

1. Origen i distribució dels virus a l'ambient

Els primers aïllaments descrits de virus en aigua daten dels anys trenta i quaranta, i es centraven en la detecció de poliovirus i altres enterovirus en femtes i aigües residuals (Griffin i col., 2003). Estudis molt posteriors han establert que els ecosistemes aquàtics contenen quantitats variables de virus que constitueixen de forma natural un component universal de la comunitat planctònica microbiana. La concentració de virus en aigües naturals no contaminades (aigües marines i llacs) s'estima entre 10^5 i 10^8 partícules per ml (Berg i col., 1989; Børsheim, 1993; Maranger i Bird, 1995; Pina i col., 1998a). També s'ha descrit que calicivirus marins excretats a la columna d'aigua per mamífers (balenes, lleons marins) poden causar malaltia en porcs (exantema vesicular) i en humans (Smith i col., 1998). En aquest mateix estudi es va determinar per microscòpia electrònica que les balenes infectades podien arribar a excretar fins a 10^6 calicivirus per gram de femta.

La majoria de la població mundial viu al llarg de les costes i, sovint, les aigües residuals s'aboquen directament o indirectament

a les aigües costaneres. Molts dels virus que es transmeten per la via fecal-oral són àmpliament prevalents en la població i els individus infectats poden excretar milions de partícules víriques en les seves femtes (10^{10} rotavirus g^{-1} , 10^6 enterovirus g^{-1} , 10^8 virus de l'hepatitis A g^{-1}) (Griffin i col., 2003). És per això que molts tipus de virus es troben en grans quantitats en les aigües residuals. Els diferents tractaments de l'aigua residual, quan es donen, només els eliminen de forma molt parcial (Sorber, 1983; Baggi i col., 2001) de manera que constantment hi ha un alliberament de virus humans al mar. Després de l'excreció a l'ambient, els virus poden sobreviure de setmanes a mesos (Nasser, 1994; Callahan i col., 1995; Gantzer i col., 1998) ja sigui a la columna d'aigua o adsorbint-se a material particulat que s'acumula als sediments (Figura 1). Així, els mol·luscs bivalves recol·lectats en zones contaminades per aigües residuals poden contenir virus patògens humans. A més, la supervivència dels virus es veu augmentada un cop adsorbits als teixits del mol·lusc (Potasman i col., 2000).

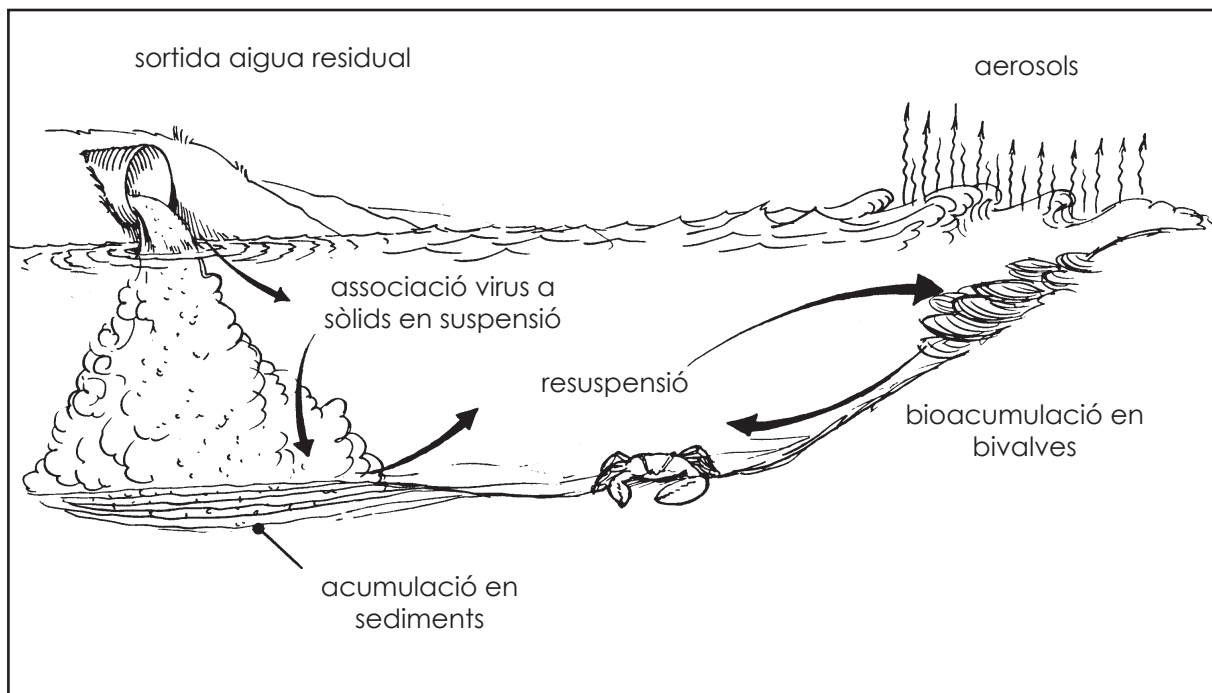


Figura 1. Cicle de contaminació vírica en ambients costaners (adaptat de Melnick i col., 1980)

Cal dir que les vies de transmissió dels virus en el medi ambient són molt diverses (Figura 2); de fet s'ha comprovat que la població pot adquirir una infecció mitjançant diferents vies, les quals inclouen:

- Ingestió d'aigua contaminada.
- Ingestió de mol·luscs bivalves crus o poc cuinats que hagin crescut en aigües contaminades.
- Ingestió de vegetals irrigats amb aigües no suficientment tractades o cultivats en camps on s'han fet servir com a adob fangs de depuradores que contenen virus infecciosos.
- Bany en aigües que reben aportacions d'aigua contaminada.
- Contacte amb aerosols generats a partir d'aigües contaminades.

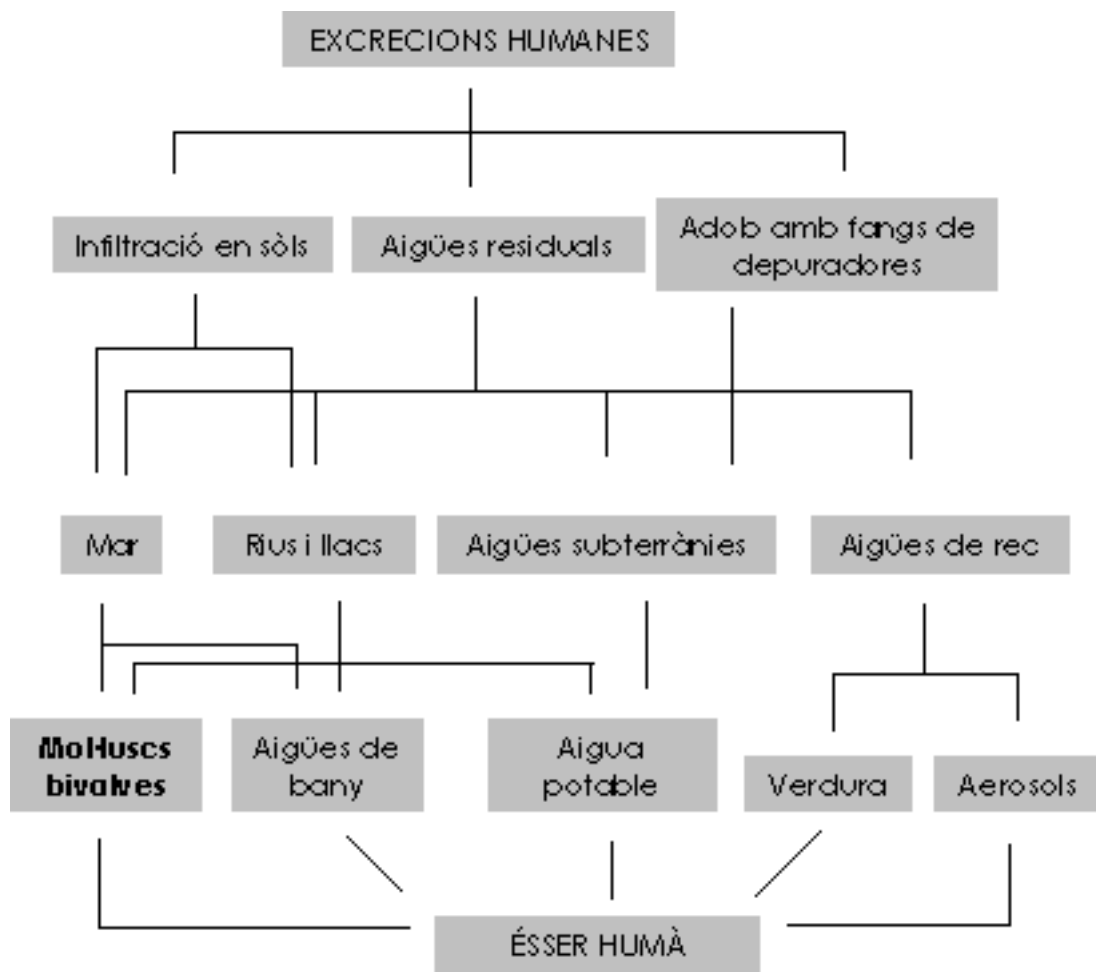


Figura 2. Vies de transmissió dels virus humans en l'ambient hídric (adaptat de Schwartzbrod, 1991).

Taula 1. Virus humans excretats a l'ambient (a partir de van Regenmortel i col., 2000)*

Família	Gènere	Genoma	Diàmetre	Principals virus	Malalties associades
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	ADNdc linial 36-38 kb	70-90 nm	Adenovirus humans	Infeccions respiratòries, oculars, urinàries, gastroenteritis
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Poliomavirus</i>	ADNdc circular 5,2 kb	42-45 nm	JC BK	Leucoencefalopatia multifocal progressiva Nefropatia, cistitis hemorràgica, estenosi uretèrica
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	ARNcs(+) linial 7-8 kb	27-30 nm	Poliovirus Coxsackievirus A i B Echovirus humans	Infeccions del sistema nerviós, oculars i respiratòries
	<i>Hepatovirus</i>			Virus de l'hepatitis A	Hepatitis A
	<i>Parechovirus</i>			Parechovirus 1 i 2	Gastroenteritis, infeccions respiratòries
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	ARNcs(+) linial 7,5-7,7 kb	35-40 nm	Virus de Norwalk	Gastroenteritis
	<i>Sapovirus</i>			Virus de Sapporo	Gastroenteritis
-----	<i>Virus Hepatitis-E-like</i>	ARNcs(+) linial 7,2 kb	28-32 nm	Virus de l'hepatitis E	Hepatitis E
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	ARNdc segmentat	65-80 nm	Reovirus	Gastroenteritis?
	<i>Rotavirus</i>			Rotavirus humans	Gastroenteritis
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus</i>	ARNcs(+) linial 6,8-7,9 kb	28 nm	Astrovirus	Gastroenteritis

*dc: doble cadena; cs: cadena senzilla; (+): polaritat positiva

2. Virus humans presents a l'ambient

Una de les principals característiques dels virus és que són paràsits intracel·lulars obligats, és a dir, depenen exclusivament d'una cèl·lula hoste viva per a poder replicar-se. Això suposa que no poden multiplicar-se ni a l'ambient ni a cèl·lules mortes i per tant, la seva presència tant en l'ambient com en aliments només es dona per un esdeveniment de contaminació. Tanmateix, els virus són capaços de resistir molt bé a les diferents condicions ambientals. Així, Callahan (1995) va trobar que el virus de l'hepatitis A podia persistir en aigua de mar a 20°C durant 30 dies, tot i que observà una reducció de 4 log₁₀ respecte els títols inicials. També s'ha establert la supervivència de virus dins o a la superfície d'aliments després de donar-se la contaminació. A més a més, els diferents tractaments als quals es sotmet el marisc abans del seu consum (refrigeració o congelació) milloren la supervivència dels virus. De fet, aquests són els tractaments que es duen a terme al laboratori per tal de conservar els virus.

Tots els virus patògens humans relacionats amb el medi marí i dels quals se sap que suposen un risc per a la salut pública es transmeten per la via fecal-oral. Aquest grup, conegut com a virus entèrics, creix contínuament. En la Taula 1 es resumeixen les característiques dels principals virus presents a l'ambient. Els virus entèrics pertanyen a les famílies *Adenoviridae* (adenovirus humans 3, 7, 40 i 41), *Caliciviridae* (virus de Norwalk, agent Snow Mountain), *Astroviridae*, *Picornaviridae* (poliovirus, coxsackievirus, echovirus, enterovirus 68-71 i virus de l'hepatitis A) i *Reoviridae* (reovirus i rotavirus). Els virus entèrics estan associats a diverses malalties, des d'infeccions oculars i respiratòries fins a gastroenteritis, hepatitis, miocarditis i meningitis asèptica. La gent gran, els infants i els malalts immunocompromesos són els grups més susceptibles i que major probabilitat tenen de desenvolupar infeccions severes (Gerba i col., 1996).

