitir la desinfección de volúmenes mayores (Fontán-Sainz *et al.*, 2012).

Garantizar la seguridad y calidad del agua de consumo es esencial en la prevención de las enfermedades transmitidas por el agua. Sin embargo, otros propósitos como el riego de cultivos, dependen en mayor medida del acceso y

disponibilidad del agua desde una perspectiva más cuantitativa. En este caso la calidad podría verse comprometida, en cierto grado, en favor de la cantidad y disponibilidad a largo plazo. Esta perspectiva más holística redundaría no sólo en el acceso al agua, sino también en la educación, productividad, educación y desarrollo físico y cognitivo del ser humano. En este sentido, el empleo de los sistemas foto-Fenton pueden ser una alternativa altamente viable y sostenible.

Los resultados obtenidos, aunque preliminares, han demostrado que los procesos foto-Fenton utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  bajo condiciones solares naturales son capaces de reducir significativamente la carga viral en 6 h. Los mejores resultados de desinfección se obtuvieron con 10 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$  y 20 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alcanzando tasas de reducción de 1,8 Log (HAV) y 1,1 Log (MNV-1) en el número de copias de RNA/100 mL, y una reducción del 80% (HAV) y 40% (MNV-1) en su capacidad de infectiva. Es importante señalar que, las modestas temperaturas y radiaciones alcanzadas (sobre todo en los ensayos con MNV-1) demuestran la eficacia relativamente alta del proceso incluso a temperaturas ambientales medias y sin necesidad de una fuente de energía lumínica intensa, lo que indica que el proceso podría ser relativamente eficiente durante todo o gran parte del año. Esto garantiza tasas de eliminación mayores a temperaturas y radiaciones más elevadas, durante épocas más soleadas o en latitudes más favorables.

Uno de los principales retos en este campo es la optimización y maximización de la eficacia del proceso a pH neutro o casi neutro para el tratamiento de agua de consumo o con fines recreativos y con concentraciones admisibles de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El hierro, uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre, puede encontrarse en aguas dulces naturales en niveles desde 0,5 a 50 mg/L. En muchos casos, el hierro está presente en el agua de consumo como resultado de la corrosión de los sistemas de distribución de agua o la utilización de coagulantes de hierro utilizados durante los tratamientos de agua. La OMS no establece ningún valor límite, pero recomienda un nivel provisional de 2 mg/L como ingesta diaria máxima tolerable en agua potable, para evitar su

acumulación excesiva en el organismo (OMS, 2008). El límite de concentración de la normativa europea para el hierro es mucho más restrictivo, situándolo en 200  $\mu\text{g/L}$  (Anon, 1998). El otro reactivo empleado ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es inocuo por cuanto se auto-descompone en agua y oxígeno cuando está disuelto en agua.

Con temperaturas y radiaciones mayores quizá se podrían obtener tasas de eliminación viral similares a concentración menores de hierro y pH más cercano al neutro. La utilización de colectores solares también podría mejorar el proceso aunque la configuración de éste y el modo en que la irradiación incide sobre el colector influye de manera muy importante en la desinfección. Cuando la luz incide de manera continua el proceso es mucho más eficiente y rápido que cuando se producen interrupciones temporales. Esto es un punto clave a tener en cuenta para su aplicación en condiciones de campo (Malato *et al.*, 2009).

Son necesarios más estudios para evaluar la eficacia y limitaciones del proceso desde el punto de vista virológico en otros tipos de aguas o aguas residuales. De hecho, muchos de los factores y mecanismos moleculares que rigen el proceso de inactivación viral son todavía desconocidos. Mientras que otros organismos pueden requerir la difusión del desinfectante a través de una membrana externa para conseguir un efecto inactivador, los virus pueden ser inactivados por reacción directa de los desinfectantes con la cápside viral. Es importante conocer más sobre la interacción del metal con la cápside viral, qué constituyentes de la partícula viral son los más susceptibles a la degradación, o cómo pequeñas diferencias en la composición o estructura del virus (tipo de ácido nucleico, longitud y composición del genoma, estructura y composición de la cápside) podrían afectar a la cinética de desinfección (Kawanishi *et al.*, 2001; Lytle y Sagripanti *et al.*, 2005; Nieto-Juárez *et al.*, 2010; Sigstam *et al.*, 2013).

La tecnología Foto-Fenton, es una alternativa prometedora con un gran potencial para su aplicación, especialmente en la desinfección de aguas residuales con concentraciones de contaminación medias o como tratamiento

terciario. Ciertos avances como la optimización de foto-reactores, la utilización de catalizadores a base de hierro inmovilizado o el empleo de otros catalizadores podrían contribuir a la mejora del proceso. La minimización del consumo de  $H_2O_2$ , principal factor de coste, su generación *in situ* o su reemplazo por otro aceptor de electrones diferente y más eficiente son también estrategias de mejora en un futuro. Todo esto podría aumentar el rango de operación del proceso a otros valores de pH y/o otras longitudes de onda, reducir el consumo de reactivos y/o permitir la separación del catalizador.

La obtención de agua segura y de manera sostenible tanto de consumo como para otros fines como el riego es un punto crucial para nuestra salud y consecuentemente para nuestro desarrollo económico y social. La aplicación y la mejora de los procesos de desinfección solar contribuyen indudablemente a alcanzar dichos fines. En este sentido y a pesar del carácter preliminar de los resultados aquí expuestos, confiamos en que puedan contribuir a llenar un cierto vacío de conocimiento existente en este campo de estudio.



## CONCLUSIONES

---



## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se puede concluir que:

1. La depuración, en condiciones experimentales, reduce de manera significativa la carga viral y por tanto parte del riesgo de infección asociado. Sin embargo, no lo suficiente para garantizar la ausencia de HAV o NoV con capacidad infectiva en el producto final.
2. Se observó una cinética de depuración de dos fases, compartida por las dos especies de moluscos. Una primera fase de rápida reducción de la carga viral inicial durante los 2 o 3 primeros días de depuración, y una segunda fase de ralentización de la tasa depurativa hasta el final del proceso.
3. Existen diferencias importantes en la habilidad depurativa de almejas y mejillones, relacionadas con su capacidad filtradora. Los mejillones alcanzan el umbral de la segunda fase de depuración antes que las almejas, lo que indica una mayor capacidad depurativa o de adaptación al proceso, al menos durante procesos depurativos cortos. Por tanto, es importante comprender la depuración como un proceso ligado al tipo de molusco a depurar, teniendo en cuenta su hábitat natural y características fisiológicas, y no generalista empleando las mismas condiciones para todos los moluscos.
4. La carga viral residual presente al final del proceso, más elevada para MNV-1 que para HAV, indica la existencia en la depuración de otros factores ajenos a la mera capacidad filtradora, de digestión y defecación de los moluscos bivalvos, y apoya estudios previos que indican que ciertas especies virales, en concreto NoV, son acumulados preferencialmente sobre otras.

5. Se desarrolló un modelo matemático atendiendo a principios físicos elementales que puede predecir la carga viral en cualquier momento de la depuración conociendo la tasa de filtración específica del molusco y ciertas propiedades virales específicas relacionadas con la capacidad de un virus determinado de acumularse y persistir dentro de las células y tejidos digestivos. Este modelo puede utilizarse también para el cálculo y evaluación del riesgo para el consumidor y determinar la seguridad de los moluscos depurados, siendo útil no sólo para los productores, sino también para las autoridades responsables de salud pública.

