

Título: MONITORIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN, GENOTIPADO E INACTIVACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS EN LA CADENA ALIMENTARIA

Nombre: Díez Valcarce, Marta

Universidad: Universidad de León

Departamento: Sanidad animal

Fecha de lectura: 30/11/2012

Mención a doctor europeo: concedido

Programa de doctorado: Sanidad Animal y Reproducción

Dirección:

> **Director:** MARTA HERNÁNDEZ PÉREZ

> **Director:** DAVID RODRÍGUEZ LAZARO

Tribunal:

> **presidente:** ALBERT BOSCH NAVARRO

> **secretario:** M ISABEL FERNÁNDEZ NATAL

> **vocal:** NIGEL COOK

> **vocal:** RAUL ORTIZ DE LEJARAZU

> **vocal:** JORDI ROVIRA CARBALLIDO

Descriptor:

> VIROLOGIA

> BIOLOGIA MOLECULAR

> MICROBIOLOGIA

> MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

> 2012diezvmonit.pdf

Localización: BIBLIOTECA UNIVERSITARIA SAN ISIDORO

Resumen: Para reducir el riesgo asociado a la contaminación vírica de los alimentos y conseguir así productos seguros y saludables para los consumidores son esenciales dos elementos. Por un lado la disponibilidad de métodos fiables para la detección de virus y por otro es necesario explorar, y explotar, el uso de tecnologías eficaces para la inactivación de los virus presentes en las muestras de alimentos. Con este doble objetivo, y dentro del marco del proyecto europeo FP7 KBBE ¿Integrated Monitoring and Control of Foodborne Viruses in European Food Supply Chains¿ (VITAL, www.eurovital.org), en esta Tesis se ha trabajado en la estandarización de la metodología de análisis, desde la toma de muestras de alimento, hasta la concentración, extracción y

detección de los virus de origen alimentario y se ha evaluado la eficacia de tecnologías emergentes de inactivación vírica que pueden ser aplicadas en la industria alimentaria.

Para ello, se han diseñado, o bien optimizado, tres controles analíticos para su implantación en los protocolos estandarizados de detección de virus de origen alimentario mediante métodos moleculares. El uso de un control de procesado de la muestra (SPCV) y de controles internos de amplificación (IAC) han demostrado ser una estrategia fiable y sólida que permite evaluar el funcionamiento correcto de los métodos de análisis de alimentos. En el caso del SPCV, no sólo se demostró su aplicación experimentalmente, sino que su uso se caracterizó más en profundidad mediante un estudio que permitió dilucidar las diferencias entre dos posibles virus candidatos (el norovirus murino- MNV-1, y el mengovirus-vMC0). No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de extracción de ambos virus incluso hasta 24 horas después de ser añadidos a la muestra. Sin embargo, se observaron diferencias significativas dependiendo de la etapa en la que se incorporaron al proceso analítico; los rendimientos de extracción fueron mayores cuanto más tarde se añadió el SPCV a la muestra, lo que indica que durante el proceso hay una pérdida sustancial de virus. Por ello es recomendable la incorporación del SPCV al comienzo del procesado de la muestra, favoreciendo de esta manera un seguimiento más preciso del análisis. La identificación del virus no es suficiente a la hora de tomar decisiones sobre la salubridad de los alimentos, es necesario cuantificar el grado de contaminación vírica. Para llevar a cabo una cuantificación precisa de los virus se utilizaron ácidos nucleicos sintéticos. Se diseñaron dos moléculas que contenían 3 y 4 dianas específicas para varias especies de virus de origen alimentario con genomas ADN y ARN, respectivamente. Estas moléculas, además de para su uso como estándares de cuantificación, sirven como controles positivos en los sistemas de PCR, puesto que suponen una alternativa al uso de ácidos nucleicos extraídos de los virus, que tan frecuentemente son escasos de manera natural. La incorporación de estos controles en los métodos de detección de virus fue evaluada mediante un estudio de validación inter-laboratorio en el que participaron once laboratorios de nueve países europeos diferentes. Se determinó la presencia del adenovirus humano - HAdV en frambuesas y se utilizó el MNV-1 como SPCV. Se trata del primer estudio de validación de un método de detección de virus en alimentos a nivel internacional. Los resultados en su conjunto se consideraron suficientemente robustos, con una sensibilidad y una especificidad del ensayo del 98,5% y 69,7%, respectivamente.