2.1. Adenovirus

Els adenovirus es van descriure per primera vegada al 1953 per Rowe i col. (Lees, 2000). Són virus icosaèdrics no embolcallats d'uns 80 nm de diàmetre amb genoma d'ADN de doble cadena no segmentat (Taula 2, Figura 3). Originalment, es van aïllar d'adenoides i poden infectar humans, ocells i altres animals provocant infeccions de tipus respiratori,

ocular i gàstric entre altres. Fins avui, s'han descrit 51 serotips capaços d'infectar éssers humans que s'agrupen en 6 subespècies (Taula 3). Els adenovirus entèrics 40 i 41 són difícilment cultivables, raó per la qual se'ls anomena virus "enutjosos" (*fastidious*), i estan associats amb gastroenteritis (Wadell i col., 1994) d'origen alimentari (Fleet i col., 2000). Els adenovirus entèrics causen el 10% de gastroenteritis infantils i representen la segona causa d'hospitalització per diarrea en nens després dels rotavirus. Els símptomes clínics en nens són diarrea, vòmits i febre. Tant els adenovirus entèrics com els no entèrics, aquest últims associats amb altres tipus d'infeccions com les respiratòries, són excretats i poden aïllar-se en femta. Tot i que s'han aïllat adenovirus en aigües residuals, aigua de mar i mol·luscs bivalves, no hi ha evidències de cap brot relacionat amb el consum de marisc, però sí d'altres brots d'origen alimentari (Fleet i col., 2000).

Taula 2. Característiques dels adenovirus humans

Família	<i>Adenoviridae</i>
Gènere	<i>Mastadenovirus</i>
Serotips	51
Genotips	Més de 200 segons patrons de restricció
Àcid nucleic	ADN linial de doble cadena amb una proteïna de 55 kDa unida covalentment a l'extrem 5'
Mida del genoma	36-38 kb
Morfologia	70-90 nm, càpside icosaèdrica, sense embolcall
Densitat de flotació	1,33-1,34 g/cm ³ en clorur de cesi
Teixits diana	Sistema respiratori, conjuntiva, intestí, tracte urinari, teixit limfàtic
Replicació	Nucli cel·lular
Proteïnes estructurals	II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, TP
Proteïnes no estructurals	E1A, E1B, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4, L5

2.2. Picornavirus

Els *Picornaviridae* inclouen importants patògens humans i animals i constitueixen una família molt gran i diversa de virus ARN

Taula 3. Classificació dels adenovirus humans

Subespècies	Serotips	Principals símptomes i comentaris
A	12, 18, 31	Ad 31: infecció gastrointestinal
B1	3, 7, 16, 21, 51	Infeccions respiratòries
B2	14, 11, 34, 35	Infeccions del tracte urinari
C	1, 2, 5, 6	Infeccions respiratòries Ad 1, 2 i 5 són aïllats freqüentment Infeccions latents del teixit limfàtic
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-50	Queratoconjuntivitis Ad 8, 19 i 37 són els més freqüentment aïllats Ad 42-47 aïllats en pacients amb SIDA
E	4	Conjuntivitis Infeccions respiratòries
F	40, 41	Gastroenteritis en nens i adults joves

de polaritat positiva. S'han descrit més de 230 serotips que s'agrupen en nou gèneres: *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Rhinovirus*, *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Teschovirus*, *Erbovirus* i *Kobuvirus*, a aquest darrer pertany el patògen humà virus d'Aichi (ICTV, 2003). Els primers quatre gèneres comprenen patògens humans de gran

importància. La majoria dels picornavirus són específics d'una o molt poques espècies hostes i són fàcilment cultivables. Els enterovirus i els rinovirus, molt propers en termes moleculars, són els picornavirus humans més freqüents (Figura 4). Els picornavirus entèrics més importants són els parechovirus, els enterovirus, i el virus de l'hepatitis A.

Figura 3. Organització genòmica dels adenovirus. Les fletxes indiquen la direcció de la transcripció de les diferents unitats. Ori, origen de replicació; TP, proteïna terminal; Pol, polimerasa; E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4 gens primerencs; L1, L2, L3, L4, L5, I1, I2, I3, IX gens tardans; ML gens tardans majoritaris.

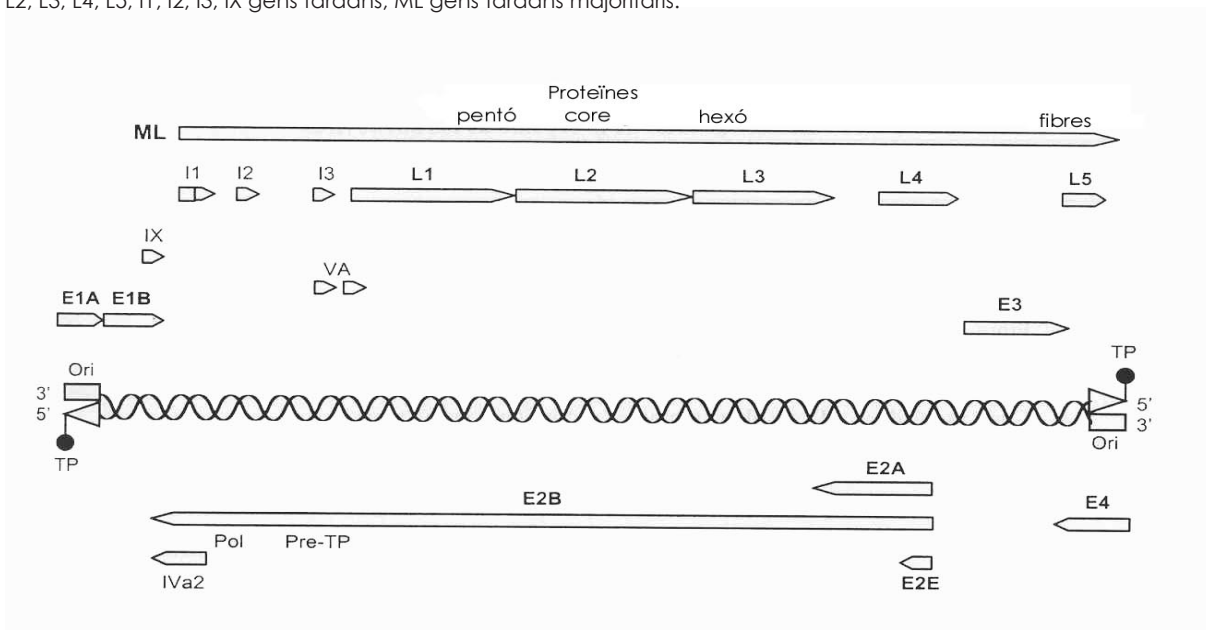
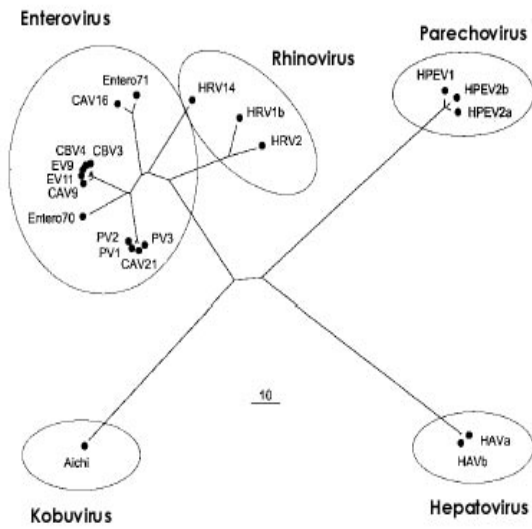


Figura 4. Arbre filogenètic basat en la proteïna 3D^{POL} dels picornavirus humans. Escala = 10% de divergència aminoacídica (adaptat de Stanway i col., 2000).



2.2.1. Parechovirus

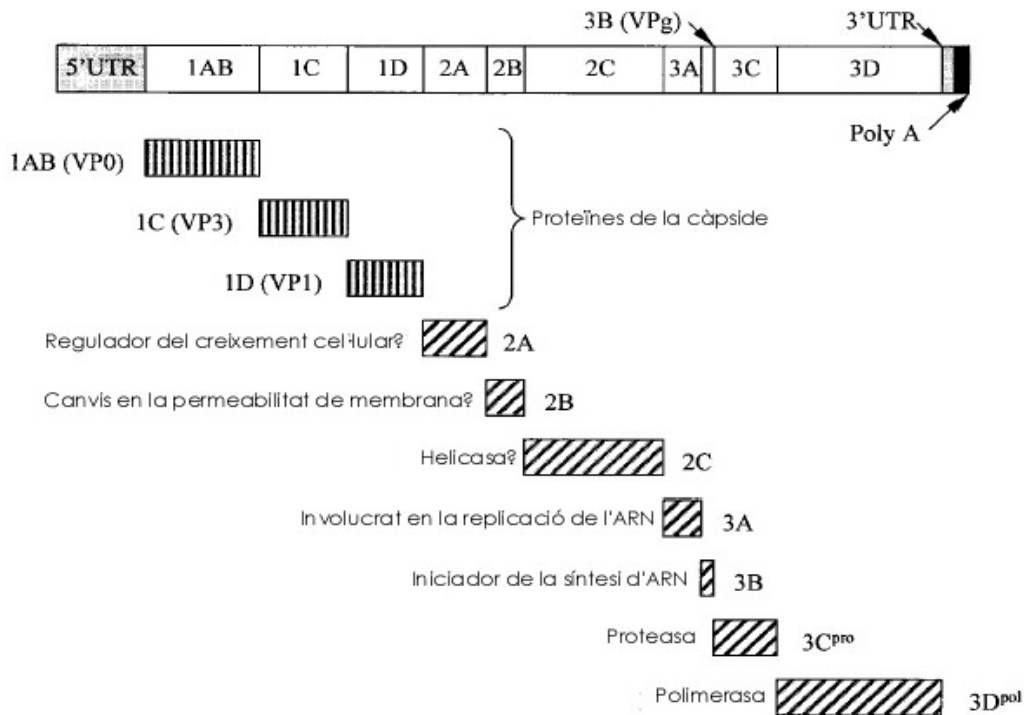
Dels nou gèneres actuals de la família dels picornavirus, *Parechovirus* és un dels més recentment descrits i la seva espècie tipus és el patògen humà parechovirus tipus 1 (HPeV1), fins fa poc, echovirus 22. En aquest gènere també trobem el HPeV2, abans echovirus 23. Com els altres picornavirus, són virus ARN,

Taula 4. Característiques dels parechovirus

Família	<i>Picornaviridae</i>
Gènere	<i>Parechovirus</i>
Virus humans	Parechovirus 1 i 2
Àcid nucleic	ARN linal amb seqüència de reconeixement de ribosomes (IRES) de tipus 2 a 5'NTR i cua de poliA
Mida del genoma	7-8 kb
Morfologia	Càpside icosaèdrica, sense embolcall
Teixits diana	Tracte gastrointestinal, vies respiratòries, sistema nerviós
Replicació	Vesícules de membrana
Proteïnes estructurals	1AB, 1C, 1D
Proteïnes no estructurals	2A, 2B, 2C, 3A, 3C ^{PRO} , 3D ^{POL}

sense embolcall i càpside icosaèdrica que conté un genoma ARN de cadena senzilla (Taula 4, Figura 6). Dades de l'OMS mostren que un 29% dels casos d'infecció per HPeV1 són de pacients amb gastroenteritis i un 26% amb infeccions respiratòries. El principal símptoma provocat és la diarrea, però també

Figura 5. Organització genòmica dels parechovirus (adaptat de Stanway i col., 2000)



s'ha associat amb enterocolitis necrotitzant. S'han descrit molt poques infeccions per HPeV2 des de la seva primera descripció al 1961 (Stanway i col., 2000).

