

VIRUS ENTERICOS EN ALIMENTOS:

INCIDENCIA Y METODOS DE CONTROL

R. RODRIGO, L. TOMÁS COBOS, E. MELLADO, D. TOMÁS

ainia, centro tecnológico, departamento de Bioensayos

Introducción

La contaminación de los alimentos a través de los virus es considerado actualmente como la principal fuente de enfermedades infecciosas vía alimentaria. Estos virus pertenecen a una diversidad de familias, pero presentan, no obstante, algunas características comunes entre ellos. La mayor parte contienen como genoma ARN y están rodeados por una cubierta proteica denominada cápside. Son virus desnudos que carecen de cubierta lipídica, con estructura icosaédrica y con un tamaño que oscila entre los 20 y 80 nm.

Los virus transmitidos vía alimentaria requieren de células humanas para su multiplicación y por tanto, necesitan de una célula huésped específica para su repli-

cación. Es por ello que a diferencia de las bacterias, no van a poder multiplicarse en el alimento y no incrementarán su número durante el almacenamiento del producto. La ausencia de replicación en el alimento, y el hecho de que generalmente se encuentran en bajas concentraciones, no asegura la salubridad del alimento, ya que se suponen dosis infectivas muy bajas del orden de 10^0 a 10^2 unidades infecciosas (Iverson et al, 1987, Moe et al, 1998, Jaykus, 2000), lo cual incrementa el riesgo para la salud pública y dificulta el uso y desarrollo de los métodos analíticos.

Incidencia en alimentos

Entre los virus que infectan al hombre existen muchos tipos diferentes que se excretan en grandes concentraciones en las heces de personas con gastroenteritis o hepatitis viral, por lo que podemos encontrarlos fácilmente en las aguas residuales urbanas. A partir de ahí, debido a su mayor resistencia a los tratamientos biológicos y físico-químicos de las aguas residuales en comparación con las

"Existe una creciente preocupación en torno a la importancia que tienen los virus entéricos humanos transmitidos a través de los alimentos debido al gran impacto que tienen en la Salud Pública"