6. Los ensayos bajo condiciones de SODIS mostraron una reducción significativa de los niveles de HAV y MNV-1 tras de 8 h de exposición solar. A pesar de que estas tasas de desinfección viral son más bajas que las observadas en otros estudios para patógenos bacterianos señalan que el método SODIS puede contribuir a reducir el riesgo de infección viral, y apoya su uso como intervención de emergencia para comunidades vulnerables.

7. Se ha demostrado por primera vez que los procesos foto-Fenton utilizando  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  bajo condiciones solares naturales son capaces de reducir significativamente la carga e infectividad viral en 6 h, y con una eficacia relativamente alta incluso a temperaturas ambientales medias y sin necesidad de una fuente de energía lumínica intensa.

## BIBLIOGRAFÍA

---



## 6. BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Bosch, A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3704-3710.
- Acheson, D.W. (1999). Foodborne infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 15: 538-545.
- Acra, A., Jurdi, M., Mu'Allem, H., Karahagopian, Y., Raffoul, Z. (1989). Sunlight as disinfectant. *Lancet*, 1: 280.
- Adams, M.J., King, A.M.Q., Carstens, E.B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 158:2023-2030.
- Agnès, F., Crance, J.M., Lévêque, F. (1994). Separate detection of the two complementary RNA strands of hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*, 49: 323-330.
- 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. *Communicable Disease and Public Health*, 1: 38-40.
- Anonymous (1998). Council Directive 98/83/EC (3 November 1998). On the quality of water intended for human consumption. 330/32-330/54.
- Armon, R., Cabelli, V.J., Duncanson, R. (2007). Survival of F-RNA Coliphages and three bacterial indicators during wastewater chlorination and transport in estuarine waters. *Estuaries Coasts*, 30: 1088-1094.

Arraj, A., Bohatier, J., Laveran, H., Traore, O. (2005). Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 516-524.

Atmar, R.L. (2010). Noroviruses-State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2: 117-126.

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

AWWA (American Water Works Association)(2000). Committee report: disinfection at large and medium sized systems. *Journal of American Water Works Association*, 92: 32-43.

## B

Bae, J., Schwab, K.J., (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 477-484.

Bain, R., Cronk, R., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Bartram, J. (2014). Fecal contamination of drinking-water in low- and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *PloS Medicine*, 11: e1001644.

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

Bayne, B.L., Thompson, R.J., Widdows, J. (1976). Physiology: 1. Feeding and digestion, p. 122-159. In: Bayne, B.L. (ed.), *Marine mussels. Their ecology and physiology*. University Printing House, Cambridge.

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

- Beller, N. (1992). Hepatitis A outbreak in Anchorage, Alaska, traced to ice slush beverages. *Western Journal of Medicine*, 156: 624-627.
- 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.
- Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A. (2013). Shellfish-borne viral outbreaks: A systematic review. *Food and Environmental Virology*, 5: 13-23.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A.M., Estes, M.K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*, 77: 11603-11615.
- Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A. (2000). Inactivation of hepatitis A virus (HAV) in fruits and vegetables by gamma irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 57: 91-97.
- Bidawid, S., Farber, J.M., Satter, S.A., Hayward, S. (2000). Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. *Journal of Food Protect*, 63: 522-528.
- Bishop, N.E., Anderson, D.A. (1997a). Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids. *Archives of Virology*, 142: 2147-2160.
- Bishop, N.E., Anderson, D.A. (1997b). Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Archives of Virology*, 142: 2161-2178.
- 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.
- Bosch, A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: A minireview. *International Microbiology*, 1: 191-196.
- Boschi-Pinto, C., Velebit, L., Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bulletin of World Health Organization*, 86: 710-717.
- Bowen, A., Fry, A., Richards, G., Beuchat, L. (2006). Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infection*, 134: 675-685.
- Boyle, M., Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., Arias-Quiroz, G.B., Iriarte-Puña, M., Ubomba-Jaswa, E., McGuigan, K.G. (2008). Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2997-3001.
- Brack, K., Frings, W., Dotzauer, A., Vallbracht, A. (1998). A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *Journal of virology*, 72: 3370-3376.
- Brion, G., Viswanathan, C., Neelakantan, T.R., Lingeridddy, S., Girones, R., Lees, D., Allard, A., Vantarakis, A. (2005). Artificial neural network prediction of viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5244-5253.
- 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.
- Bucardo, F., Nordgren, J., Carlsson, B., Paniagua, M., Lindgren, P. E., Espinoza, F., Svensson, L. (2008). Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 2573-2580.

- 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.
- Burkhardt, W., Calci, K.R. (2000). Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1375-1378.
- Burroughs, J.N., Brown, E. (1974) Physico-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses. *Journal of General Virology*, 22: 281-286.

### C

- Calder, L., Simmons, G., Thorley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G., Bishop, J. (2003). An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and Infection*, 131: 745-751.
- Cannon, J., Lindesmith, L., Donaldson, E., Saxe, L., Baric, R., Vinje, J. (2009). Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *Journal of Virology*, 83: 5363-5374.
- Cannon, J.L., Papafragkou, E., Park, G.W., Osborne, J., Jaykus, L.A., Vinje, J. (2006). Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection*, 69: 2761-2765.
- Caul, E.O. (1994). Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*, 343: 1240-1242.
- Center, L.W., Knox, R.C. (1991). Septic tank system effects on ground water quality. 4th edition. Lewis Publishers, Inc. Chelsea, UK. p. 198.
- 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 Infection*, 115: 163-167.
- Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N., Margolin, A.B. (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2520- 2525.
- 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.
- Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M.G., Saif, L.J. (2006). Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *Journal of Virology*, 80: 10372-10381.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choim, W.C., Lee, C.H., Kim, S.J. (2009). Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7745–7751.
- Cho, M., Chung, H., Yoon, J. (2003). Disinfection of water containing natural organic matter by using Ozone-initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2284-2291.
- Chong, M.N., Jin, B., Chow, C.W.K., Saint, C. (2010). Recent developments in photocatalytic water treatments technology: a review. *Water Research*, 44: 2997–3027.
- Christensen, B.F., Lees, D., Henshilwood, K., Bjergskov, T., Green, J. (1998). Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1633-1635.