2.2.2. Enterovirus

El virió dels enterovirus (Minor i col., 1990), de 27 nm de diàmetre, és rodó i no embolcallat. Presenten un genoma ARN no segmentat de cadena senzilla en sentit positiu (Figura 6, Taula 5). En el gènere enterovirus s'inclouen diferents virus humans com ara poliovirus, coxsackievirus A i B, echovirus, i els enterovirus 68, 69 i 70. Els enterovirus humans causen infeccions en tots els grups d'edat. Es repliquen al tracte intestinal on acostuma a donar-se una infecció lleu o subclínica. No obstant, poden arribar a infectar altres òrgans i causar malalties greus i fins i tot, fatals. Encara que els enterovirus es repliquen al tracte intestinal i s'excreten en grans quantitats en femtes, no solen causar els típics símptomes gastrointestinals com vòmits i diarrea, però sí poden causar poliomeilitis, meningitis asèptica i conjuntivitis hemorràgica. Donada la seva prevalença i la facilitat per cultivar-los, s'han utilitzat durant molts anys com a marcadors de contaminació vírica en l'ambient. No obstant, no s'ha relacionat la seva presència en mol·luscs bivalves amb la transmissió de les malalties causades pels enterovirus.

Taula 5. Característiques dels enterovirus

Família	Picornaviridae
Gènere	Enterovirus
Virus humans	Coxsackievirus, echovirus, poliovirus, enterovirus
Àcid nucleic	ARN linial de cadena simple i polaritat positiva, poliadenilat. Seqüència d'unió a ribosomes (IRES) a 5'.
Mida del genoma	7-8 kb
Morfologia	27-30 nm, càpside icosaèdrica, sense embolcall
Densitat de flotació	1,30-1,34 g/cm ³ en clorur de cesi
Teixits diana	Sistema nerviós, amígdales, plaques de Peyer, intestí prim, nòduls limfàtics
Replicació	En complexos associats amb la membrana citoplasmàtica
Proteïnes estructurals	1A, 1B, 1C, 1D
Proteïnes no estructurals	Proteïnasa 2A ^{PRO}

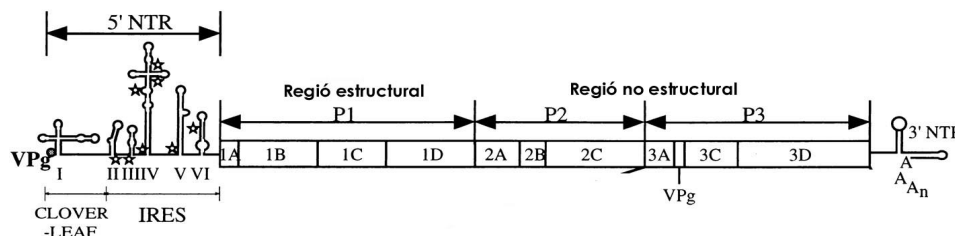


Figura 6. Genoma de poliovirus 1, espècie tipus del gènere enterovirus (adaptat de Xiang i col., 1998)

2.2.3. Virus de l'hepatitis A

El virus de l'hepatitis A és l'únic membre del gènere *Hepatovirus* dins els picornavirus (Taula 6). El seu genoma consta d'ARN de cadena senzilla amb polaritat positiva i està altament conservat (Figura 7). De fet, només s'han identificat 4 genotips i un sol serotip de VHA (White i Fenner, 1994). El virió es caracteritza per ser molt estable en l'ambient. Es multiplica al fetge i després d'un període d'incubació de 4 setmanes provoca febre, diarrea, dolor abdominal i icterícia. La infecció és autolimitant i rarament causa la mort, encara

que els malalts poden estar incapacitats durant mesos. Durant la infància provoca una infecció lleu, sovint asimptomàtica, mentre que la majoria d'adults desenvolupen hepatitis. La recuperació de la malaltia és completa i causa immunitat a llarg termini contra la reinfecció. En les regions endèmiques com el Mediterrani la majoria de nens de 6 anys són seropositius. Tanmateix, en els últims anys la prevalença del anticossos contra el VHA en la població d'aquests països ha disminuït (Dal-Ré i col., 2000). Durant la infecció, els virions són excretats a

la bilis i posteriorment a femtes. Hi ha hagut nombrosos casos on els mol·luscs bivalves han estat a l'origen de brots epidèmics d'hepatitis A, el més important dels quals va afectar vora 300 000 persones a Shangai el 1988 (Halliday i col., 1991; Tang i col., 1991).

Taula 6. Característiques del virus de l'hepatitis A

Família	<i>Picornaviridae</i>
Gènere	<i>Hepatovirus</i>
Serotips	1
Genotips	Quatre d'origen humà
Àcid nucleic	ARN linial de cadena simple i polaritat positiva. IRES a l'extrem 5'.
Mida del genoma	7,8 kb
Morfologia	27-28 nm, càpside icosaèdrica, sense embolcall
Densitat de flotació	1,33-1,34 g/cm ³ en clorur de cesi
Coefficient de sedimentació	156-160 S
Cèl·lules diania	Hepatòcits
Replicació	Citoplasma dels hepatòcits
Proteïnes estructurals	VP1, VP2, VP3, VP4
Proteïnes no estructurals	2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, VPg

2.3. Calicivirus

Dins la família *Caliciviridae* els dos gèneres de major importància epidemiològica són els calicivirus típics o *Sapovirus* (SV) i els virus d'estructura rodona (*small round structured viruses*) o *Norovirus* (NV, veure Taula 7). Són virus petits d'entre 35-40 nm de diàmetre i amb genoma ARN de cadena senzilla i polaritat positiva (Figura 8). La morfologia dels calicivirus típics consisteix en unes depressions en forma de copa en la superfície que són observables per microscòpia electrònica. En els norovirus aquesta morfologia no es distingeix tan bé i la superfície dels virions té una aparença més amorfa. Els sapovirus i els norovirus difereixen en l'organització de les pautes obertes de lectura (*ORF: open reading frames*). Mentre que els norovirus causen malaltia en tots els grups d'edat, els sapovirus només afecten els nens. Encara que els símptomes que provoquen ambdós gèneres són similars i inclouen diarrea, vòmits, febre i maldecap, els sapovirus donen lloc a casos esporàdics mentre que els norovirus provoquen brots importants ja que es contagien molt fàcilment. De fet, s'ha vist que es dona excreció de NV 10 dies després de la infecció i també per portadors asimptomàtics (Parashar i col., 1998) i que en un sol vòmit s'excreten entre 10⁵ i 10⁶ dosis infeccioses

Figura 7. Organització genòmica del virus de l'hepatitis A i processament de les proteïnes estructurals

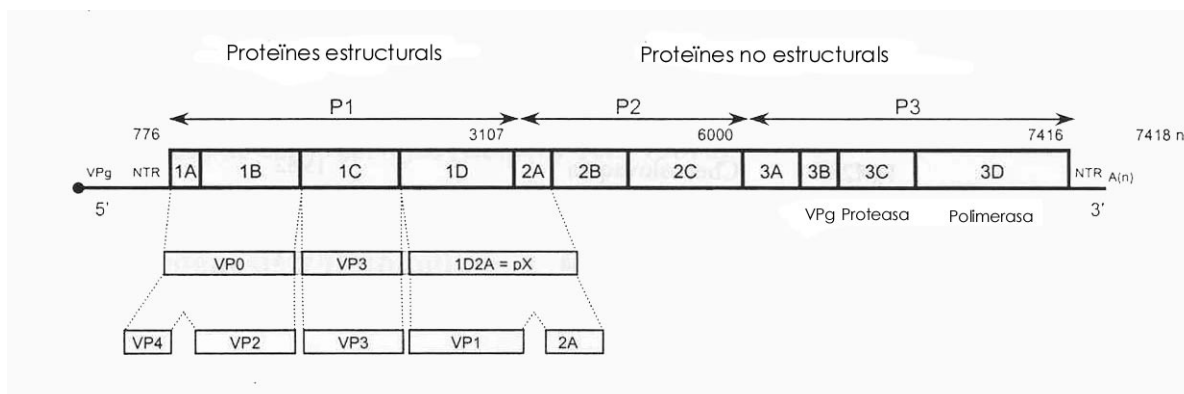
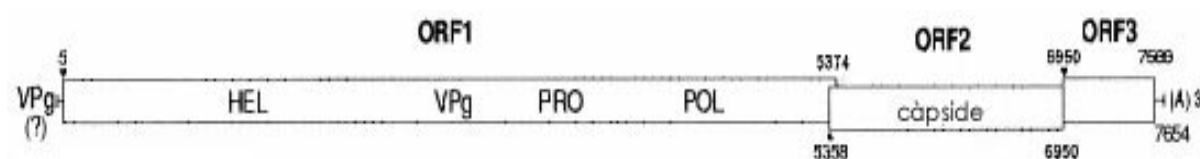


Figura 8. Organització genòmica dels *Norovirus*



(Caul i col., 1995). Els norovirus causen la majoria de brots epidèmics relacionats amb el consum de marisc. Al Regne Unit i al Japó, la majoria de brots es donen a l'hivern, mentre que als EEUU tenen lloc al final de la primavera i de la tardor (Potasman i col., 2000). També s'ha observat la relació entre pluges fortes i brots de gastroenteritis causats per aquests virus (Fleet i col., 2000; Miossec i col., 2000). En general, tot i que la seva transmissió ocorre al llarg de tot l'any, els brots es donen durant els mesos més freds de l'any

(Mounts i col., 2000).

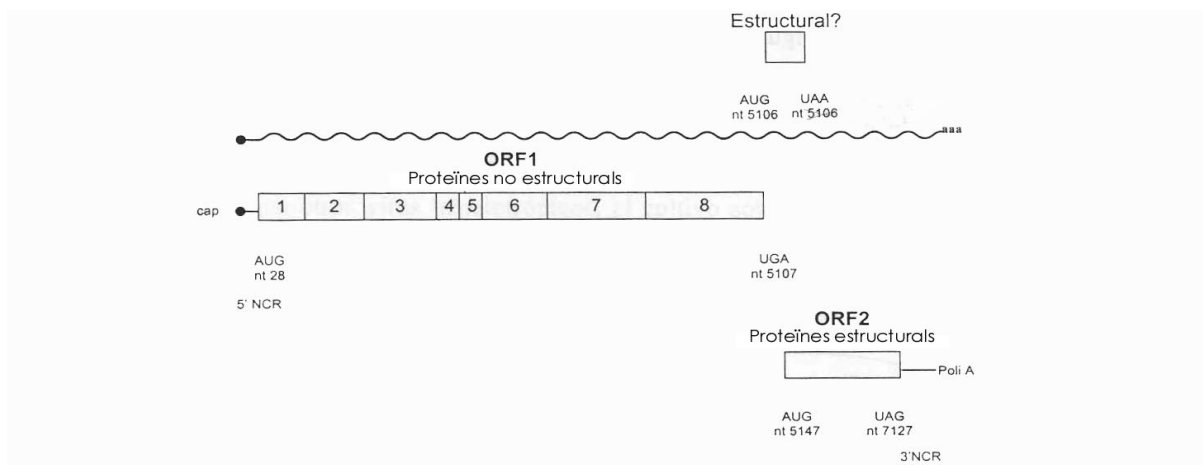
2.4. Virus de l'hepatitis E

El virus de l'hepatitis E comparteix certes característiques morfològiques amb els calicivirus i durant un temps va estar inclòs dins d'aquesta família (Taula 8). Tanmateix, les característiques del seu genoma van fer que se'l classificués en un grup a part (Figura 9) (Pringle, 1998). Es pot distingir més d'un genotip depenent de la distribució geogràfica, però només hi ha un sol serotip (Tsarev i col., 1999). La forma clínica de l'infecció pel virus de l'hepatitis E es presenta com una malaltia hepàtica autolimitant que comparteix moltes característiques amb l'hepatitis A. No obstant, s'han descrit complicacions severes i una alta taxa de mortalitat, sobretot en dones embarassades, on arriba a ser d'un 20% (Balayan, 1997). L'hepatitis E és endèmica en molts països, particularment a Àsia, on és la causa principal d'hepatitis agudes esporàdiques. En els països occidentals, els casos fins fa poc observats s'associaven a viatges a zones endèmiques. No obstant, en aquestes àrees la seroprevalència és del 1 al 5% (Paul, 1994) i s'ha aïllat virus de l'hepatitis E en malalts afectats per hepatitis aguda que no havien estat en zones endèmiques (Pina i col., 1998c). S'ha informat de casos d'hepatitis no-A no-B associats al consum de mol·luscs bivalves (Torne i col., 1988; Jaykus i col., 1994). Això junt amb la transmissió oral-fecal de l'hepatitis E fan pensar en els mol·luscs bivalves com a possibles vectors de l'hepatitis E.