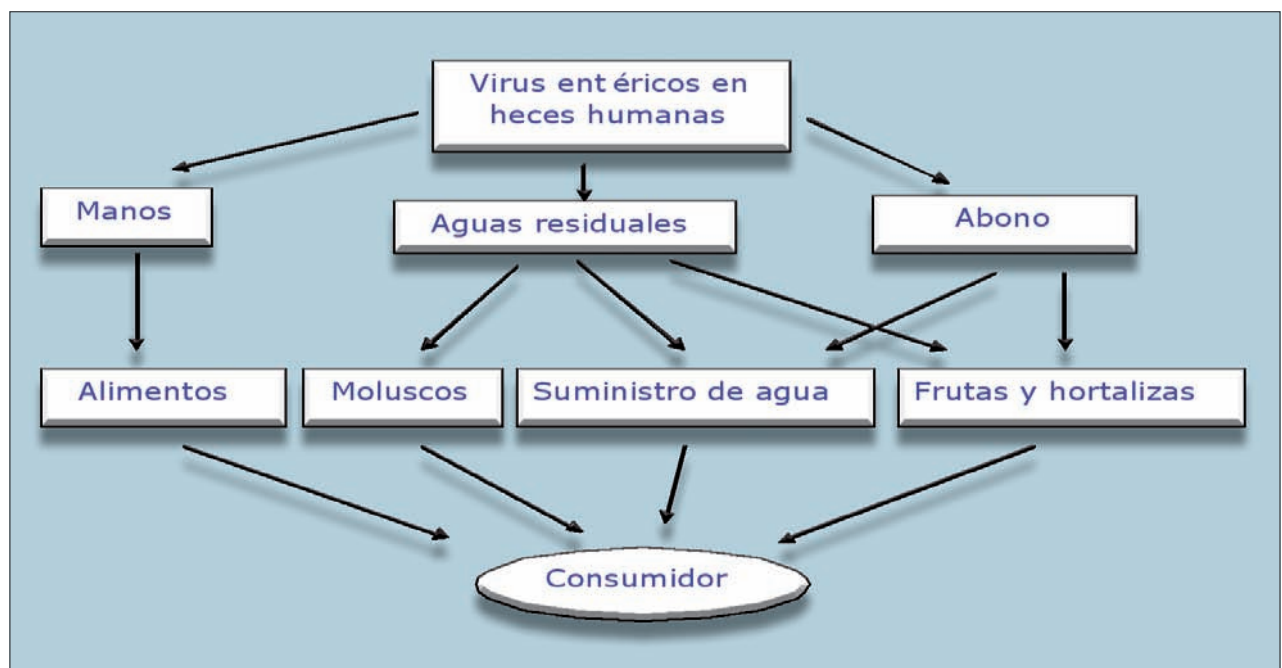


Fig.1. Vías de transmisión de los virus

Agente causal	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	1994-2003
Bacterias	452	507	531	529	642	594	614	646	635	806	5.956
Virus											
HAV	0	1	0	1	10	3	6	0	2	0	23
Norovirus	0	0	0	0	0	4	1	9	20	22	56
Otros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
Desconocido	456	338	320	317	251	279	307	293	277	364	3.202

Tabla 1. Número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España (1994-2003). Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

Nombre	Familia	Alimento	Genoma	Clínica
Polio, Coxsackie, echo, enterovirus	Picornaviridae	Sí, principalmente agua, presente en marisco	28 nm (RNA sc)	Asintomático, dolor muscular, cardiomiopatía, meningitis, parálisis motor SNC
HAV	Picornaviridae	Sí	28 nm (RNA sc)	Hepatitis, leve en jóvenes
HEV	Hepeviridae	Principalmente agua	34 nm (RNA sc)	Hepatitis, severa embarazadas
Rotavirus	Reoviridae	Raro, frecuente en agua	70 nm (RNA dc)	Diarrea
Adenovirus	Adenoviridae	No informado. Aislado en agua y marisco	100 nm (DNA dc)	Diarrea leve
Norovirus	Caliciviridae	Sí	34 nm (RNA sc)	Gastroenteritis, vómitos
Sapovirus	Caliciviridae	Raro, principalmente marisco	34 nm (RNA sc)	Gastroenteritis
Astrovirus	Astroviridae	Ocasionalmente	28 nm (RNA sc)	Diarrea leve

Tabla 2. Principales virus aislados en agua y alimentos

bacterias, los virus van a poder llegar al medio ambiente y contaminar las aguas y alimentos por diversas vías: bien a través del agua usada para consumo humano, o bien por medio del agua usada en cultivos vegetales, cultivos de moluscos bivalvos o en la preparación de los alimentos (fig 1). Asimismo, otra fuente importante de contagio son los manipuladores de alimentos infectados sintomáticos o asintomáticos que pueden contaminar los alimentos en cualquier punto de la cadena alimenticia, aconsejándose la exclusión de dichos individuos durante un periodo de 48 horas tras el cese de los síntomas, ya que se ha demostrado la transmisión viral tanto en el periodo pre- como postsintomático.

Los casos documentados de brotes alimentarios o casos esporádicos de origen vírico son todavía muy escasos, ya que existen aspectos importantes que dificultan su documentación como son:

- La rápida **transmisión persona-persona** que enmascara en algunos casos el origen alimentario del brote
- **Dificultades técnicas de análisis de virus** en las diversas matrices susceptibles
- **Necesidad de mejorar la red de vigilancia epidemiológica**