- Chung, H., Jaykus, L.A., Lovelace, G., Sobsey, M.D. (1998). Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Water Science and Technology*, 38: 37-44.
- Chung, H., Sobsey, M.D. (1993). Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science Technology*, 27: 425-428.
- 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, pp. 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.
- Clover, D.O. (1969). Viral infections. In: Riemann, H. (Ed.), *Food-borne infections and intoxications*. Academic Press, New York, pp.73-113.
- Clover, D.O. (1983). Manual on food virology. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
- Clover, D.O. (1994). Epidemiology of viral foodborne disease. *Journal of Food Protection*, 57: 263-266.
- Cohen, J.I., Rosenblum, B., Ticehurst, J.R., Daemer, R.J., Feinstone, S.M., Purcell, R.H. (1987a). Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proceedings of the National Academic of Science, USA*, 84: 2497-2501.
- Cohen, J.I., Ticehurst, J.R., Purcell, R.H., Buckler-White, A., Baroudy, B.M. (1987b). Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus:

- comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *Journal of Virology*, 61: 50-59.
- 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.
- Cooper, P.F. (2001). Historical aspects of wastewater treatment. In: *Decentralized sanitation and reuse concepts, systems and Implementation*. Lens, P., Zeeman, G., Lettinga, G., (Eds). IWA Publishing, London (UK), pp.11-38.
- 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.
- Costa-Mattioli, M., Ferre, V., Monpoeho, S., Garcia, L., Colina, R., Billaudel, S., Vega, I., Perez-Bercoff, R., Cristina, J. (2001a). Genetic variability of hepatitis A virus in South America reveals heterogeneity and co-circulation during epidemic outbreaks. *Journal of General Virology*, 82: 2647-2652.
- Costa-Mattioli, M., Monpoeho, S., Schvoerer, C., Besse, B., Aleman, M.H., Billaudel, S., Cristina, J., Ferré, V. (2001b). Genetic analysis of hepatitis A virus outbreak in France confirms the co-circulation of subgenotypes Ia, Ib and reveals a new genetic lineage. *Journal of Medical Virology*, 65: 233-240.
- 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.
- Cotterelle, B., Drougard, C., Rolland, J., Becharel, M., Boudon, M., Pinede, S., Traoré, O., Balay, K., Pothier, P., Espié, E. (2005). Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries. *EuroSurveillance*, 10.

- Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J., and Roy, S.L. (2010). Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical microbiology reviews*, 23: 507-528.
- Cristina, J., Costa-Mattioli, M. (2007). Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A Virus. *Virus Research*, 127: 151-157.
- Croci, L., Ciccozzi, M., De Medice, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A., Toti, L. (1999). Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 884-888.
- Cromeans, T., Favorou, M., Nianan, O., Margolis, H. (2001). Hepatitis A and hepatitis E viruses. In: *Foodborne Disease Handbook, Vol. 2, Viruses, Parasites and HACCP*. Hui, Y.H., Satter, S.A., Murrel, K.D. Nip, W.K., Stanfield. P.S. (Eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 23-76.
- Crowther, J., Kay, D., Wyer, M.D., (2002). Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in UK: relations with land use and farming practices. *Water Research*, 36: 1725-1734.
- 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. ICTVdb, Index of viruses 2003. Disponibles en <http://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.

**D**

- da Silva, A.K., Le Guyader, F.S., Le Saux, J-C., Pommeypuy, M., Montgomery, M.A. Elimelech, M. (2008). Norovirus removal and particle association in a waste stabilisation pond. *Environmental Science and Technology*, 42: 9151-9157.
- da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommeypuy, M., Eimelech, 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 and Environmental Microbiology*, 24: 7891-7897.
- David, S.T., McIntyre, L., MacDougall, L., Kelly, D., Liem, S., Schallie, K., McNabb, A., Houde, A., Mueller, P., Ward, P., Trottier, Y-L., Brassard, J. (2007). An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically disperse harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne Pathogens Diseases*, 4: 349-358.
- de Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., van den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duzier, E. (2004). Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5089-5093.
- de Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W., Belliot, G. (2011). Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *Journal of Virology*, 85: 4057-4070.
- 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. (2001). 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 Diseases*, 9: 1563-1570.
- Deinhardt, F., Holmes, A.W., Capps, R.B., Popper, H. (1967). Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *Journal of Experimental Medicine*, 125: 673-688.
- Dentinger, C.M., Bower, W.A., Nainan, O.V., Cotter, S.M., Myers, G., Dubusky, L.M., Fowler, S., Salehi, E.D., Bell, B.P. (2001). An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 1273-1276.
- Desenclos, J.C.A., Klontz, K. C., Wilder, M.H., Naiman, O.V., Margolis, H.S., Gunn, R.A. (1991). A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *American Journal of Public Health*, 81: 1268-1272.
- Di Girolamo, R., Liston, J., Matches, J. (1972). Effects of irradiation on the survival of virus in West Coast oysters. *Applied Microbiology*, 24: 1005-1006.
- 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., Formal, S., Buscho, R.F., Kasel, J.A., Chames, R.P., Hornick, R., Chanock, R.M. (1971). Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *Journal of Infectious Diseases*, 123: 307-312.
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E., Manrubia, S.C. (2005). Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Research*, 107: 129-139.

- Domingo, E., Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Reviews of Microbiology*, 51: 151-178.
- Domínguez, A., Vidal, J., Bruguera, M., Salleras, L. (1995). Epidemiología de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13: 50-61.
- Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., LoBue, A.D., Baric, R.S. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature Reviews in Microbiology*, 8: 231-241.
- Dongdem, J.T., Soyiri, I., Ocloo, A. (2009). Public health significance of viral contamination of drinking water. *African Journal of Microbiology Research*, 3: 856-861.
- Doré, W.J., Lees, D.N. (1995). Behaviour of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve mollusks before and after depuration. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2830-2834.
- Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U., Vallbracht, A. (2005). IgA-coated particles of hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of General Virology*, 86: 2747-2751.
- Dowell, S.F., Graves, C., Kirkland, K.B., Cicirello, H.G., Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J. R., Monroe, S.S., Humphrey, C.D., Slemper, C., Dwyer, D.M., Meriwether, R.A., Glass, R.I. (1995). A multistate outbreak of oyster associated gastroenteritis : implications for interstate tracing of contaminated shellfish. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 1497-1503.
- Duffy, L.C., Byers, T.E., Riepenhoff-Talty, M., La Scolea, L.J., Zielezny, M., Ogra, P.L. (1986). The effects of infant feeding on rotavirus-induced gastroenteritis: a prospective study. *American Journal of Public Health*, 76: 259-263.

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M. (2004). Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4538-4543.

Duizer, E., Kroneman, A., Siebenga, J., Verhoef, L., Vennema, H., Koopmans, M. (2008). FBVE network. Typing database for noroviruses. *EuroSurveillance*, 13: 18867.

## E

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, pp. 159-169.

Emerson, S.U., Huang, Y.K., Purcell, R.H. (1993). 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology*, 194: 475-80.

Enders, J.F., Weller, T.H., Robins, F.C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109: 85-87.

Ethelberg, S., Lisby, M., Bottiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelso, C., Muller, L. (2010). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *EuroSurveillance*, 15: 1-3.

Evans, M.R., Meldrum, R., Lane, W., Gardner, D., Ribeiro, C.D., Gallimore, C.I., Westmoreland, D. (2002). An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiology and Infection*, 129: 355-360.

## F

- FAO, 2012. Fish Stat plus 2010. Aquaculture statistics. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>.
- Farthing, M.J.G. (1989). Viruses and the Gut. Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (2005). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, New York, NY.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purceli, R.H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, 182:1026-1028.
- Fewtrell, L., Kaufmann, R., Kay, D., Enanoria, W., Haller, L., Colford, J. (2005). Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 5: 42-52.
- Flannery, J., Rajko-Nenow, P., Winterbourn, J.B., Malham, S.K. Jones, D.L. (2014). Effectiveness of cooking to reduce Norovirus and infectious F-specific RNA bacteriophage concentration in *Mytilus edulis*. *Journal of Applied Microbiology*, 117: 564-571.
- Foley, J.F., Chin, T.D. (1959). Outbreak of nonbacterial gastroenteritis at a boy scout ranch. *Public Health Reports*, 74: 1015-1023.
- Fong, T.T., Lipp, E.K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 357-371.
- Fontán-Sainz, M., Gómez-Couso, H., Fernández-Ibáñez, P., Ares-Mazás, E. (2012). Evaluation of the Solar Water Disinfection Process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* using a 25-L static solar reactor fitted with a

Compound Parabolic Collector (CPC). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 223-228.