Taula 7. Característiques del gènere *Norovirus*

Família	<i>Caliciviridae</i>
Genotips	2 genogrups que inclouen diferents genotips
Àcid nucleic	ARN linial de cadena simple i polaritat positiva
Mida del genoma	7,5-7,7 kb
Morfologia	35-40 nm, càpside icosaèdrica, sense embolcall
Densitat de flotació	1,33-1,41 g/cm ³ en clorur de cesi
Coefficient de sedimentació	170-187 S
Teixits diana	Tracte intestinal
Replicació	Citoplasma
Proteïnes estructurals	CP
Proteïnes no estructurals	Proteïnes amb homologies amb 2C helicasa, 3C cisteïn-proteasa, 3D ARN-depenent ARN polimerasa

Figura 9. Organització genòmica del virus de l'hepatitis E (modificat de Pina, 2001a). Gens no estructurals de l'ORF1: (1) metiltransferasa, (2) domini Y, (3) papain-like proteasa, (4) regió hipervariable, (5) domini ric en prolina, (6) domini X, (7) helicasa, i (8) ARN polimerasa ARN depenent. AUG, codó d'inici de traducció; UAA/UAG/UGA, codó de final de traducció; nt, posició segons la soca de Birmania (Tam i col., 1991).



Taula 8. Característiques del virus de l'hepatitis E

Gènere	<i>Virus "Hepatitis E-like"</i>
Genotips	4 acceptats
Àcid nucleic	ARN linial de cadena simple i polaritat positiva amb cua d'adenosines
Mida del genoma	7,2 kb
Morfologia	28-32 nm, esfèrics amb espícules i indentacions
Densitat de flotació	1,29 g/ml en tartrat potàssic/glicerol; 1,35 g/cm ³ en clorur de cesi
Coefficient de sedimentació	183 S
Cèl·lules diana	Hepatòcits
Proteïnes estructurals	CP
Proteïnes no estructurals	Dominis amb homologies amb ARN helicases, metiltransferases, <i>papain-like</i> cistein-proteasa, ARN dependent ARN polimerasa

2.5. Poliomavirus

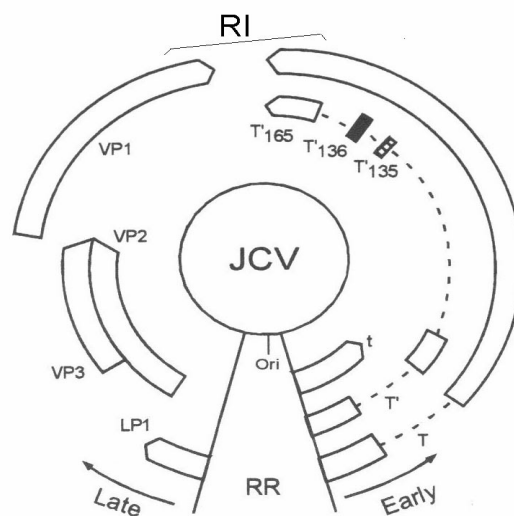
Els poliomavirus pertanyen a la família *Polyomaviridae*. Són virus icosaèdrics, sense embolcall i amb un genoma d'ADN de doble cadena circular, tancat i sobreenrotllat que es troba associat a quatre histones cel·lulars (Figura 10). Infecten humans, altres primats, rosegadors, bovins, conills i ocells. A la Taula 9 es fa un resum de les principals característiques biològiques dels poliomavirus humans JC i BK. El virus JC infecta persistentment el ronyó d'individus sans i també s'ha trobat a limfòcits i cervells tant d'individus immunodeprimits com no immunodeprimits. La reactivació de JC en períodes d'immunosupressió provoca un augment en la seva excreció en orina i l'aparició de patologies com la leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML). La infecció primària per BK es dona a la infància i és generalment asimptomàtica, encara que en certs casos poden presentar-se símptomes respiratoris o molèsties al tracte urinari. A l'igual que JC, també pot provocar infeccions persistents al ronyó i es reactiva en casos d'immunosupressió, on arriba a causar estenosi urètica, cistitis hemorràgica i nefropatia en transplantats de ronyó. Tant JC com BK s'han relacionat amb tumors. Tot i que la via de transmissió dels poliomavirus humans es desconeix, es creu que podria tenir lloc a través del tracte gastrointestinal.

Taula 9. Característiques dels poliomavirus humans

Família	<i>Polyomaviridae</i>
Gèneres	Virus JC i BK
Serotips	4 per BK, 1 per JC
Genotips	10 per JC, no hi ha divisió en genotips per BK
Àcid nucleic	ADN de doble cadena, circular, tancat i sobreenrotllat. Associat a quatre histones cel·lulars: H2A, H2B, H3 i H4
Mida del genoma	5,2 kb
Morfologia	42-45 nm, càpside icosaèdrica
Densitat de flotació	1,34 g/ml en clorur de cesi
Coefficient de sedimentació	240 S
Teixits diana	Sistema nerviós, tracte urinari
Replicació	Nucli
Proteïnes estructurals	VP1, VP2 i VP3
Proteïnes no estructurals	antígens T i t

Així, s'han trobat abundantment en aigües residuals de tot el món i en mol·luscs bivalves. (Bofill-Mas i col., 2001).

Figura 10. Esquema del genoma de JC on apareixen la regió reguladora (RR), la regió intergènica (RI) i les regions primerenca (*early*) i tardana (*late*), (Kim i col., 2001).



3. Els mol·luscs bivalves com a agents transmissors de malalties infeccioses

Els mol·luscs bivalves han estat una important font d'aliment des de l'antiguitat. En els últims trenta anys, però, s'ha incrementat el seu consum a tot el món (Potasman, 2002). Paral·lelament, s'ha observat un increment en el nombre de brots de malalties infeccioses associades al seu consum. No obstant, l'associació del consum de marisc bivalve amb problemes de salut pública es coneix des de l'Edat Mitjana, encara que no és fins el 1816 que trobem una de les primeres descripcions d'un brot epidèmic associat al consum d'ostres crues (Potasman i col., 2002). En el seu "Essai médicale sur les huîtres", el metge francès J.P.A. Pasquier descriu el que sembla febre tifoide en un grup de malalts que havien menjat ostres contaminades amb aigües residuals. Des de llavors, trobem informació de més de 400 brots epidèmics i de 14 000 casos esporàdics només als Estats Units. En aquest temps, la qualitat sanitària dels mol·luscs bivalves pel que fa als patògens bacterians d'origen fecal humà ha millorat gràcies a la introducció de controls sanitaris basats en l'enumeració de coliformes fecals i *Escherichia coli*. Tanmateix, ha quedat patent que aquests estàndards bacterians no són útils en el cas dels virus i dels membres del gènere *Vibrio*. Evidències epidemiològiques mostren que els virus entèrics humans són els agents etiològics més comunament transmesos pels mol·luscs bivalves en l'actualitat (Lipp i col., 1997; Wallace i col., 1999).

Els bivalves són una classe de mol·luscs lamel·libranquis amb la closca constituïda per dues valves dures unides mitjançant un lligament elàstic i brànquies d'aspecte laminar. Les dues valves que cobreixen el cos dels bivalves es poden obrir i tancar mitjançant una articulació gràcies a l'acció d'un o dos músculs adductors (Figura 11). L'espai que queda lliure a l'interior de les valves s'anomena cavitat paleal i l'aigua que queda retinguda quan es tanquen les valves, líquid intervalvar. Entre les espècies de major explotació comercial a Europa trobem l'ostra plana (*Ostrea edulis*), l'ostró (*Crassostrea gigas*), el musclo (*Mytilus edulis* i *M. galloprovincialis*), diferents tipus de cloïsses (*Mercenaria mercenaria*, *Tapes decussatus*, *T. philippinarum*), el catxell (*Cerastoderma edule*), la petxina del pelegrí (*Pecten maximus*, *P. jacobus*) i el xelet (*Chlamys opercularis*).

Les diferents espècies de bivalves presenten una gran diversitat pel que fa al seu hàbitat. En general, són animals estàtics que, o bé s'uneixen els uns als altres, o bé s'enterren en els sediments marins o en altres superfícies submergides. De fet, la majoria de mol·luscs bivalves d'importància comercial creixen en estuaris i aigües poc profundes properes a la costa i on hi ha nivells elevats de nutrients. Malauradament, aquestes zones costaneres es veuen també afectades per abocaments d'aigua residual. Tot i que es dona la recol·lecció de bivalves de poblacions naturals, les seves característiques permeten el cultiu per part de l'home. Hi ha tres tipus de cultiu: el cultiu en suspensió, el cultiu en sediment o en parcs de cultiu i el cultiu en *long-lines* o fileres. En el cultiu en suspensió, el mol·lusc està adherit a cordes suspeses verticalment a l'aigua. El cultiu en parcs consisteix en deixar els mol·luscs en cistells en contacte directe amb el sediment o en sorres fangoses, amb un bon corrent d'aigua i a diverses profunditats segons l'espècie. Les *long-lines* consisteixen en una corda llarga principal submergida de la qual pengen els sistemes de cultiu; es manté flotant per l'ús de flotadors i s'assegura al fons mitjançant pesos. Les espècies adaptades a condicions de major sequedat poden tancar les seves valves fora de l'aigua de manera que el líquid intervalvar queda retingut. Aquestes espècies (ostres, musclos i cloïsses) poden, doncs, sobreviure llargs períodes fora de l'aigua i per això, es comercialitza i consumeix l'animal viu. Altres espècies com la petxina del pelegrí i el xelet no presenten aquesta adaptació i per tant, són processades abans del seu consum.

El fet que els bivalves siguin vectors de malalties víriques i bacterianes es deu al seu mode d'alimentació. Obtenen els nutrients per filtració de partícules (fitoplàncton majoritàriament) que es troben en suspensió en les aigües que els envolten. Poden bombejar grans volums d'aigua a través de les brànquies, on queden atrapats els nutrients abans d'acumular-se a l'hepatopàncreas. En aquest procés de filtració també poden quedar retinguts toxines, metalls pesats i finalment, patògens humans procedents de contaminació per aigües residuals. Això, junt amb el fet que s'acostuma a menjar l'animal sencer (vísceres incloses) cru o poc cuit, converteix els bivalves en un cas

especial en el conjunt de riscos alimentaris. Cal remarcar que la majoria de casos de brots dels quals es té notícia s'ha donat pel consum d'ostres, cloïsses i musclos (Potasman i col., 2000). En canvi, aquelles espècies com la petxina del pelegrí que es cultiven en zones més allunyades de la costa i a les quals se'ls extreuen generalment les vísceres abans de cuinar-les, representen un risc alimentari molt menor pel que fa a virus patògens.

La fisiologia dels bivalves i, en conseqüència, l'acumulació i l'eliminació de microorganismes, es veu afectada per factors com la temperatura i la salinitat (Cabelli i col., 1970). Per sota dels 5°C és difícil que sobrevisquin. Entre 5 i 8°C bombegen molt poca aigua i es mantenen en una mena d'estat d'hivernació. A partir dels 8°C l'activitat branquial augmenta de forma progressiva, per la qual cosa augmenta el bombeig, mengen més i creixen més fins arribar als 30°C. Temperatures

superiors provoquen la seva mort. Això explica que el seu creixement no sigui continu. A l'estiu filtren molt i creixen molt; a l'hivern filtren poc i gairebé no creixen. La salinitat de l'aigua també és molt important. Per efecte d'òsmosi, l'augment de la salinitat del medi extern fa que les seves cèl·lules perdin part del líquid intracel·lular; pel contrari, la baixa salinitat provoca l'entrada d'aigua dins les cèl·lules. Aquests fenòmens poden explicar en part les diferències tan geogràfiques com estacionals (Cabelli i col., 1971) en el contingut dels microorganismes indicadors en bivalves. De la mateixa manera, se sap que l'eliminació dels bacteris contaminants dels mol·luscs bivalves és menys efectiva a baixes temperatures (Hernroth i col., 2002). Igualment, s'ha demostrat que la capacitat dels hemòcits dels bivalves per matar els bacteris es veu inhibida per les baixes temperatures (Gehner i col., 1999).