Es por ello, que cuando observamos el número de brotes transmitidos por alimentos en España entre 1994-2003 (tabla 1), sólo 79 tienen como origen confirmado norovirus (NoV) o virus de la hepatitis A (HAV), mientras que el número de brotes de origen bacteriano se encuentra cercano a los 6000. No obstante, se considera que se ha producido un incremento en el número de brotes documentados por norovirus alimentarios. Asimismo, **el registro de brotes de origen desconocido continúa siendo muy elevado, por lo que cabe pensar que gran parte de ellos tendrían su origen en virus.**

Según datos disponibles de la red de vigilancia americana (FoodNet), en el período comprendido entre 1983-1987, NoV fue la quinta causa más importante de brotes a través de los alimentos, mientras que HAV fue la sexta. Sin embargo, según los del 2004, del total de brotes en los que se confirmó la etiología, NoV supuso el 52% de los casos, seguido de Salmonella con un 23%, **lo cual indica que la incidencia de casos virales estaba realmente infradiagnosticada.**

El desarrollo de los sistemas de vigilancia epidemiológica, tanto en Europa como en Estados Unidos, están adquiriendo una gran importancia como fuente de información para establecer la inciden-

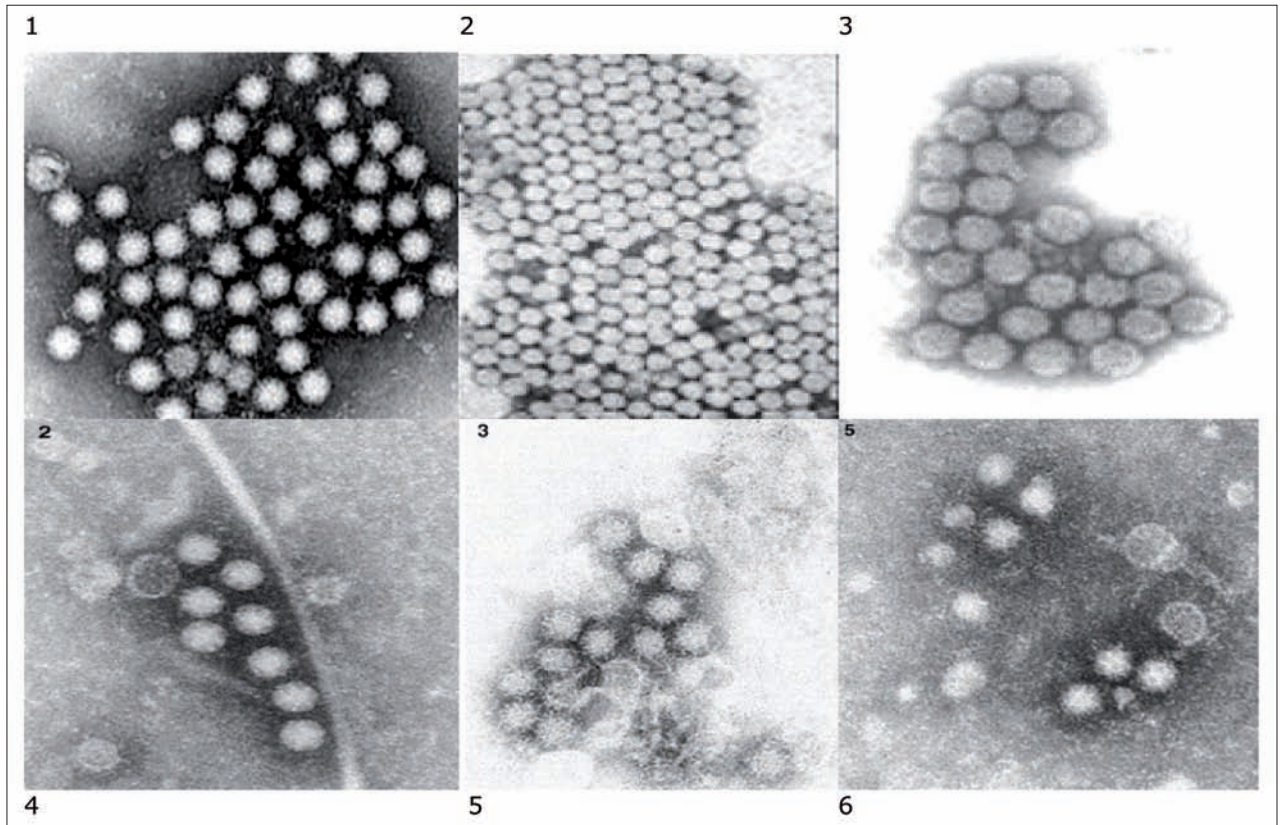


Fig 2. Microfotografías electrónicas de los principales virus alimentarios encontrados en muestras clínicas. 1, norovirus; 2, hepatitis A; 3, rotavirus; 4, adenovirus; 5, astrovirus; 6, sapovirus (3)

cia real de los virus entéricos, así como para estimar la proporción del total que se transmiten vía alimentaria, determinar los alimentos de alto riesgo y sus rutas transmisión y para valorar la aparición de cepas pandémicas y establecer los mecanismos de emergencia de las diferentes cepas.

Aunque Nov y HAV son los que presentan más incidencia como causantes de gastroenteritis y hepatitis respectivamente, son numerosos los virus que se han aislado de forma esporádica en agua y alimentos, como puede observarse a continuación (tabla 2 y fig.2).

Otro aspecto importante a destacar es el número de afectados de cada brote viral, ya que en ocasiones puede superar el millar de personas, con casos extremos como el que afectó en Shanghai a más de 310.000 personas por consumo de almejas infectadas por el virus de la hepatitis A (tabla 3).