## G

Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J. (2007). Interseasonal diversity of norovirus genotypes: Emergence and selection of virus variants. *Archives of Virology*, 152: 1295-1303.

Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fishery Bulletin*, 64: 1-480.

Gamarnik, A.V., Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Development*, 12: 2293-2304.

Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P., Payment, P. (2003). Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 37: 4573-4586.

Gerba, C.P. (2000). Assessment of enteric pathogen shedding by bathers during recreational activity and its impact on water quality. *Quantitative Microbiology*, 2: 55-68.

Gerba, C.P., Choi, C.Y. (2006). Role of irrigation water in crop contamination by viruses. In: Goyar, S., (Ed.). *Viruses in foods*. Springer, US, pp. 257-263.

Gordon, I., Ingraham, H.S., Korn, 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. *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 intracellular membrane rearrangements. *Virology*, 266: 157-159.

- Gosling, E. (2003). How bivalves feed. In: *Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. ISBN 0-85238-234-01, pp. 3987-123.
- Gourmelon, M., Lazure, P., Hervio-Heath, D., Le Saux, J.C., Caprais, M.P., Le Guyader, F.S., Catherine, M., and Pommepuy, M. (2010). Microbial modelling in coastal environments and early warning systems: useful tools to limit shellfish microbial contamination. 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.
- Graff, J., Normann, A., Feinstone, S.M., Flehmig, B. (1994). Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *Journal of Virology*, 68: 548-554.
- Green, K., Chanock, R., Kapikian, A. (2001). Human caliciviruses. In: Knipe, D.M., Howley, M.M. (Eds.). *Fields virology. 4th ed.* Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. pp. 841-874.
- 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.
- Grohmann, G., Greenberg, H., Welch, B., Murphy, A. (1980). Oyster-associated gastroenteritis in Australia: the detection of norwalk virus and its antibody by immune electron microscopy and radioimmunoassay. *Journal of Medical Virology*, 6: 11-19.
- Grohmann, G.S., Murphy, A.M., Christopher, P.J., Auty, E., Greenberg, H.B. (1981). Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters *crassostrea-commercialis*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 59: 219-228.

Grove, S.F., Lee, A., Stewart, C.M., Ross, T. (2009). Development of a high pressure processing inactivation model for hepatitis A virus. *Journal of Food Protection*, 72: 1434-1442.

Gutierrez-Escolano, A.L., Vazquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J., Hernandez-Acosta, J. (2003). La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, 311: 759-766.

## H

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 Diseases*, 164: 852-859.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S. (2006). Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Science and Technology*, 54: 301-308.

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.

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.

- Herdman, W.A., Scott, A. (1896). Report on the investigations carried out in 1895 in connection with the Lancashire Sea-Fisheries Laboratory at the University College, Liverpool. *Proceedings and Transactions of Liverpool Biological Society*, 10: 103-174.
- Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Matsui, S.M., Lewis, T.L., Estes, M.K., Ball, J.M., Brinker, J.P. (1995). Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2511-2513.
- Hewitt, J., Greening, G.E. (2004). Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. *Journal of Food Protection*, 67: 1743-1750.
- Hewitt, J., Greening, G.E. (2006). Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. *Journal of Food Protection*, 69: 2217-2223.
- Hjertqvist, M., Johansson, A., Svensson, N., Abom, P.E., Magnusson, C., Olsson, M., Hedlund, K.O. Andersson, Y. (2006). Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *EuroSurveillance*, 11 (36).
- 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, pp. 911-947.
- Hopkins, E.J. (1958). Epidemic winter vomiting in a general practice. *Medical Officer*, 100: 181.
- Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., Jiang, X. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *Journal of Virology*, 79: 6714-6722.

Hunter, P.R. (1997). *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology*. Wiley, J. & Sons (Eds).

Hutin, Y.J., Sabin, K.M., Hutwagner, L.C., Schaben, L., Shipp, G.M., Lord, D.M., Conner, J.S., Quinlisk, M.P., Shapiro, C.N., Bell, B.P. (2000). Multiple modes of hepatitis A virus transmission among methamphetamine users. *American Journal of Epidemiology*, 152: 186-192.

Hutin, Y.J.F., Pool, V., Cramer, E.H., Nainan, O.V., Weyh, J., Williams, I.T., Golstein, S.T., Gensheimer, K.F., Bell, B.P., Shapiro, C.N., Alter, M.J., Margolis, H.S. (1999). A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. *New England Journal of Medicine*, 340: 595-602.

## I

Ingalls, T.H., Britten, S.A. (1951). Epidemic diarrhea in a school for boys. *Journal of American Medical Association*, 146: 710-712.

International Organization for Standardization (ISO)(2013). ISO/TS 15216-1:2013-03: Microbiology of food and animal feed—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR—Part 1: Method for quantification.

Iwai, M., Hasegawa, S., Obara, M., Nakamura, K., Horimoto, E., Takizawa, T., Kurata, T., Sogen, S-I., Shiraki, K. (2009). Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyoma, Japan (2006 to 2008). *Applied Environmental Microbiology*, 75: 1264-1270.

## J

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, R.W., Siegl, G., Lemon, S.M. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proceedings of the Natural Academic of Science, USA*, 87: 2867-2871.
- Jaykus, L.A., Hemard, M.T., Sobsey, M.D. (1994). Human enteric pathogenic viruses. In: Hackney, C.R., Pierson, M.D. (Eds.). *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman and Hall, New York, pp. 92-153.
- Jiang, X., Wang, J., Graham, D.Y., Estes, M.K. (1992). Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2529-2534.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 195: 51-61.
- Jiménez, B., Drechsel, P., Koné, D., Bahri, A., Raschid-Sally, L., Qadir, M. (2010). Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: Drechsel, P., Scott, C.A., Raschid-Sally, L., Redwood, M., Bahri, A., (Eds.). *Wastewater Irrigation and Health. Assessing and mitigating risk in low-income countries*. London, Earthscan, pp. 3-27.
- 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., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertson, B.H. (2005). Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid

Detection of Hepatitis A Virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3359-3363.

Jubb, G. (1915). The outbreak of epidemic poliomyelitis at West Kirby. *Lancet*, 167.

Jung, P.M., Park, J.S., Park, J.G., Park, J.N., Han, I.J., Song, B.S., Choi, J., Kim, J-H., Byun, M-W., Baek, M., Chung, Y-J., Lee, J-W. (2009). Radiation sensitivity of poliovirus, a model for norovirus, inoculated in oysters (*Crassostrea gigas*) and culture broth under different conditions. *Radiation physics and Chemistry*, 78: 597-599.

## K

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 viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1548-1557.

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 Internal Medicine*, 96: 756-761.