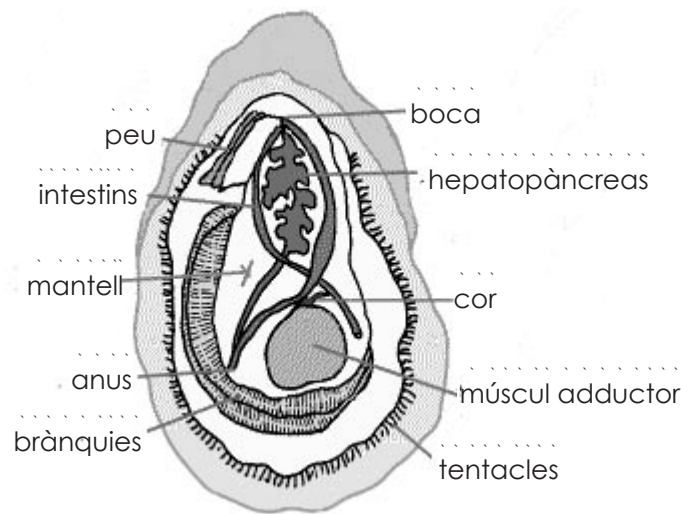


Figura 11. Anatomia de l'ostra. Visió interna

4. Control de la qualitat microbiològica dels mol·luscs bivalves

El risc de contraure malalties infeccioses associades al consum de marisc es coneix de fa molts anys. És per això que la majoria de països han establert uns controls sanitaris pel que fa a la producció i el processament de mol·luscs bivalves. A la Unió Europea, aquests controls es resumeixen en les directives 91/492/EEC i 97/61/EEC i són la base per la normativa espanyola publicada als Reials Decrets 308/1993 i 571/1999. Als Estats Units la normativa queda recollida en uns acords interestatals publicats el 2002 en el *National Shellfish Sanitation Program Manual of Operations* de la FDA (*Food and Drug Administration*). Els mol·luscs bivalves importats de tercers països han de produir-se seguint els mateixos paràmetres que els productes nacionals. Internacionalment es considera que el marisc amb valors inferiors a 230 *E. coli* o a 300 coliformes fecals en 100 grams de carn de l'animal és apte pel consum humà. Aquest estàndard, junt amb altres per a patògens específics (com absència de *Salmonella* en 25 grams de carn), productes químics i biotoxines d'algues estan actualment recollits en la directiva comunitària europea.

4.1. Legislació actual

4.1.1. Classificació de les zones de producció

A l'Estat Espanyol, la normativa de control de la qualitat sanitària dels mol·luscs bivalves i de les aigües de producció d'aquests es recull en els Reials Decrets 308/1993 i 571/1999. Aquí trobem la classificació de les zones de producció de bivalves en tres categories:

- Zones "tipus A": En aquestes zones, els mol·luscs bivalves vius tindran menys de 300 coliformes fecals o menys de 230 *E. coli* per cada 100 grams de carn de mol·lusc i líquid intervalvar en una prova de número més probable (NMP) en la qual s'utilitzin cinc tubs i tres dilucions. Els mol·luscs bivalves extrets d'aquestes zones podran ser destinats al consum humà directe.
- Zones "tipus B": Els mol·luscs bivalves vius en aquestes zones tindran un índex igual o inferior a 6 000 coliformes fecals per cada 100 grams de carn o 4 600 *E. coli* per cada 100 grams de carn en el 90 per 100 de les mostres en una prova NMP en la qual s'utilitzin cinc tubs i tres dilucions. Els mol·luscs bivalves extrets d'aquestes zones podran ser destinats

al mercat i al consum humà després de sotmetre'ls a un procés de depuració o de la seva reinstal·lació.

- Zones "tipus C": Els mol·luscs bivalves vius tindran un índex inferior a 60 000 coliformes fecals per cada 100 grams de carn en una prova NMP en la qual s'utilitzin cinc tubs i tres dilucions i podran ser destinats al mercat únicament després de la seva reinstal·lació durant un període llarg de temps (un mínim de dos mesos), associada o no a una depuració o després d'una depuració intensiva durant un període i modalitat segons el procediment comunitari.

4.1.2. Normativa per a la comercialització dels mol·luscs bivalves

En els Reials Decrets 308/1993 i 571/1999 s'estableix que els mol·luscs bivalves vius destinats al consum humà immediat han de complir els següents requisits:

- Tenir menys de 300 coliformes fecals o menys de 230 *E. coli* per cada 100 grams de carn de mol·lusc i líquid intervalvar en una prova NMP on s'hagin utilitzat cinc tubs i tres dilucions o en qualsevol altre mètode d'anàlisi bacteriològica de precisió equivalent demostrada.
- No contenir *Salmonella* en 25 grams de carn.
- No contenir compostos tòxics ni nocius d'origen natural o introduïts en el medi ambient en una quantitat que comporti que l'absorció alimentària calculada superi la ingestió diària admissible (IDA) per l'home, o que pugui deteriorar el sabor del producte.
- El contingut màxim de radionúclids no podrà superar els límits establerts per les disposicions comunitàries d'aplicació directa o per les disposicions nacionals vigents pels productes alimentaris.
- El percentatge de "toxina paralitzant dels mol·luscs" (PSP) en les parts comestibles dels mol·luscs (cos sencer o part consumible separada) no podrà superar els 80 micrograms per 100 grams, segons el mètode d'anàlisi biològica a la qual pot associar-se un mètode químic de detecció de saxitoxina, o qualsevol altre mètode reconegut pel procediment

previst en la normativa comunitària.

- Els mètodes habituals d'anàlisi biològica no han de donar reacció positiva per la presència de "toxina diarreica dels mol·luscs" (DSP) en les parts comestibles dels mol·luscs (cos sencer o part consumible separada).
- El contingut de "toxina amnèsica dels mol·luscs" (ASP) en les parts comestibles dels mol·luscs (cos sencer o part consumible separada) no podrà ser superior als 20 micrograms d'àcid domoic per gram segons el procediment d'anàlisi HPLC.
- A manca de mètodes habituals de detecció de virus i de normes virològiques, el control sanitari es basarà en el recompte de bacteris fecals.

4.1.3. Comparació de les normatives europea i americana

Les normatives europea i americana classifiquen les zones de producció de mol·luscs bivalves segons el grau de contaminació a les aigües a partir de paràmetres bacterians. Una de les principals diferències entre totes dues radica en què els indicadors de contaminació fecal es mesuren en la carn del mol·lusc a la Unió Europea i en les aigües de producció als Estats Units. Tots dos sistemes estan basats en tests NMP de 5 tubs i 3 dilucions. En la Taula 10 es presenta un resum d'ambdues classificacions. La categoria "Aprovat" de la FDA i la zona "A" de la Unió Europea es dóna a les àrees de producció més netes; el marisc extret d'aquestes zones és apte pel consum humà directe. Totes dues normatives

estableixen que el marisc produït en zones on els nivells de contaminació són més elevats als descrits anteriorment no són aptes pel consum humà immediat. De totes maneres, el marisc recollit en aquestes àrees pot entrar al mercat després de sotmetre'l a un procés de depuració o a un tractament per calor. No obstant, i donat que se sap que aquests processos no són del tot efectius, s'han establert uns límits per sobre dels quals no es permet l'aplicació d'aquests tractaments. Així, només els mol·luscs bivalves procedents d'una "zona B" segons la legislació europea o "restringida" segons la FDA poden ser introduïts al mercat un cop sotmesos a aquests processos. En la Unió Europea, els mol·luscs bivalves cultivats en zones que excedeixen els límits establerts per a les zones B han de ser reinstal·lats en zones netes per un període mínim de 2 mesos o ser sotmesos a un tractament per calor aprovat per a poder ser comercialitzats. En la legislació americana no es contempla cap categoria equivalent.

4.2. Processament dels mol·luscs bivalves per a eliminar la contaminació fecal

4.2.1. Cocció

El tractament per calor o cocció s'utilitza per a reduir els nivells de contaminació microbiològica quan el marisc és comercialitzat com a producte processat. S'apliquen diversos tractaments entre els quals es troben la pasteurització i l'esterilització per enllaunat. Els processos de cocció o cuinat estan sota l'establert en la decisió de la Comissió Europea del 30 d'octubre de 2003. Aquesta directiva estableix que la

Taula 10. Resum dels estàndards bacterians en les normatives nord-americana i europea per a mol·luscs bivalves vius (adaptat de Lees, 2000)*

Tractament requerit	Classificació Estats Units	Estàndard bacteriològic per 100 ml d'aigua	Classificació Unió Europea	Estàndard bacteriològic per 100 g de bivalve
No requerit	Aprovat	MG < 14 CF + 90% < 43 CF	A	90% mostres < 230 <i>E. coli</i> o < 300 CF
Depuració	Restringit	MG < 88 CF + 90% < 260 CF	B	90% mostres < 4 600 <i>E. coli</i> o < 6 000 CF
Reinstal·lació (>2mesos)	-	Nivells superiors als descrits	C	Nivells superiors als descrits

* MG: mitjana geomètrica; CF: coliformes fecals; 90%: noranta-percentil

temperatura interna de la carn dels mol·luscs ha d'assolir els 90°C durant minut i mig com a mínim. També existeix la possibilitat de coure de 3 a 5 min en un recipient tancat on hi hagi una temperatura d'entre 120-160°C i una pressió d'entre 2 i 5 kg/cm². Aquest i altres paràmetres es basen en les dades obtingudes per VHA en cloïsses. Donat que els NV no poden ser cultivats *in vitro*, no s'han pogut realitzar estudis sobre la seva persistència i inactivació. Amb tot, i utilitzant com a model els calicivirus felins (FCV), Slomka i Appleton (1998) van trobar que aquests s'inactivaven en bivalves després d'un tractament per calor més fàcilment que el VHA. Aquesta observació va ser posteriorment confirmada per Doultree i col. (1999) al demostrar la completa inactivació d'un estoc de FCV després d'un tractament a 70°C durant 5 minuts. D'altra banda, els processos de cuinat que es donen a llars i restaurants no són efectius en la reducció de la contaminació fecal. S'han arribat a detectar rotavirus i virus de l'hepatitis A en musclos cuinats al vapor 5 minuts després d'obrir-se les valves (Abad i col., 1997).

4.2.2. Tractament per alta pressió hidrostàtica

El processament per alta pressió hidrostàtica s'ha utilitzat en la inactivació de microorganismes problemàtics en aliments. En general, s'utilitzen pressions d'entre 300 i 700 MPa, les qual són efectives per a inactivar la majoria de bacteris en la seva forma vegetativa; les espores bacterianes, tanmateix, són molt més resistents a aquestes pressions. Entre els avantatges d'aquest tipus de tractament trobem la rapidesa i uniformitat d'aplicació, i el manteniment de les propietats organolèptiques ja que es tracta d'un procés isotèrmic. Tot i que actualment, la seva aplicació representa un cost econòmic elevat, el tractament per alta pressió hidrostàtica sembla una clara alternativa als actuals processaments de marisc d'alt valor econòmic com els mol·luscs bivalves que es consumeixen crus.

En l'actualitat, el processament per alta pressió hidrostàtica s'aplica comercialment per a l'eliminació de vibris d'ostres (López-Caballero i col., 2000). Diversos estudis suggereixen que alguns virus no embolcallats són sensibles a aquest tractament (Kingsley i col., 2002). Així, es descriu la inactivació de 10⁵ UFP de rotavirus boví i de 10⁴ UFP de rotavirus de mico en un medi isotònic a 250 MPa durant 60 i 30 minuts respectivament. Pel que fa als

patògens més importants relacionats amb el consum de mol·luscs bivalves, NV i VHA, Kingsley demostra la completa inactivació de 10⁷ UFP de VHA en D-MEM isotònic al 10% de sèrum a 450 MPa durant 5 minuts, i de 10⁷ de calicivirus felí després de 5 minuts a 275 MPa o més. Aquestes dades mostren que el processament per alta pressió hidrostàtica és capaç d'eliminar els virus infecciosos dels mol·luscs bivalves crus.

4.2.3. Depuració i reinstal·lació

La depuració s'aplica a la majoria d'espècies de mol·luscs bivalves que es comercialitzen vives com ostres, musclos i cloïsses. Els processos de depuració van aplicar-se per primera vegada als anys 20 (Dogson, 1928 citat a Lees, 2000) com una manera d'aprofitar els processos naturals de purgació de contaminants dels mol·luscs filtradors en aigua de mar neta. Com ja hem explicat a la secció 2, els bivalves bioacumulen de forma passiva diferents partícules sòlides i microorganismes com bacteris i virus. Quan s'aplica un tractament de depuració amb aigua de mar amb nivells molt baixos de nutrients, els mol·luscs s'alimenten de tot el material que han anat acumulant a la seva glàndula digestiva. Això fa que el pes d'aquesta glàndula vagi disminuint al llarg de tot el procés i fins i tot, pot arribar a desaparèixer (Muniain-Mujika i col., 2002).