Debido a la transmisión fecal-oral de los virus entéricos a través de las aguas contaminadas y manipuladores de alimentos infectados, los alimentos más susceptibles de contaminación son los siguientes:

1. Moluscos bivalvos: como consecuencia del crecimiento de estos animales en zonas costeras donde se vierten aguas fecales no depuradas o insuficientemente tratadas, dichos organismos son capaces de concentrar partículas víricas mediante la filtración del agua. Por otra parte, aunque la depuración de los moluscos contribuye a reducir los niveles de carga viral (Bosch et al,1994) y por tanto el riesgo por infección debido al consumo de

bivalvos, se ha demostrado que es insuficiente para eliminar los virus completamente (Lees, 2000). Asimismo, la tendencia al consumo de estos alimentos crudos o poco cocinados los convierte en la principal fuente de brotes víricos de origen alimentario. Aunque NoV y HAV son los más frecuentemente implicados, también se han aislado otros como Adenovirus, Rotavirus y Astrovirus.

2. Agua potable: el consumo de aguas contaminadas supone aproximadamente entre el 14-40% de las enfermedades gastrointestinales, por tanto, asegurar la calidad de la misma es fundamental, comenzando por disponer de un agua de origen de buena calidad. El objetivo de los tratamientos del agua es conseguir una reducción de los niveles de contaminación viral en 99.99%. Sin embargo, la filtración sólo reduce la carga viral en aproximadamente 10 veces, y si se acompaña de un proceso de desinfección de hasta 1000 veces (cloración, ozono, radiación UV), aunque este proceso va a depender de otros factores como la temperatura, pH y turbidez del agua. Por otra parte, los procesos de depuración de aguas se han mostrado menos eficientes que en el caso de las bacterias como demostraron los estudios realizados por Schab et al (1998) que comparó la eficacia de la depuración de las aguas en la eliminación de NoV frente a *E. coli* durante 48 h, encontrando una reducción del 95% en los niveles bacterianos frente a sólo un 7% en el caso de NoV. Además de una contaminación del agua en origen, son numerosos los casos documentados donde la fuente de contagio se ha produci-

do posteriormente, por ejemplo como consecuencia de fuertes lluvias o inundaciones (Kukkula et al 1999).