La detección de virus mediante PCR a tiempo real, pese a ser el método de elección por su sensibilidad y especificidad, presenta un inconveniente importante, la imposibilidad de distinguir entre partículas infecciosas y no infecciosas. Mediante la aplicación de un tratamiento enzimático a las muestras antes de la etapa de amplificación de ácidos nucleicos se pretendió superar este problema. A pesar de tratarse de una aproximación teóricamente correcta, el tratamiento enzimático no resultó útil para cuantificar la capacidad infecciosa del virus, puesto que no se encontró una correlación clara entre la pérdida de capacidad infecciosa del virus medida mediante los tradicionales métodos celulares (TCD₅₀) y los métodos moleculares.

Se llevaron a cabo tres estudios de muestreo a nivel europeo: dos estudios de prevalencia en dos cadenas de suministro de alimentos distintas (producción de carne de cerdo y producción de moluscos bivalvos) y un estudio de prevalencia en granjas porcinas. En la cadena de producción de carne de cerdo, los virus estudiados fueron el virus de la hepatitis E - HEV, puesto que se trata de un agente zoonótico emergente y el adenovirus porcino-PAAdV, como un indicador de contaminación fecal de origen porcino. También se llevó a cabo un estudio sobre la presencia de HEV en granjas porcinas y se estimó la tasa de transmisión de la infección entre animales infectados y susceptibles. En el caso de los moluscos, los virus estudiados fueron los norovirus humanos- NoV (genogrupo I y II), HEV y el virus de la hepatitis A- HAV. HAdV fue también objeto de estudio por su posible uso como indicador de la presencia de virus patógenos. Nuestros resultados muestran la presencia de ARN de HEV

en toda la cadena de producción de carne de cerdo en Europa (desde la granja a la mesa), lo que representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores. La detección frecuente de adenovirus porcino en las heces de cerdo, junto con su escasa presencia en los productos derivados (carne y salchichas), y su total ausencia en las muestras hígado, indica que el riesgo de contaminación con heces de cerdo durante el sacrificio y manipulación de los alimentos parece ser bajo pero no completamente inexistente. Se estimó que la tasa de transmisión de la infección de HEV de un animal infectado a uno susceptible es de 10 a 27 días, en base a la presencia de HEV en las heces recogidas en granjas de seis países europeos. Asimismo, se detectaron virus patógenos (NoVGI, NoVGII y HEV) en los mejillones muestreados en el punto de venta. Teniendo en cuenta que los moluscos bivalvos se pueden consumir crudos o poco cocidos, se utilizaron modelos de dosis-respuesta para evaluar el riesgo asociado a su consumo y se observó que tan sólo en el caso de NoV el consumo de mejillones representaba un riesgo para los consumidores. Las muestras de mejillones mostraron también una alta prevalencia de HAdV, aunque no se encontró ninguna correlación entre su presencia y la de los virus patógenos. Podemos concluir tan solo que las muestras estuvieron en contacto con aguas contaminadas con heces humanas, pero este hecho por sí solo no apoya el uso del adenovirus humano como indicador de la presencia de virus patógenos.

Finalmente, con el fin de reducir el riesgo asociado a la contaminación vírica de los alimentos se llevaron a cabo ensayos con dos tecnologías emergentes para la inactivación de virus: las altas presiones hidrostáticas (HHP) y la utilización de compuestos naturales presentes en los aceites esenciales (EO) de las plantas. Se trata de dos tecnologías no térmicas, por lo tanto de potencial uso sobre alimentos termolábiles como los vegetales y los frutos rojos. En los ensayos se utilizaron dos virus, MNV 1-y HAdV-2, un virus subrogado del norovirus humano y un virus patógeno humano, con genomas de ARN y ADN, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron dispares, mientras que las HHP demostraron ser una opción eficaz ya que tratamientos de 400 MPa o superiores alcanzaron un objetivo de seguridad alimentaria (FSO) de al menos 4 log₁₀ de reducción en la capacidad infecciosa del virus en 2,5 min o ~1,5 min, en el caso de MNV-1 y HAdV -2, respectivamente. En el caso de los EO, la aplicación de los extractos de mejorana e hisopo no alcanzó los niveles de inactivación vírica esperados para ser considerado un procedimiento adecuado para la descontaminación de alimentos.