Els diferents processos de depuració existents duren d'un a set dies, encara que un període de dos dies és el més freqüent. També hi ha gran varietat de sistemes de depuració. N'hi ha en què l'aigua es manté estàtica i d'altres en què l'aigua de mar circula contínuament o és reciclada després de passar per un procés d'esterilització. L'esterilització pot fer-se per ozonització, cloració, irradiació amb UV i/o iodòfors (Lees, 2000).

Diferents estudis han establert que després de 24 hores els nivells d'*E. coli* disminueixen dràsticament de manera que, aplicant la legislació vigent, els mol·luscs bivalves depurats serien aptes pel consum humà directe. No obstant, tot i que la depuració funcioni per a reduir els nivells de coliform fecals no és eficient en la reducció dels virus entèrics humans (Jofre, 1992; Doré i Lees, 1995; Muniain-Mujika i col., 2002). Aquest fet es confirma per evidències epidemiològiques que demostren la possibilitat de què es donin infeccions després del consum de marisc

depurat (Gill i col., 1983; Richards, 1985; Chalmers i Mcmillan, 1995; Perrett i Kudesia, 1995; Ang, 1998); observacions recolzades per nombrosos estudis sobre la taxa d'eliminació de virus entèrics i possibles microorganismes models del comportament dels virus humans durant la depuració (Sobsey i Jaykus, 1991; Doré i Lees, 1995; Muniain-Mujika i col., 2002). D'aquests estudis es desprèn que *E. coli* no seria un bon indicador de contaminació vírica en bivalves depurats ja que els virus són eliminats pels mol·luscs bivalves a una taxa més baixa que els coliformes fecals. D'altra banda, s'ha observat que els fags F-específics d'ARN tenen una cinètica de depuració similar a la de certs virus entèrics com els adenovirus humans, enterovirus i norovirus.

Altres treballs reflecteixen la importància de la temperatura de l'aigua en la depuració dels virus humans, però no dels bacteris, fet que indicaria l'existència de requeriments fisiològics per a l'eliminació dels virus durant el procés de depuració diferents als requerits en l'eliminació dels coliformes fecals (Power i Collins, 1990; Jaykus i col., 1994). De fet, s'ha observat que la contaminació per NV i fags F-ARN en ostres depurades comercialment és més prevalent durant els mesos d'hivern (Doré i col., 1998, 2000).

La reinstal·lació és una de les possibilitats contemplades per la legislació europea, la qual implica la transferència dels animals recol·lectats a estuaris més nets per tal que es doni l'auto-depuració en un ambient natural. Aquest procés pot utilitzar-se com alternativa a la depuració en mol·luscs no molt contaminats. El principal avantatge és que el marisc pot mantenir-se en l'ambient natural durant períodes molt més llargs que en tancs de depuració. Tanmateix, la reinstal·lació es veu dificultada per la capacitat molt limitada de disposar de zones costaneres netes i encara més de controlar la qualitat de l'aigua de la zona.

4.3. Microorganismes model

La detecció de microorganismes patògens transmesos per la ruta fecal-oral requereix sovint d'una metodologia amb un elevat cost econòmic. D'altra banda, no és factible incloure tècniques moleculars per a tots i cadascun dels microorganismes patògens d'interès. Tot això ha comportat que es cerquin microorganismes associats a la qualitat tant de l'aigua com dels mol·luscs

bivalves. Berg (1978) i més tard Havelaar (1993) van descriure quines haviem de ser les característiques que un microorganisme model havia de reunir per a ser considerat com a tal:

- Trobar-se exclusivament i de forma consistent en femtes humanes.
- No trobar-se en femtes animals.
- No multiplicar-se al medi ambient.
- Superar en aigües contaminades (i consegüentment en bivalves contaminats) el nombre de virus humans en bastants ordres de magnitud.
- Comportar-se de la mateixa manera que el virus patogen tant en el medi natural com en els processos de tractament.
- Poder ser detectat amb mètodes simples, ràpids i barats.

Mossel (1982) va distingir dues funcions dels microorganismes models:

1 Com a microorganisme índex indicaria, de forma directa o indirecta, possibles riscos sanitaris o la presència de certs patògens. Per tant, hi hauria índex de contaminació fecal, de contaminació per aigües residuals, de contaminació fecal d'origen humà, etc.

2 Com a microorganisme indicador de l'efecte d'un procés de tractament o de qualitat d'un producte. Per exemple, es podria estudiar la capacitat virucida d'un procés de desinfecció en una depuradora d'aigües residuals analitzant la reducció en el número de cert microorganisme model com, per exemple, un bacteriòfag.

Els diferents brots epidèmics d'etiologia vírica associats al consum de marisc que complia la normativa vigent (Christensen i col., 1998) han fet palesa la insuficiència dels estàndards basats en els indicadors bacterians clàssics (coliformes i *E. coli*) per a garantir la qualitat sanitària dels bivalves. És per això que s'han proposat altres microorganismes com a models dels virus entèrics humans. Entre aquests trobem els colifags somàtics, els bacteriòfags de *Bacteroides fragilis*, els fags d'ARN F-específics, els enterovirus infecciosos i els adenovirus humans.

4.3.1. Colifags somàtics

Els colifags somàtics són bacteriòfags pertanyents a les famílies *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* i *Microviridae* capaços d'infectar soques d'*E. coli* al poder adsorbir-se als receptors somàtics de la seva paret cel·lular (ISO 1075-2, 1999). Es tracta d'un grup heterogeni pel que fa a morfologia, resistència a diferents tractaments i ecologia. Es detecten en femtes humanes i animals (de granja, de zoològic, salvatges) en concentracions $<10^2$ - 10^8 UFP/g (IAWPRC, 1991). En aigües residuals són molt abundants i es troben valors de 10^5 - 10^6 UFP/ml.

Van ser proposats com a microorganismes índex de contaminació fecal (Kott i col., 1974; IAWPRC, 1991) i hi ha gran diversitat d'estudis sobre ells. S'han detectat valors molt alts de colifags somàtics en aigües naturals procedents, principalment, de contaminació externa. No obstant, Seely i Primose (1980) en van detectar a aigües poc contaminades. Quan els recomptes es feien a 20°C s'obtenien xifres molt més elevades que als habituals 37°C. Vaughn i Metcalf (1975) van demostrar la replicació de colifags somàtics en aigües d'estuari on s'inoculava el bacteri hoste al laboratori. Això podria suggerir que certs fags capaços de produir clapes sobre *E. coli* a 37°C, podrien multiplicar-se a l'ambient sobre altres bacteris hostes, fet que reduiria les possibilitats d'usar aquest grup de fags com a microorganismes índex de contaminació fecal.

4.3.2. Fags F-específics d'ARN

Els fags F-específics (Havelaar i Hogemoon, 1984; Havelaar, 1993; IAWPRC, 1991; ISO 1075-1) són membres de les famílies *Leviviridae* (fags amb genoma ARN de cadena senzilla) i *Inoviridae* (fags amb ADN de cadena senzilla). Es defineixen com virus bacterians capaços d'infectar soques amb pili sexuals o F i produir clapes de lisi visibles en un cultiu confluent que ha crescut sota unes condicions determinades. Aquest grup de fags s'adsorbeixen als pilis o fimbries sexuals codificats pel plàsmid F d'*E. coli* K12 i per plàsmids relacionats del grup F d'incompatibilitat. Aquests pilis no poden formar-se a temperatures inferiors a 32°C, fet que fa poc probable la seva replicació al medi ambient. Els fags F-ARN són poc freqüents en femtes humanes i d'animals ($<10^3$ UFP/g), encara que en aigües residuals s'han trobat en rangs d'entre 10^3 i 10^4 UFP/ml.

La detecció dels fags F-ARN es fa principalment sobre el mutant WG49 de *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* serotip Typhimurium DTCC 700730/NCTC 12484 (Havelaar i Hogeboom, 1984) que conté un plàsmid que codifica per a la formació dels pilis sexuals. També s'utilitza la soca mutant HS(pFamp)R d'*E. coli*; aquesta darrera soca sembla recuperar menys fags F-ARN i més fags F-ADN.

S'ha demostrat la multiplicació del fag GA (fag F-ARN del serotip II) en aigua residual pasteuritzada i en aigua de mar i riu a 20°C quan el bacteri hoste havia pre-crescut a 37°C (Havelaar i Hogeboom, 1988). Així doncs, la seva replicació podria estar restringida a ambients amb una aportació fecal directa, a més de necessitar una elevada concentració tant del fag com del bacteri hoste. Aquests requeriments fan que la multiplicació dels fags F-específics d'ARN sigui poc probable en ambients diferents als d'un sistema d'aigües residuals.

4.3.3. Fags de *Bacteroides fragilis*

Els fags de *Bacteroides fragilis* (Jofre i col., 1986; IAWPRC, 1991; ISO 1075-4) formen un grup homogeni constituït principalment per membres de la família *Siphoviridae*. Es caracteritzen per tenir un genoma d'ADN de doble cadena dins una càpside icosaèdrica amb una cua més o menys llarga i no contràctil. Els requeriments nutricionals i el caràcter anaerobi del bacteri hoste fa que la replicació d'aquests fags al medi ambient sigui poc probable. Un 10% de la població presenta nivells d'excreció de fins a 10^8 UFP/g (Tartera i Jofre, 1987) i en aigües residuals es troben $<10^0$ - 10^3 UFP/ml. S'utilitzen dues soques hostes diferents per a la seva detecció: HSP40, present en l'àmbit humà, i RYC2056, que permet la recuperació d'una major proporció de fags d'origen animal (Puig i col., 1999).

El nombre d'UFP de fags de *Bact. fragilis* detectats en diferents mostres ambientals (aigua, sediment, musclos amb diferents graus de contaminació) és superior al d'enterovirus, tant en valors numèrics com en percentatge de mostres positives, i es dona una bona correlació entre aquest dos virus en aigües residuals i marines (Tartera i col., 1988; Jofre i col., 1989; Lucena i col., 1994; Pina i col., 1998b). El major inconvenient respecte els altres microorganismes models proposats és el baix nombre d'aquests fags, la

qual cosa suposa la necessitat de concentrar grans volums d'aigua per fer possible la seva detecció (Lucena i col., 1994).

Taula 11. Principals grups de bacteriòfags proposats com a possibles models vírics de contaminació ambiental

Bacteriòfag	Soca hoste	Descripció
Colifags somàtics	<i>E. coli</i> C	Grup heterogeni de morfologia variada.
	<i>E. coli</i> WG5	Presència freqüent en femtes humanes i animals (10^2 - 10^8 /g) i aigües residuals (10^5 - 10^6 /ml). Possible multiplicació en l'ambient sota determinades circumstàncies. Bona resistència al medi ambient. Heterogeneïtat en l'inactivació durant els processos de tractament d'aigües.
Fags F-ARN	<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotip Typhimurium DTCC 700730/NCTC 12484	Grup homogeni.
	<i>E. coli</i> HS (pFamp)R	Morfologia i constitució similars als enterovirus.
	<i>E. coli</i> K12 Hfr	No són freqüents en femtes humanes ni animals (menys de 10^3 /g). Freqüents en aigua residual (10^3 - 10^4 /ml). No es multipliquen normalment a l'ambient. Alta resistència als UV. Els diferents serotips poden relacionar-se amb l'origen de la contaminació fecal.
Fags de <i>Bact. fragilis</i> (FBF)	<i>Bact. fragilis</i> HSP40	Grup homogeni.
	<i>Bact. fragilis</i> RYC2056	No es multipliquen a l'ambient. Especificitat: FBF HSP40 en femtes humanes principalment; FBF RYC2056 en femtes animals i humanes. Presència oscil·lant en femtes del 10-20% de la població (0 - 10^5 /g). Baix nombre en aigües residuals (PBF HSP40 $<10^0$ - 10^2 /ml; FBF RYC2056 10^1 - 10^3 /ml). Alta resistència als tractaments d'aigües i a processos d'inactivació natural.

En la Taula 11 es presenta un resum de les principals característiques dels 3 grups de bacteriòfags descrits.