3. Vegetales y frutos blandos: son varios los factores que influyen en estos alimentos como fuente susceptible de contaminación viral. Su consumo crudo, el elevado contenido de agua y la manipulación previa a su consumo suponen una oportunidad de contaminación. En la mayor parte de los casos en los que se sospecha de estos alimentos como fuente de contaminación viral, son los manipuladores de alimentos la fuente de origen, aunque sólo en pocos casos se ha podido documentar (Carter, 2005).

4. Alimentos listos para el consumo: cualquier alimento que se pueda contaminar con agua con contaminación fecal o por medio de manipuladores de alimentos infectados y que no sufra un posterior proceso de tratamiento efectivo de eliminación viral, puede ser susceptible de originar brotes infecciosos.

Requisitos legales y desarrollo del método analítico

Respecto a la legislación aplicable sobre virus en alimentos no se establecen las metodologías oficiales a seguir y límites aplicables y las únicas referencias en las que se citan los virus aparecen en el Reglamento 2073 del 15 de noviembre del 2005 relativa a criterios microbiológicos aplicables a productos alimenticios, en la que se reseña únicamente lo siguiente:

- “Se establece que los indicadores fecales convencionales no son fiables para determinar presencia/ausencia de NoV, ni para determinar los periodos de depuración del marisco” y
- “Cuando los métodos analíticos estén suficientemente desarrollados deberán establecerse criterios para los virus patógenos en moluscos bivalvos vivos”.

Por tanto, debido a la existencia de este vacío legal, se hace necesario desarrollar una metodología analítica que permita analizar los virus de mayor incidencia en alimentos para poder ser utilizada en los laboratorios de control rutinario.

En relación con esto, el grupo europeo de normalización (CEN) a través del grupo de trabajo TAG 4 de detección de virus en alimentos (CEN/TC 275/WG6/TAG4), está desarrollando desde el año 2004 toda la metodología analítica necesaria para la normalización de las técnicas de análisis de virus entéricos en alimentos. El objetivo que se marcó fue el siguiente: “Desarrollar métodos estándar para

“La mejora de las redes de vigilancia epidemiológica y el desarrollo y estandarización de la metodología analítica van a contribuir a valorar de una forma más objetiva la incidencia real de los virus y sus vías de diseminación”

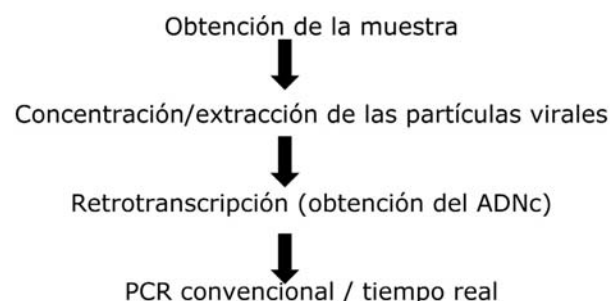
la detección de virus humanos en alimentos”. A lo largo de las diversas reuniones desarrolladas se han establecido las siguientes conclusiones:

- Trabajar con los virus patógenos claramente establecidos como agentes contaminantes de alimentos y concretamente en NoV causante de gastroenteritis y HAV.
- Establecer como matrices de interés las siguientes: **vegetales utilizados en ensalada, frutos blandos, moluscos bivalvos y agua embotellada por ser los que mayor incidencia tienen.**
- Utilizar como técnica de detección la RT-PCR a tiempo real, aunque considerando la RT-PCR convencional para secuenciar los amplificados obtenidos de gran interés en los estudios epidemiológicos.
- Considerar cada una de las etapas de la técnica, incidiendo en los

aspectos de mayor relevancia de cada una de ellas.

- Establecer los controles de proceso que se utilizarán para obtener resultados fiables.
- Marcar las pautas a seguir para realizar estudios de validación.