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.
- 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.
- Katzenelson, E., Buium, I., Shuval, H.I. (1976). Risk of communicable disease infection associated with wastewater irrigation in agricultural settlements. *Science*, 194: 944-946.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research*, 488: 65-76.
- Keswick, B.H., Satterwhite, T.K., Johnson, P.C., Dupont, H.L., Secor, S.L., Bitsula, J.A., Gary, G.W., Hoff, J.C. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 261-264.
- Khan, A.S., Moe, C.L., Glass, R.I., Monroe, S.S., Estes, M.K., Chapman, L.E., Jiang, X., Humphrey, C., Pon, E., Iskander, J.K. (1994). Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 318-322.
- Kingsley, D.H, Chen, H. (2009). Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 61-64.
- Kingsley, D.H., Guan, D., Hoover, D.G., Chen, H. (2006). Inactivation of hepatitis A virus by high-pressure processing: the role of temperature and pressure oscillation. *Journal of Food Protection*, 69: 2454-2459.

- Kingsley, D.H., Holliman, D.R., Calci, K.R., Chen, H., Flick, G.J. (2007). Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 581-585.
- Kingsley, D.H., Hoover, D.G., Papafragkou, E., Richards, P. (2002a). Inactivation of hepatitis A virus and calicivirus by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 65: 1605-1609.
- Kingsley, D.H., Meade, G.K., Richards, G.P. (2002b). Detection of both hepatitis A virus and norwalk- like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3914-3918.
- Kirkwood, C.D., Streitberg, R. (2008). Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *Journal of Clinical Virology*, 43: 346-348.
- Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., Zell, R. (2012). Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds). Elsevier, San Diego, pp. 855-880.
- Koff, R.S. (1998). Hepatitis A. *Lancet*, 351: 1643-1649.
- Kohn, M.A., Farley, T.A., Ando, T., Curtis, M., Wilson, S.A., Monroe, S.S., Baron, R.C., MacFarland, L.M., Glass, R.I. (1995). An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. *Journal of American Medical Association*, 273: 466-471.
- Kojima, S., Fukunishi, H., Kusaniia, H., Yamamoto, S., Suzuki, S., Uchida, T., Ishiimaru, 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.

- Koopmans, M., Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 23-41.
- Koopmans, M., Vennemam, H., Heersma, H., van Strienm, E., van Duynhoven, Y., Brown, D., Reacher, M., Lopman, B., European Consortium on Foodborne Viruses, (2003). Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1136-1142.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C-H., Vinge, J., de Medici, D., Monroe, S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 187-205.
- Korsager, B., Hede, S., Boggild, H., Bottiger, B. y Molbak, K. (2005). Two outbreaks of norovirus infections associated with the consumption of imported frozen raspberries, Denmark, May-June 2005. *EuroSurveillance*, 10.
- Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Bottiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Hohne, M., Koch, J., Szucs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J. Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandez-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: 2959-2965.
- Kurosaki, Y., Abe, H., Morioka, H., Hirayama, J., Ikebuchi, K., Kamo, N., Nikaido, O., Azuma, H., Ikeda, H. (2007). Pyrimidine Dimer formation and Oxidative damage in M13 bacteriophage inactivation by Ultraviolet C irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, 78: 349-354.

## L

- Lauber, C., Gorbalenya, A.E. (2012). Toward genetic-based virus taxonomy: comparative analysis of a genetic-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *Journal of Virology*, 86: 3905–3915.
- Le Guyader, F.S., Atmar, R.L. (2008). Binding and inactivation of viruses on and in food, with focus on the role of the matrix. In: *Food-borne viruses: Progress and challenges*. Koopmans, M.P.G., Cliver, D.O., Bosch, A. (Eds.). ASM Press, Washington, DC.
- Le Guyader, F.S., Atmar, R.L., Le Pendu, J. (2012). Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Current Opinion In Virology*, 2: 103–110.
- Le Guyader, F.S., Bon, F., de Medici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M. (2006a). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3878-3882.
- Le Guyader, F.S., Krol, J., Ambert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J-C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L., Le Pendu, J. (2010). Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *Journal 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., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoen-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J. (2006b). Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 931–936.
- Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L., 2004. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 179-186.
- 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 Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., Kindberg, E., Svensson, L. (2006). Mendelian resistance to human norovirus infections. *Seminars in Immunology*, 18: 375-386.
- Le Saux, J.C., Derolez, V., Brest, G., Le Guyader, F.S., Pommepuy, M. (2006). Developing a strategy to limit shellfish viral contamination. In: *Proceedings of the ICMSS 5th International Conference*, Galway, 4-8 June 2004, 342-349.
- Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L. (2008). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. FAO Fisheries Technical Paper. No. 511. Rome, FAO. 2008.
- 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., Domingo, J.S. (Eds.). WHO. IWA Publishing, London, UK.
- Lees, D.N. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 81-116.
- 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., Jansen, R.W., Brown, E.A. (1992). Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine*, 10: 40-44.
- Lemon, S.M., Murphy, P.C., Shields, P.A., Ping, 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.
- Leon, J.S., Kingsley, D.H., Montes, J.S., Richards, G.P., Marshall-Lyon, G., Abdulhafid, G.M., Seitz, S.R., Fernandez, M.L., Teunis, P.F., Flick, G.J., Moe, C.L. (2011). Randomized, Double-Blinded Clinical Trial for Human Norovirus Inactivation in Oysters by High Hydrostatic Pressure Processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 5476-5482.
- 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.
- Lindesmith, L.C., Donaldson, E., Leon, J., Moe, C.L., Frelinger, J.A., Johnston, R.E., Weber, D.J., Baric, R.S. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following norwalk virus infection. *Journal of Virology*, 84: 1800-1815.

- 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:e31.
- Linemeyer, D.L., Menke, J.G., Martin-Gallardo, A., Hughes, J.V., Young, A., Mitra, S.W. (1985). Molecular cloning and partial sequencing of hepatitis A viral cDNA. *Journal of Virology*, 54: 247-255.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S. (2005a). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123: 1-7.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Le Saux, J.C., Cohen, J., Caprais, M.P., Pommepuy, M. (2005b). Rotavirus virus like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6049-6053.
- Lopalco, P.L., Malfait, P., Salmaso, S., Germinario, C., Quarto, M., Barbuti, S. (1997). A persisting outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy, 1996: epidemiological follow up. *EuroSurveillance*, 2: 31-32.
- 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., Torven, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szucs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duynhoven, Y., Koopmans, M. (2004b). Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 363: 682-688.
- Lopman, B.A., Gastañaduy, P., Park, G.W., Hall, A.J., Parashar, U.D., Vinjé, J. (2012). Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current Opinion in Virology*, 2: 96-102.

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 Diseases*, 39: 318-324.

Lytle, C.D., Sagripanti, J.L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *Journal of Virology*, 79: 14244-14252.

## M

Maalouf, H., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S. (2010). Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food and Environmental Virology*, 2: 136-145.

Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S. (2011). Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 3189-3196.

Madeley, C.R., Cosgrove, B.P. (1975). 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 1: 451-452.

Mailhot, G., Sarakha, M., Lavedrine, B., Caceres, J., Malato, S. (2002). Fe(III)-solar light induced degradation of diethyl phthalate (DEP) in aqueous solutions. *Chemosphere*, 49: 525-532.

Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147: 1-59.

Mallet, J.C., Beghian, L.E., Metcalf, T.G., Kaylor, J.D. (1991). Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation. *Journal of Food Safety*, 11: 231-245.

Manso, C.F., Romalde, J.L. (2014). Molecular epidemiology of norovirus from patients with acute gastroenteritis in northwestern Spain. *Epidemiology and Infection*, 17: 1-9.

- 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., Wychowski, C. (1995). Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of Hepatitis A Virus capsid 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.
- Mason, J.A., McLean, W.R. (1962). Infectious hepatitis traced to the consumption of raw oysters. *American Journal of Hygiene*, 75: 90-111.
- Maunula, L., Miettinen, I.T., von Bonsdorff, C.H. (2007). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1716-1721.
- Mbithi, J.N., Springthorpe, V.S., Boulet, J.R., Sattar, S.A. (1992). Survival of Hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 757-763.
- McCaustland, K.A., Bond, W.W., Bradley, D.W., Ebert, J.W., Maynard, J.E. (1982). Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 957-958.
- McGuigan, K.G., Conroy, R.M., Mosler, H.J., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E., Fernandez-Ibañez, P. (2012). Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. *Journal of Hazardous Materials*, 235-236: 29-46.
- McGuigan, K.G., Joyce, T.M., Conroy, R.M., Gillespie, J.B., Elmore-Meegan, M. (1998). Solar disinfection of drinking water contained in transparent

- plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 1138-1148.
- McLeod, C., Hay, B., Grant, C., Greening, G., Day, D. (2009a). Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1220-1230.
- McLeod, C., Hay, B., Grant, C., Greening, G., Day, D. (2009b). Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1809-1818.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 607-625.
- Melnick, J.L. (1995). History and epidemiology of hepatitis A virus. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 2-8.
- Melnick, J.L., Gerba, C.P., Wallis, C. (1978). Viruses in water. *Bulletin of World Health Organization*, 56: 499-508.
- Mesquita, J.R., Barclay, L., Nascimento, M.S.J., Vinjé, J. (2010). Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 980-982.
- Mezzanotte, V., Antonelli, M., Citterio, S., Nurizzo, C. (2007). Wastewater disinfection alternatives: Chlorine, Ozone, Peracetic Acid, and UV Light. *Water and Environmental Research*, 79: 2373-2379.
- Millard, J., Appleton, H., Parry, J.V. (1987). Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. *Epidemiology and Infection*, 98: 397-414.
- 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. Springer Verlag, Viena.
- Molla, A., Paul, A.V., Wimmer, E. (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science*, 254: 1647-1651.
- Morace, G., Kuso, Y., Dzagurov, G., Beneduce, F., Gaus-Müller, V. (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.
- Morris, J.G. (2011). How safe is our food. *Emerging infectious diseases*, 17: 126-128.
- 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.
- Mosley, J.W. (1967). Transmission of viral diseases by drinking water. In: *Transmission of viruses by the water route*. Berg, G. (Ed.). New York, Interscience, p. 5.
- Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., Matsuzaki, Y. (2007). Prolonged norovirus shedding in infants  $\leq 6$  months of age with gastroenteritis. *Pediatric Infectious Diseases*, 26: 46-49.
- Murchie, L., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., Kelly, A.L. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6: 257-270.
- Murphy, A., Grohmann, G., Cristopher, P., Lopez, W., Davey, G., Millsom, R. (1979). An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by norwalk virus. *Medical Journal of Australia*, 2: 329-333.

## N

- Nainan, O.V., Armstrong, G.L., Han, X., Williams, I.T., Bell, B.P., Margolis, H.S. (2005). Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: sources of infection and implications of vaccination policy. *Journal of Infectious Diseases*, 191: 957-963.
- Nainan, O.V., Margolis, H.S., Robertson, B.H., Balayan, M., Brinton, M.A. (1991). Sequence 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.
- Nasir, W., Frank, M., Koppisetty, C., Larson, G., Nyholm, P. (2012). Lewis histo-blood group  $\alpha$ 1,3/ $\alpha$ 1,4 fucose residues may both mediate binding to GII.4 noroviruses. *Glycobiology*, 22: 1163-1172.
- Nenonen, N.P., Hannoun, C., Olsson, M.B., Bergstrom, T. (2009). Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *Journal of Clinical Virology*, 45: 105-108.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F. van der Giessen, J., Kruse, H. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 3-15.

- Ng, T.L., Chan, P.P., Phua, T.H., Loh, J.P., Yip, R., Wong, C., Liaw, C.W., Tan, B.H., Chiew, K.T., Chua, S.B., Lim, S., Ooi, P.L., Chew, S.K., Goh, K.T. et al. (2005). Oyster-associated outbreaks of norovirus gastroenteritis in Singapore. *Journal of Infection*, 51: 413-418.
- Nieto-Juárez, I., Pierzchala, K., Sienkiewicz, A., Kohn, T. (2010). Inactivation of MS2 coliphage in Fenton and Fenton-like systems: role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight. *Environmental Science and Technology*, 44: 3351-3356.
- Nilsson, M., Hedlund, K.O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A., Svensson, L. (2003). Evolution of human calicivirus RNA *in vivo*: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *Journal of Virology*, 77: 13117-13124.
- Niu, M.T., Polish, L.B., Robertson, B.H., Khanna, B.K., Woodruff, B.A., Shapiro, C.N., Miller, M.A., Smith, J.D., Gedrose, J.K., Alter, M.J. y Margoles, H.S. (1992). Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *Journal of Infectious Diseases*, 166: 518-524.
- 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.
- Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., Lindgren, P.E. (2009). Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research*, 43: 1117-1125.
- Nothdurft, H.D. (2008). Hepatitis A vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 7: 535-545.

Nüesch, J.P., de Chastonay, J., Siegl, G. (1989). Detection of defective genomes in hepatitis A virus particles present in clinical specimens. *Journal of General Virology*, 70: 3475-3480.

## O

O'Brien, S.J. (2008). The challenge of estimating the burden of an underreported disease. In: *Food-Borne Viruses*. Koopmans, M., Cliver, D.O., Bosch, A. (Eds.). ASM Press, Washington DC, pp. 87-116.

Ojea, J., Martínez, D., Novoa, S., Pazos, A.J., Abad, M. (2002). Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (L., 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 18: 307-313.

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.

Okoh, A.I., Sibanda, T., Gusha, S.S. (2010). Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7: 2620-2637.

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 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater, Volume 4: Excreta and Greywater Use in Agriculture. [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/wastewater/gsuweg4/en/](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/wastewater/gsuweg4/en/)

OMS 2008. Guidelines for drinking-water quality. Third edition incorporating the first and second agenda. Volume 1, recomendations. ISBN: 9789241547611.

ONU. United Nations (UN) The Millennium Development Goals Report 2013, ISBN 978-92-1- 101284-2.

Osorio, J.E., Hubbard, G.B., Soike, K.F., Girard, M., van der Werf, S., Moulin, J.C., Palmenberg, A.C. (1996). Protection of non-murine mammals against encephalomyocarditis virus using a genetically engineered Mengovirus. *Vaccine*, 14: 155-161.

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.