4.3.4. Enterovirus infecciosos

Els enterovirus s'han utilitzat com a paràmetre d'estudi de la contaminació vírica a l'ambient degut al fet que majoritàriament poden aïllar-se i quantificar-se com a UFP en cultiu cel·lular (Rao i col., 1986). També s'ha estudiat la seva distribució a l'ambient per tècniques basades en la detecció d'àcids nucleics, tanmateix, diversos estudis han mostrat la manca de correlació amb importants patògens com el VHA (Puig i col., 1994; Pina i col., 1998b). Alguns autors van suggerir utilitzar els poliovirus en la monitorització de la contaminació vírica de l'ambient; no obstant, la seva prevalença ha anat disminuint en els darrers anys (Pina i col., 1998b). En tot cas, l'agència de protecció ambiental dels EEUU (EPA) descriu el grup dels virus entèrics com a l'índex víric en l'ambient més significatiu, segur i efectiu (Karaganis i col., 1983). En les directives europees per a l'ambient aquàtic els enterovirus són l'únic grup de virus entèrics contemplat.

4.3.5. Adenovirus humans

Els adenovirus són l'únic grup de virus entèrics humans amb genoma ADN. Són patògens importants (veure secció 3.1) que s'excreten en grans quantitats en femtes i orina d'individus infectats i de portadors asimptomàtics. Molts dels serotips d'adenovirus són de difícil cultiu en les línies cel·lulars regulars i quan creixen, ho fan molt lentament. És per això que la seva presència en l'ambient i com a causa de gastroenteritis va ser subestimada durant molt de temps (Krikelis i col., 1985). Els adenovirus 40 i 41 són importants agents de gastroenteritis infantils. Els adenovirus humans són altament prevalents a l'ambient (Girones i col., 1995; Pina i col., 1998b) i s'ha suggerit el seu ús mitjançant detecció per tècniques moleculars com a possibles microorganismes model de contaminació fecal vírica d'origen humà (Puig i col., 1994; Pina i col., 1998b; Muniain-Mujika i col., 2000).

El 1998, els adenovirus van ser inclosos en la llista d'agents contaminants emergents

d'aigua de beguda (protozous, bacteris, virus, metalls pesants, etc.) per l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units. Diferents estudis mostren que d'entre tots els patògens inclosos en la llista, els adenovirus són els més resistents als tractaments de desinfecció per UV (Thompson i col., 2003; Gerba i col., 2003). Altres estudis també mostren la seva major resistència a tractaments amb clor lliure (Thurston-Enriquez i col., 2003).

Estudis d'infectivitat realitzats per Enríquez i Gerba (1995), mostren que la T_{99} (temps en què el 99% dels virions perd la seva capacitat infectiva) dels adenovirus entèrics 40 i 41 és molt superior a la del virus de l'hepatitis A i de poliovirus 1 en diferents ambients aquàtics (Taula 12).

Tots aquests fets reforcen la idea d'utilitzar els adenovirus humans com a índex molecular de contaminació vírica d'origen humà.

Taula 12. T_{99} de diferents virus en diferents medis hídrics (Enríquez i Gerba, 1995)

Medi i temperatura	Virus	T_{99} (dies)
Aigua de distribució a 4°C	Poliovirus 1	41
	Virus hepatitis A	56
	Adenovirus 40	92
	Adenovirus 41	304
Aigua de distribució a 23°C	Poliovirus 1	11
	Virus hepatitis A	27
	Adenovirus 40	60
	Adenovirus 41	84
Aigua de distribució a 15°C	Poliovirus 1	24
	Adenovirus 40	87
	Adenovirus 41	124
Aigua de mar a 15°C	Poliovirus 1	18
	Adenovirus 40	77
	Adenovirus 41	85
Efluent primaris a 15°C	Poliovirus 1	28
	Adenovirus 40	40
	Adenovirus 41	43
Efluent secundaris a 15°C	Poliovirus 1	19
	Adenovirus 40	43
	Adenovirus 41	45

5. Detecció de virus contaminants de mol·luscs bivalves

Les malalties emergents d'origen alimentari poden definir-se com aquelles que han aparegut recentment, o que ja existien però la incidència i/o la distribució geogràfica de les quals ha augmentat ràpidament, o finalment, com aquelles per les quals la transmissió via aliments s'ha conegut fa poc (Morse, 1995). En aquesta definició es poden incloure les malalties d'origen alimentari causades per virus. No obstant, és raonable pensar que, en molts casos, no són els virus sinó la nostra capacitat d'estudiar-los el que és emergent. Així, durant els primers anys de recerca sobre les malalties associades al consum de certs aliments (ex. mol·luscs bivalves), s'establia la possible etiologia vírica a partir de certs criteris epidemiològics: període d'incubació d'entre 24 i 36 hores, vòmits i diarrea durant pocs dies, alt nombre de casos secundaris i absència d'altres patògens com bacteris i/o protozous (Kaplan i col., 1982; Hedberg i Osterholm, 1993).

Actualment, la majoria de protocols de detecció i identificació de virus es basen en tècniques moleculars. Però la utilització de les tècniques moleculars no implica l'eliminació de la pràctica dels mètodes tradicionals o no moleculars. Tot i que les tècniques moleculars permeten incrementar la sensibilitat i l'especificitat i proporcionen resultats en poc temps, no donen informació sobre la viabilitat de les partícules víriques (Sobsey i col., 1998), informació que només pot obtenir-se mitjançant estudis d'infectivitat en cultiu cel·lular. En la Taula 13 es presenta un resum dels diferents sistemes de detecció i identificació de virus animals.

5.1. Aïllament en cultiu cel·lular

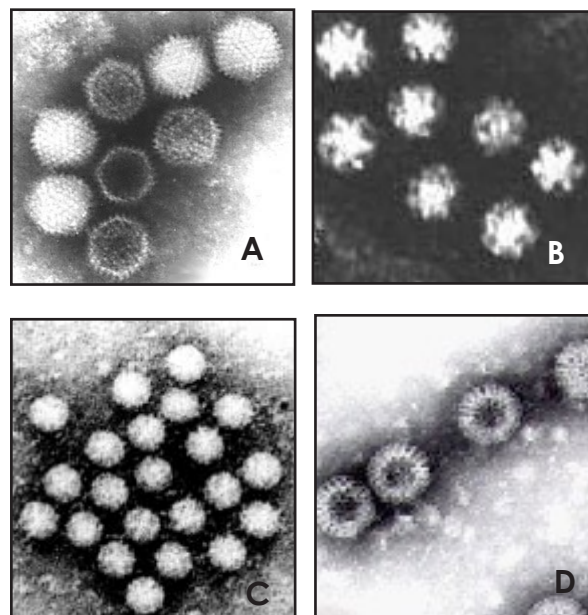
Els mètodes tradicionals de detecció de virus es basen en assaigs d'infectivitat en línies cel·lulars. El cultiu cel·lular, tot i ser l'únic mètode que dona informació sobre si un virus és o no infecciós, està limitat per la baixa sensibilitat, la llarga durada de les anàlisis i la manca de línies cel·lulars eficients per a aïllar molts virus entèrics d'importància epidemiològica com els calicivirus humans, alguns enterovirus, els adenovirus 40 i 41 i el virus de l'hepatitis E. En el cas del virus de l'hepatitis A, malgrat que existeixen soques adaptades al cultiu cel·lular, les soques salvatges són difícilment cultivables al laboratori. A la manca de sistemes de cultiu

cel·lular per aquests virus s'afegeix l'alta citotoxicitat dels extractes de mol·luscs (Pina, 2001). La citotoxicitat produïda per bivalves i similars pot reduir-se amb la utilització de floculants (Metcalf i col., 1980; Seidel i col., 1983), el que suposa un encariment i una major complexitat de la tècnica. Tanmateix, el cultiu cel·lular no proporciona la sensibilitat i rapidesa requerides en els assaigs rutinaris.

5.2. Microscòpia electrònica

La microscòpia electrònica és un mètode útil quan no es disposa de cap altre mètode d'identificació ja que permet la detecció de virus enutjosos i no cultivables com rotavirus, norovirus i astrovirus. La base per a la identificació en la microscòpia electrònica és el reconeixement d'estructures víriques característiques tal i com es veu a la Figura 12. És per això que només pot dur-se a terme per personal altament qualificat. Un dels principals inconvenients del mètode és la seva baixa sensibilitat (10^6 - 10^7 partícules/ml).

Figura 12. Micrografies electròniques de virus entèrics. A) Adenovirus B) Astrovirus C) Norovirus D) Rotavirus



5.3. Tècniques immunoenzimàtiques

Les tècniques immunoenzimàtiques com l'ELISA (*enzyme-linked immunoassay*) serveixen per a la detecció d'antigen víric en mostres ambientals sense passar prèviament pel cultiu cel·lular. Aquestes tècniques es veuen limitades per la baixa sensibilitat ($\geq 10^4$

Taula 13. Mètodes de detecció i d'identificació de virus en l'ambient (modificat de Pina, 2001a)

Mètode	Avantatges	Inconvenients
<i>Aïllament en cultiu cel·lular</i>	Permet fer estudis de viabilitat Quantificació de partícules infeccioses	Sensibilitat variable en funció de la línia cel·lular i del tipus de virus Només aplicable per a certs virus Cal personal qualificat Mètode lent i car S'utilitza en combinació amb mètodes immunològics o moleculars
<i>Microscòpia electrònica</i>	Rapidesa Informació morfològica	Baixa sensibilitat (mínim de 10 ⁶ partícules/ml) Possibilitat de confusió ja que el diagnòstic es basa en criteris morfològics Cal personal qualificat i infraestructura adequada
<i>Tècniques immunològiques</i>	Detecció d'antígens	Baixa sensibilitat
<i>Tècniques de detecció d'àcids nucleics</i> • <i>Hibridació</i> • <i>PCR</i>	Màxima rapidesa, sensibilitat i especificitat Detecció de virus no cultivables Permet fer estudis filogenètics i epidemiològics	Requereix conèixer la seqüència del genoma víric No proporciona informació sobre viabilitat Cal personal qualificat i infraestructura adequada Sensible a inhibidors de reaccions enzimàtiques presents en els teixits dels bivalves

a 10^5 partícules per ml) i per la incapacitat de cultivar certs virus com els calicivirus humans *in vitro*, fet que complica l'obtenció de quantitats suficients d'antigen per tal de desenvolupar els reactius a utilitzar en la reacció (Hedberg i Osterholm, 1993).

5.4. Reacció en cadena de la polimerasa

El desenvolupament de les tècniques moleculars ha permès la detecció i la identificació de baixes concentracions de virus en mostres d'origen divers a més de proporcionar la màxima sensibilitat i especificitat.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va ser inventada per Mullis el 1985 (Saiki i col., 1985), que l'any 1993 va rebre el premi Nobel de Química per aquesta invenció. Aquesta tècnica consisteix en l'amplificació d'un fragment d'ADN flanquejat per dues regions de les quals es coneix la seqüència. L'amplificació de genomes d'ARN requereix d'un pas previ de síntesi d'ADN complementari (ADNc) mitjançant un enzim ADN polimerasa ARN dependent (transcriptasa inversa). El procés implica una etapa de desnaturalització de les cadenes motlle inicials, una etapa d'hibridació dels iniciadors amb les seqüències complementàries, i una etapa d'elongació de les cadenes on es generen dues molècules d'ADN de doble cadena idèntiques. El nombre de còpies augmenta de forma exponencial a cada cicle segons l'equació $N \times 2^c$, on N és el número de molècules diana inicials i c el número de cicles (Figura 13). L'aplicació d'aquesta tècnica permet la detecció d'unes 10^3 molècules d'ADN inicials, sensibilitat que es pot incrementar realitzant una segona amplificació amb iniciadors interns (PCR imbricada o *nested*) o mitjançant hibridació. La realització d'una PCR seguida d'una PCR imbricada proporciona la màxima sensibilitat, on s'arriba a detectar una única molècula d'ADN (Allard i col., 1992; Puig i col., 1994).

Un dels principals problemes que resulta de l'aplicació de tècniques d'amplificació genòmica en estudis ambientals és la presència de diferents substàncies capaces d'inhibir els enzims que s'utilitzen en la reacció (Wilson, 1997). D'altra banda, l'altíssima sensibilitat comporta l'establiment de mesures de control de contaminacions creuades amb material prèviament amplificat que podrien

donar lloc a falsos positius (Kitchin i Bootman, 1993).

L'amplificació per PCR no permet obtenir informació sobre l'estabilitat i infectivitat dels virus presents a les mostres. S'ha suggerit que amb aquesta tècnica es detectarien a més de virus, àcids nucleics lliures en l'ambient. Hi ha estudis recents que mostren, però, que l'ARN de cadena senzilla no inclòs dins una partícula vírica presenta una baixa estabilitat en l'ambient (Tsai i col., 1995). Pel que fa a virus ADN, Muniain-Mujika i col. (2002) mostren una alta correlació entre la detecció de fags de *Bacteroides fragilis* per PCR i per recompte d'UFP segons el mètode de doble capa d'agar.