Teniendo en cuenta la situación actual de los métodos de análisis podemos establecer de forma general y simplificada, el siguiente esquema de detección de virus en aguas y alimentos basado en el uso de técnicas moleculares:



No obstante, dicho protocolo analítico va a variar considerablemente según la matriz considerada ya que cada una de ellas va a presentar peculiaridades respecto al proceso de extracción/concentración de las partículas virales, no difiriendo sustancialmente en el resto del procesado.

Conclusión

Existe una creciente preocupación en torno a la importancia que tienen los virus entéricos humanos transmitidos a través de los alimentos debido al gran impacto que tienen en la Salud Pública. La mejora de las redes de vigilancia epidemiológica y

Lugar	Año	Virus	Alimento	Observaciones
EEUU	1960	HAV	Moluscos	Primer brote documentado
Gran Bretaña	1976	NoV	Ostras	Primer brote documentado
EEUU	1980	NoV	Ostras	Primer brote documentado en dicho país
Shangai	1988	HAV	Moluscos	300.000 casos
Kanpur	1991	Hepatitis E		79.0000
Albacete	1999	NoV	Agua	341 afectados
EEUU	1997	HAV	Fresas	200 casos
Pensilvania	2003	HAV	Cebolleta	Más de 500 casos
Sudán	2004	Hepatitis E	Agua	>6861 casos

Tabla 3. Principales brotes alimentarios asociados a virus

el desarrollo y estandarización de la metodología analítica van a contribuir a valorar de una forma más objetiva la incidencia real de los virus y sus vías de diseminación.

En la actualidad existe un mandato de la UE (M381, febrero 2007) dirigido al Comité Europeo de Normalización, en el que se incluye un programa de estandarización y validación relativo a la elaboración de nuevos métodos en microbiología de alimentos de diversos patógenos entre los que se encuentran los norovirus y virus de la hepatitis A (grupo CEN/TC 275/WG6/TAG4). Dicho proyecto, liderado por el laboratorio europeo de referencia para el análisis de moluscos en colaboración con un numeroso grupo de laboratorios europeos, implica el desarrollo de metodologías para el análisis de moluscos, productos vegetales y aguas, así como la realización de estudios interlaboratorios que avalen y validen el posterior uso de los métodos.

Es previsible que en un plazo relativamente breve (2008-9) exista una versión final del método de análisis, estando prevista su publicación como norma ISO internacional para 2011-12. **Fruto de la disponibilidad de dicho método de análisis, las autoridades sanitarias establecerán los criterios de control a realizar sobre determinados productos que supongan un peligro asociado a este nuevo tipo de riesgo biológico.**

Bibliografía

1. Bosch et al. Should shellfish be purified before public consumption? *Lancet*, 1994, 334: 1024-1025.
2. Bofill-Mas et al. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emer-

gentes humanos. *Revista Española de Salud Pública*, 2005, vol.79, N°2.

3. Carter. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. A review. 2005, *J of Appl Microb*, 98, 1354-1380.
4. Costafreda I et al. 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 and Environmental Microbiology*, 2006, p.3846-3855.
5. CEN (Comité Europeo de Normalización): CEN/TC 275/WG6/TAG4
6. D'Souza et al. Persistence of calicivirus on environmental surfaces and their transfer to food. *Int. J of Food Microb*. 2006, (108), 84-91.
7. Iversen et al. Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet*, 1987 (8558): 556-558.
8. Jaykus et al. Enteric viruses as emerging agents of foodborne disease. *Irish J Agr Food Res.*, 2000, 39:245-255.
9. Kukkula et al. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect dis*, 1999, 180, 1771-1776.
10. Moe et al. Determination of Norwalk dose-response in human volunteers. In: abstracts of the 98th annual meeting of the American society of microbiology. 1998.
11. Sair A. et al. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2002, vol. 1, p. 73-89.
12. www.eurosurveillance.org
13. www.cdc.gov/foodnet