Owen, G. (1955). Observations on the stomach and digestive diverticula of the lamelibranchia. *Quarternary Journal of Microscopical Science*, 96: 517-537.

## P

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, pp. 211-241.

Papaevangelou, G. (1992). Epidemiology of hepatitis A in Mediterranean countries. *Vaccine*, 10: 63-66.

Parashar, U., Quiroz, E.S., Mounts, A.W., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Noel, J.S., Bulens, S.N., Beard, S.R., Li, J.F., Bresee, J.S., Glass, R.I. (2001). Norwalk-like viruses. Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recommendations and Reports*, 50: 1-17.

- Parra, G., Abente, E., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S., Bok, K., Green, K. (2012). Multiple antigenic sites are involved in blocking the interaction of GII.4 norovirus capsid with ABH Histo-Blood Group Antigens. *Journal of Virology*, 86: 7414-7426.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, 297: 86-89.
- Patel, M.M., Hall, A.J., Vinje, J., Parashar, U.D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, 44: 1-8.
- Paul, A.V. (2002). Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In: *Molecular Biology of Picornaviruses*. Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.). ASM Press, Washington, DC, pp. 227-246.
- Payment, P., Richardson, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M., Franco, E. (1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *American Journal of Public Health*, 81: 703-707.
- Pechenik, J.A. (1991). *Biology of the invertebrates*, 2nd ed. WCB Publishers, Dubuque, Iowa.
- Petrignani, M., Harms, M., Verhoef, L., van Hunen, R., Swaan, C., van Steenberghe, J., Boxman, I., Peran i Sala, R., Ober, H.J., Vennema, H., Koopmans, M., van Pelt, W. (2010). Update: A food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *EuroSurveillance*, 15.
- Phillips, G., Tam, C.C., Conti, S., Rodrigues, L.C., Brown, D., Iturriza-Gomara, M., Gray, J., Lopman, B. (2010). 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.

- Pignatello, J.J., Oliveros, E., McKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36: 1-84.
- Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, 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.
- Polish, L.B., Robertson, B.H., Khanna, B., Krawczynski, K., Spelbring, J., Olson, F., Shapiro, C.N. (1999). Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3615-3617.
- Polo, D., Vilariño, M.L., Manso, C.F., Romalde, J.L. (2010). Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 1036–1038.
- Pommepuy, M., Hervio-Heath, D., Caprais, M-P., Gourmelon, M., Le Saux, J-C., Le Guyader, F.S. (2005). Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach. In: *Oceans and Health, Pathogens in the marine environment*. Belkin, S., Colwell R.R. (Eds). Springer, New York, NY, pp. 331-360.
- Pontrelli, G., Boccia, D., Di Renzi, M., Massari, M., Giugliano, F., Celentano L. P., Taffon, S., Genovese, D., Di Pasquale, S., Scalise, F., Rapietta, M., Croci, L., Salmaso, S. (2008). Epidemiological and virological characterization of a large community-wide outbreak of hepatitis A in southern Italy. *Epidemiology and Infection*, 136: 1027-1034.
- Pöyry, T., Kinnunen, L., Hovi, T. (1992). Genetic variation *in vivo* and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *Journal of Virology*, 66: 5313-5319.

- Prato, R., Lopalco, P.L., Chironna, M., Barbuti, G., Germinario, C., Quarto, M. (2004). Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infectious Diseases*, 4: 1-6.
- 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.

## Q

- Quested, T.E., Cook, P.E., Gorris, L.G., Cole, M.B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 29-42.

## R

- Racaniello, V.R. (2001). Picornaviridae: the viruses and their replication. In: *Fields virology. 4th ed.* Knipe, D.M., Howley, P.M., (Eds.). Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, pp. 685-722.
- 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.
- Ramsay, C.N., Upton, P.A. (1989). Hepatitis a and frozen raspberries. *Lancet*, 1: 43-44.
- Reid, T.M., Robinson, HG. (1987). Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiology and Infection*, 98: 109-112.

- 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., (1988). Microbial purification of shellfish a review of depuration and relaying. *Journal of Food Protection*, 51: 218-251.
- Richards, G.P., (2001). Food-borne pathogens: enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27: 117-125.
- Richards, G.P., McLeod, C., Le Guyader, F.S. (2010). Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. *Food and Environmental Virology*, 2: 183-193.
- 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.
- Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K., Ishizu, T., Moritssugu, Y., Lemon, M. (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 genetic variation. *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 Diseases*, 35: 246-253.

- Rockx, B.H., Vennema, H., Hoebe, C.J., Duizer, E., Koopmans, M.P. (2005). Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 191: 749-754.
- Rodriguez-Lazaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M.S.J., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C.H., de Roda Husman, A.M., Hernandez, M., van der Poel, W.H.M. (2012). Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 786-814.
- 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 molluscs 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., Szücs, G., Atmar, R.L., Woodley, 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.
- 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, B. (1956). Hepatitis epidemic conveyed by oysters. *Svensk Lakartidn*, 53: 989-1003.
- Rosenthal, P. (1998). Hepatitis A vaccine: current indications. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27: 111-113.

## S

- Sánchez-Tapias, J.M. (1995). Virus de la hepatitis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13: 3-15.
- Sánchez, G., Bosch, A., Gómez-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.
- Sanchez, G., Pintó, R., 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.
- Sattar, S.A., Tetro, J.A. (2001). Other foodborne viruses. In: *Foodborne Disease Handbook, 2nd ed., vol. 2*. Hui, Y.H., Sattar, S.A., Murrell, K.D., Nip, W.K., Stantfield, P.S. (Eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 127-163.
- Scallan, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Hoekstra, R.M. (2011b). Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 16-22.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011a). Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 7-15.
- Schijven, J.F., Hassanizadeh, S.M. (2000). Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes and parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 30: 49-127.
- Schmid, R. (2001). History of viral hepatitis: A tale of dogmas and misinterpretations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16: 718-722.

- Scholz, E., Heinrichy, U., Flehmig, B. (1989). Acid stability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, 70: 2481-2485.
- Schwab, K. J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G., Atmar, R.L. (1998). Distribution of norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT- PCR. *Journal of Food Protection*, 61: 1674-1680.
- Sheretz, R.J., Russell, B.A., Reunman, P.D. (2005). Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Archives of Internal Medicine*, 144: 1579-1580.
- Shieh, Y.C., Khudyakov, Y.E., 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, W., Baris, R.S. (2000). Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *Journal of Infectious Disease*, 181: 360-366.
- Shirato, H. (2011). Norovirus and histoblood group antigens. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 95-103.
- Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K., Takeda, N. (2008). Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology*, 82: 10756-67.
- Siebenga, J.J., Beersma, M.F., Vennema, H., van Biezen, P., Hartwig, N.J., Koopmans, M. (2008). High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *Journal of Infectious Diseases*, 198: 994- 1001.

- 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.
- Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B.M., Wigginton, K.R., Kohn, T. (2013). Subtle Differences in Virus Composition Affect Disinfection Kinetics and Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3455-3467.
- Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. (2008). Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 36:2530-2546.
- Simmons, G., Garbutt, C., Hewitt, J., Greening, G. (2007). A New Zealand outbreak of norovirus gastroenteritis linked to the consumption of imported raw Korean oysters. *New Zealand Medical Journal*, 120.
- Simon, A., Schildgen, O., Maria Eis-Hübinger, A., Hasan, C., Bode, U., Buderus, S., Engelhart, S., Fleischhack, G. (2006). Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41: 693-9.
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P. (2009). Viruses in recreational waterborne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1769-80.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., Tauxe, R.V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67: 2342-2353.