5.4.1. PCR multiplex

La utilització de la PCR als laboratoris pot veure's limitada pel seu cost i de vegades, també per la disponibilitat d'un volum de mostra adequat per a realitzar el test. Aquestes limitacions poden superar-se amb la reacció en cadena de la polimerasa múltiple (PCR multiplex). La PCR multiplex és una variant de la PCR on s'amplifiquen dues o més seqüències diana en una mateixa reacció. Aquesta tècnica pot suposar un gran estalvi en temps i esforç al laboratori. Des de la seva primera descripció el 1988 per Chamberlain i col., s'ha aplicat amb èxit en diverses àrees d'anàlisi d'ADN, entre elles, l'identificació de virus (Elnifro i col., 2000), bacteris (Hendolin i col., 1997) i paràsits (Harris i col., 1998).

5.4.2. Detecció en temps real

Un dels factors que més dificultaven l'ús de la PCR per a la quantificació era el fet que la fase exponencial de la reacció d'amplificació és de durada limitada. A mesura que els productes d'amplificació s'acumulen, la fase exponencial entra en una fase de saturació en què els productes poden assolir nivells similars sense mantenir una proporció amb la concentració inicial de motlle. Això fa que, per tal que els resultats siguin significatius, les quantificacions s'hagin de fer durant la fase exponencial, i per assegurar que la mesura es faci en la fase exponencial, cal examinar els productes progressivament durant la reacció d'amplificació.

La PCR en temps real és un sistema que detecta els productes de PCR a mesura que es van acumulant. Els sistemes més comunament

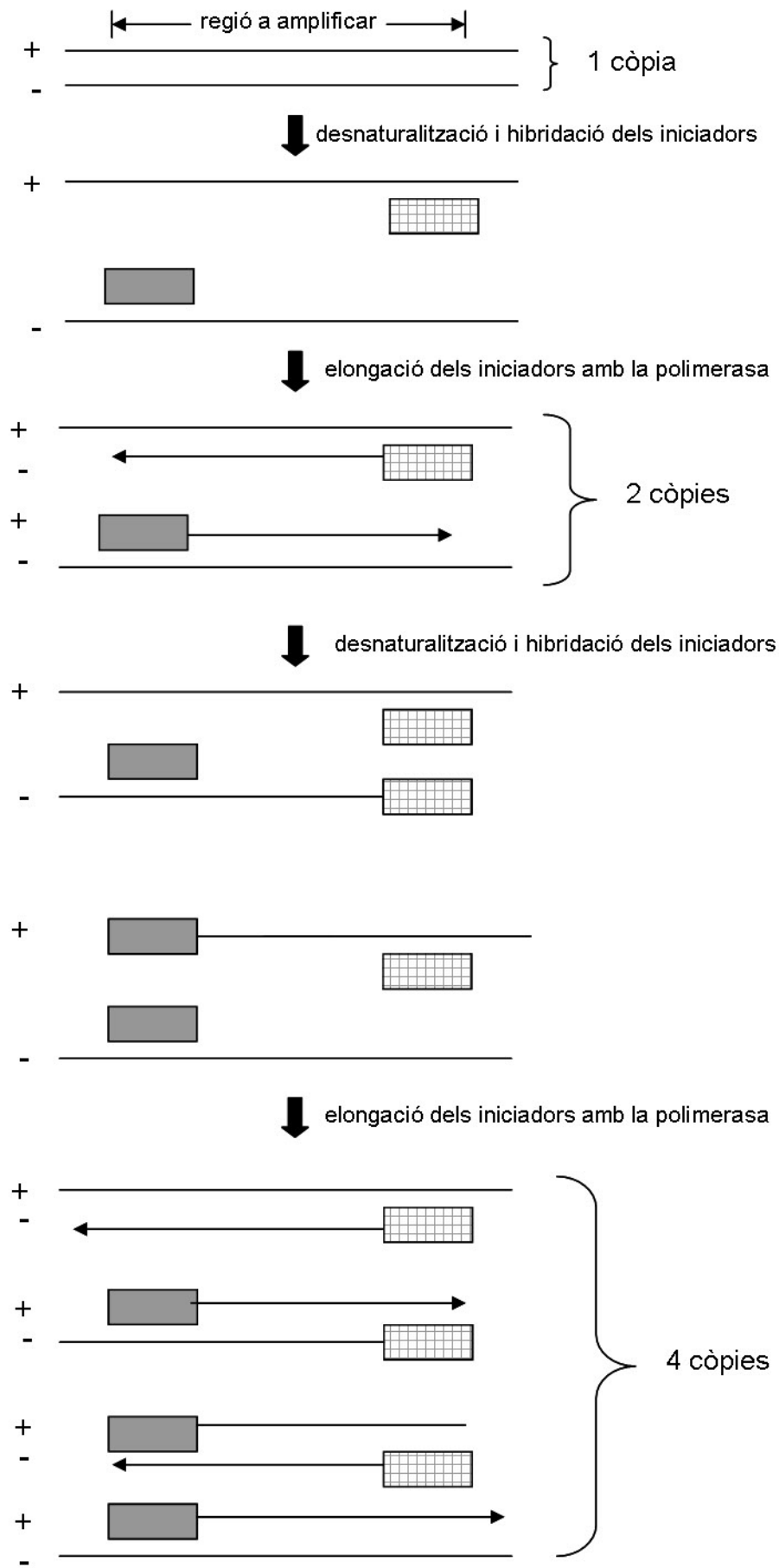


Figura 13. Esquema dels primers cicles de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

utilitzats es basen en l'acumulació de fluorescència que pot relacionar-se amb la quantitat de producte de PCR generat. Així, quan més alt és el número inicial de còpies de l'àcid nucleic diana, més aviat es produeix un increment significatiu en la fluorescència observada. El paràmetre C_T (*threshold cycle*) es defineix com el cicle en el qual la fluorescència emesa supera un llindar establert de fluorescència base.

Actualment, hi ha diversos mecanismes de fluorescència específics i no específics utilitzats en la detecció dels productes d'amplificació durant la PCR en temps real. Els mètodes no específics van constituir una de les primeres aproximacions a la detecció en temps real i es basen molècules de fluoròfor que s'uneixen a l'ADN. Aquests compostos, entre els quals cal destacar el SYBR® Green I, emeten fluorescència quan s'intercalen a ADN de doble cadena exposat a una determinada longitud d'ona. Aquesta aproximació és de més fàcil disseny que els mètodes específics, més econòmic, i no es ressent de variacions en la seqüència de la cadena motlle. L'associació d'aquests compostos amb dímers d'iniciadors o amb altres productes d'amplificació no específics pot donar lloc a confusions en la interpretació dels resultats. Aquest problema pot solucionar-se afegint un període curt d'incubació a alta temperatura després de la fase d'elongació. També pot fer-se l'anàlisi de les corbes de desnaturalització (*melting curves*). Aquest mètode es basa en la temperatura a la qual l'amplicó d'ADN de

doble cadena es desnaturalitza. Els dímers d'iniciadors, al ser més curts que els productes específics de la PCR, es desnaturalitzen a una temperatura inferior.

Entre els mètodes específics de detecció en temps real trobem el basat en l'activitat 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa (sondes TaqMan™). Va ser descrita per primera vegada per Holland i col. al 1991 i millorada més tard per Lee i col. (1993). A més dels components clàssics d'una reacció de PCR, hi ha una sonda amb un fluoròfor a l'extrem 5' i un compost bloquejador de fluorescència a l'extrem 3' (*quencher*). Mentre la sonda roman intacta, la proximitat del compost bloquejador redueix la fluorescència emesa pel fluoròfor mitjançant un procés de transmissió d'energia de ressonància. En la Figura 14 es mostra el que li succeeix a la sonda durant la fase d'extensió de la PCR. Si la seqüència diana és present, la sonda s'hi uneix en posició 3' respecte del lloc d'unió d'un dels iniciadors i és tallada per l'activitat 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa quan es dona l'extensió de l'iniciador. Aquest tall de la sonda separa el fluoròfor del compost bloquejador de manera que augmenta el senyal de fluorescència. El tall separa la sonda de la cadena motlle, permetent que continuï l'extensió de la cadena motlle. Per tant, la sonda no inhibeix la reacció de PCR. A cada cicle es repeteix el procés, fet que augmenta la fluorescència de forma proporcional a la quantitat d'amplicó produït.

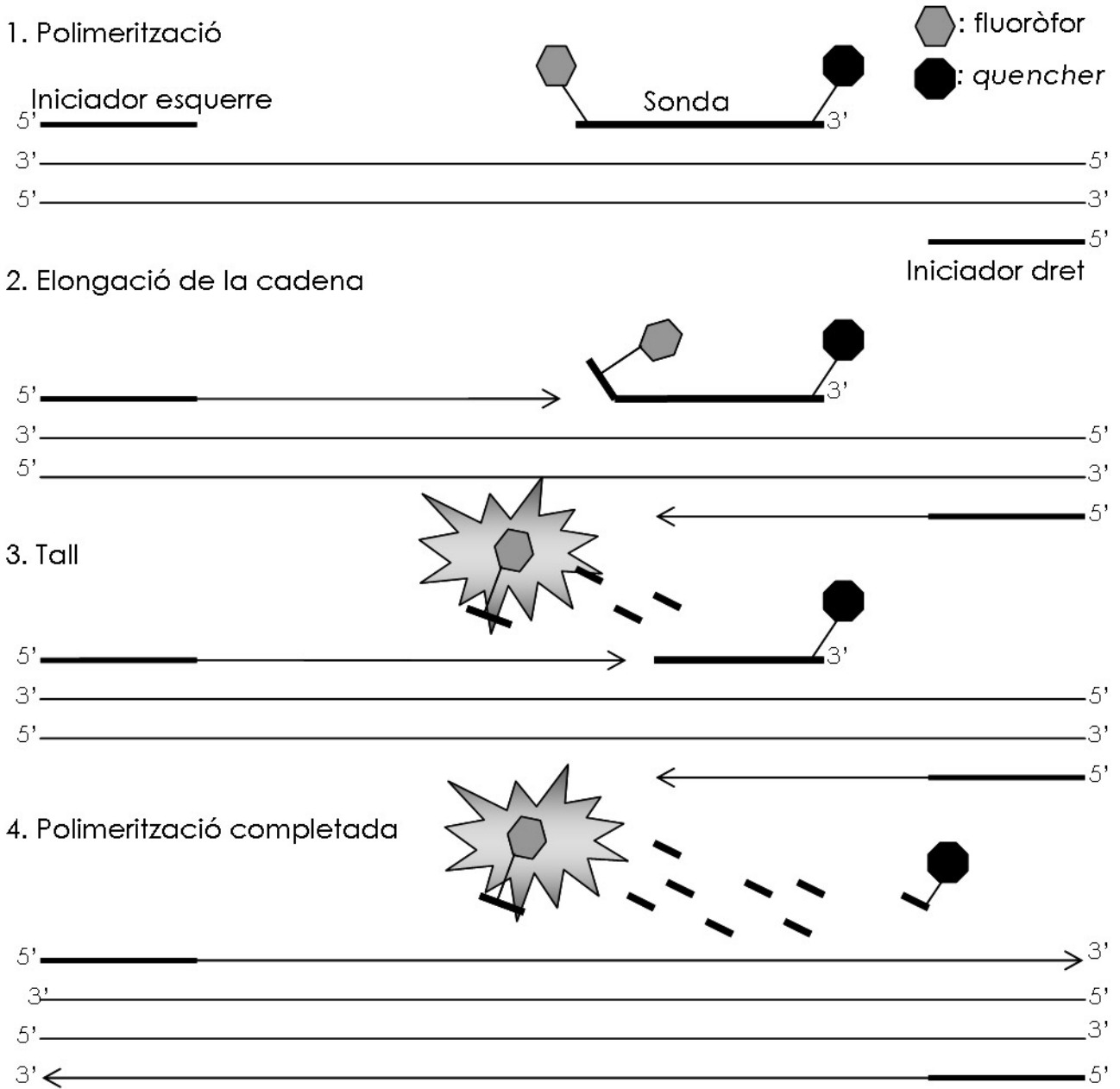


Figura 14. Representació esquemàtica de l'activitat 5'→3' nucleasa de l'AmpliTaQ ADN polimerasa sobre una sonda fluorogènica durant la fase d'extensió de la PCR (adaptat de Livak i col., 1995)