- Smillie, J.W., Howitt, B.F., Denison, G.A. (1948). An epidemic of acute watery diarrhea in Alabama. *Public Health Reports*, 63: 233-243.
- Sobsey, M., Shields, P., Hauchman, F., Davis, A., Rullman, V., Bosch, A. (1988). Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: *Viral Hepatitis and liver disease*. Zuckermann, A. (Ed.). Alan Liss, New York, pp. 121-124.
- Sommer, B., Mariño, A., Solarte, Y., Salas, M.L., Dierolf, C., Valiente, C., Mora, D., Rechsteiner, R., Setter, P., Wirojanagud, W., Ajarmeh, H., Al-Hassan, A., Wegelin, M. (1997). SODIS - an emerging water treatment process. *Journal of Water SRT – Aqua*, 46: 127-137.
- Stene-Johansen, K., Jennum, 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.
- Straub, T.M., zu Bentrup, K.H., Orosz-Coghlan, H.P., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan M., Nickerson, C.A. (2007). *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging and Infectious Diseases*, 13: 396-403.
- Subekti, D.S., Tjaniadi, P., Lesmana, M., McArdle, J., Iskandriati, D., Budiarsa, I.N., Walujo, P., Suparto, I.H., Winoto, I., Campbell, J.R., Porter, K.R., Sajuthi, D., Ansari, A.A., Oyofu, B.A. (2002). Experimental infection of *Macaca nemestrina* with a Toronto Norwalk-Like virus epidemic viral gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 66: 400-406.

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.

Sugieda, M., Nakajima, K., Nakajima, S. (1996). Outbreaks of Norwalk like virus associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiology and Infection*, 116: 339-346.

## T

Tan, M., Jiang, X. (2007). Norovirus–host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9: 1-22.

Tan, M., Jiang, X. (2010). Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathogens*, 6: e1000983.

Tan, M., Jiang, X. (2011). Norovirus -host interaction: multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiology*, 19: 382-388.

Tang, Q., Li, D., Xu, J., Wang, J., Zhao, Y., Li, Z., Xue, C. (2010). Mechanism of inactivation of murine norovirus-1 by high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 137: 186-189.

Tauxe, R.V., Doyle, M.P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J., Stein, C.E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 16-28.

Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R. (2008). Particle-associated viruses in water: impacts on disinfection processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38: 137-164.

Tesar, M., Jia, X.Y., Summers, D.F., Ehrenfeld, E. (1993). Analysis of a potential myristoylation site in Hepatitis A Virus capsid protein VP4. *Virology*, 194: 616-626.

- Teunis, P.F.M., 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*, 5: 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., Engelbrektsen, 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.
- Ticehurst, J.R., Racaniello, V.R., Baroudy, B.M., Baltimore, D., Purcell, R.H., Feinstone, S.M. (1983). Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proceedings of the National Academic of Science, USA*, 80: 5885-5889.
- Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Smith, H.R., Eglin, R.P., Wheeler, J.G., Brett, M.M., Owen, R.J., Brazier, J.S., Cumberland, P., King, V., Cook, P.E. (1999). A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Communicable Diseases and Public Health*, 2: 108-113.
- 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*, 17: 15-18.
- 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.

Tree, J.A., Adams, M.R., Lees, D.N. (2003). Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2038-2043.

Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Balayan, M.S., Ticehurst, J., Purcell, R.H. (1991). Simian Hepatitis A Virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *Journal of general Virology*, 72: 1677-1686.

## U

Ueda, T., Horan, N.J. (2004). Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Research*, 34: 2151-2159.

Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Omura, T. (2007). Persistence of Caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5698-5701.

## V

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 and Infectious Diseases*, 6: 36-41.

Vaughan, G., Goncalves-Rossi, L.M., Joseph, C., Forbi, de Paula, V.S., Purdy, M.A., Xia, G., Khudyakov, Y.E. (2014). Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 227-243.

Verhoef, L., Vennema, H., van Pelt, W., Lees, D., Boshuizen, H., Henshilwood, K., Koopmans, M. (2010). Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 617-624.

- Vinje, 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.
- Vinje, 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 Virological Methods*, 116: 109-117.
- Vinje, 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.
- Vinje, J., Vennema, H., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S.S., Monroe, S.S., de Bruin, E., Svensson, L., Koopmans, M.P. (2003). International collaboration to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1423-1433.

## W

- Wang, D., Wu, Q., Kou, X., Yao, L., Zhang, J. (2008). Distribution of norovirus in oyster tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1966-1972.
- Warner, R.D., Carr, R.W., McCleakdey, F.K., Johnson, P.C., Elmer, L.M.G., Davison, V.E. (1991). A large nontypical outbreak of Norwalk virus. Gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*. *Archives of Internal Medicine*, 151: 2419-2424.
- Webby, R.J., Carville, K.S., Kirk, M.D., Greening, G., Ratcliff, R.M., Creara, S.K., Dempsey, K., Sarna, M., Stafford, R., Patel, M., Hall, G. (2007). Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clinical and Infectious Disease*, 44: 1026-1031.

- Wegelin, M., Canonica, S., Mechsner, K., Fleischmann, T., Pesaro, F., Metzler, A. (1994). Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water SRT – Aqua*, 4: 154-169.
- Westrel, T., Dusch, V., Ethelberg, S., Harris, J., Hjertqvist, M., Jourdan-da Silva, N., Koller, A., Lenglet, A., Lisby, M., Vold, L. (2010). Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark. *EuroSurveillance*, 15: 19524.
- Wheeler, C., Vogt, T.M., Armstrong, G.L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O.V., Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T.M., Highbaugh-Battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M.A., Williams, I.T., Fiore, A.E., Bell, B.P. (2005). An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *New England Journal of Medicine*, 353: 890-897.
- 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.
- White, G.C. (1999). Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants, 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
- Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin, H.W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology*, 2:432.
- Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of Virology*. 80: 5105-5112.
- World Water Assessment Programme (WWAP). The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk. Paris, UNESCO, 2012.

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.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, 45: 1025-1038.

## X

Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K., Estes, M.K. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, 250: 1580-1583.

## Z

Zahorsky, J. (1929). Hyperemesis hiemis or the Winter vomiting disease. *Archives of paediatrics*, 46: 391-395.

Zakhour, M., Maalouf, H., di Bartolo, I., Haugarreau, L., Le Guyader, F.S., Ruvoen-Clouet, N., Le Saux, J-C., Ruggeri, F.M., Pommeypuy, M., Le Pendu, J. (2010). Bovine norovirus ligand, environmental contamination and potential cross-species transmission via oyster. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6404-6411.

Zakhour, M., Ruvoen-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., Le Pendu, J. (2009). The gal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus newbury 2 expected to prevent cross-species transmission. *PloS Pathogens*, 5: e1000504.

Zhang, H., Chao, S.F., Ping, L.H., Grace, K., Clarke, B., Lemon, S.M. (1995). An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology*, 212: 686-97.

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.