

**IMPLICACIONS  
DE LA PRESÈNCIA  
DE VIRUS ENTÈRICS  
A L'ENTORN MARÍ,  
A CÀRREC  
D'ALBERT BOSCH,  
DE LA UNIVERSITAT  
DE BARCELONA**

A les aigües que reben contaminació fecal hi són presents al voltant d'un centenar de virus diferents que poden causar un ampli ventall de malalties als éssers humans (taula 1). Aquestes malalties inclouen les gastroenteritis, l'hepatitis, la meningitis, la poliomièlitis i, potser, la diabetis. El terme *virus entèric* inclou qualsevol virus que es pugui trobar a l'intestí.

Aquests virus són excretats en quantitats extraordinàriament elevades en la femta dels individus infectats. Malalts d'hepatitis o gastroenteritis arriben a excretar entre  $10^5$  i  $10^{11}$  partícules per gram (o mil·lilitre!) de matèria fecal. Els virus són presents en grans quantitats en les aigües residuals brutes i els sistemes actuals de tractament no garanteixen l'eliminació total dels patògens vírics (Rao i Melnick, 1986), per la qual cosa els virus es converteixen en contaminants ambientals.

No obstant això, només uns quants d'aquests patògens vírics han estat relacionats epidemiològicament amb malalties causades per ingestió d'aigües o d'aliments contaminats (Bosch *et al.*, 1991). En una estimació de l'any 1979, es va calcular que anualment moren entre cinc i divuit milions de persones al món per gastroenteritis, i que els rotavirus per si mateixos són responsables cada any de la mort de més d'un milió de nens (Farthing, 1989). D'altra banda, la regió mediterrània és endèmica per a l'hepatitis A, i la poliomièlitis encara estar per eradicar, malgrat que les previsions de l'Organització Mundial de la Salut són que ho estigui l'any 2003. Els adenovirus, els astrovirus i els calicivirus, tots causants de gastroenteritis, i el virus de l'hepatitis E, són també virus rellevants, des del punt de vista sanitari, que es poden trobar a l'ambient (Bosch, 1998).

La taula 2 mostra els nivells de mortalitat associada a alguns virus entèrics, tal com es descriuen a la bibliografia (Assaad i Borecka, 1977; *Centers for Disease...*).

TAULA 1. *Virus entèrics humans. El terme virus entèric s'aplica genèricament a qualsevol virus de transmissió fecal-oral. No ha s'ha de confondre amb el d'Enterovirus, que constitueixen un gènere dins de la família Picornaviridae. S'han descrit molts virus diferents que pertanyen als gèneres esmentats en aquesta taula que són excretats en la femta dels individus infectats*

| <i>Gènere</i>  | <i>Nom vulgar</i>                     | <i>Simptomatologia</i>  |
|----------------|---------------------------------------|---|
| Enterovirus    | poliovirus                            | paràlisi, meningitis, febre   |
|                | coxsackievirus A,<br>coxsackievirus B | herpangina, meningitis, febre, processos respiratoris, malaltia de la mà, peu i boca, miocarditis, anomalies cardíques, erupcions, pleurodinia, diabetis? |
|                | echovirus                             | meningitis, febre, processos respiratoris, erupcions, gastroenteritis   |
| Hepatovirus    | hepatitis A                           | hepatitis   |
| Reovirus       | reovirus humà                         | desconeguda   |
| Rotavirus      | rotavirus humà                        | gastroenteritis   |
| Mastadenovirus | adenovirus humà                       | gastroenteritis, processos respiratoris, conjuntivitis  |
| Calicivirus    | calicivirus humà                      | gastroenteritis   |
|                | virus de Norwalk                      | gastroenteritis, febre  |
|                | virus de Sapporo                      | gastroenteritis   |
|                | hepatitis E                           | hepatitis   |
| Astrovirus     | astrovirus humà                       | gastroenteritis   |
| Parvovirus     | parvovirus humà                       | gastroenteritis   |
| Coronavirus    | coronavirus humà                      | gastroenteritis, processos respiratoris   |
| Torovirus      | torovirus humà                        | gastroenteritis   |

315

TAULA 2. *Taxes de mortalitat calculades per a alguns virus entèrics*

| <i>Virus</i>     | <i>Taxa de mortalitat (%)</i> |
|------------------|-------------------------------|
| Poliovirus 1     | 0,90                          |
| Coxsackievirus A | 0,12-0,50                     |
| Coxsackievirus B | 0,59-0,94                     |
| Echovirus        | 0,27-0,29                     |
| Hepatitis A      | 0,60                          |
| Rotavirus        | 0,01-0,12                     |
| Norwalk          | 0,0001                        |
| Adenovirus       | 0,01                          |

Un aspecte crític per a la salut pública és si un cop en l'ambient aquests virus són capaços de sobreviure durant el temps suficient i en nombre suficient per a representar un autèntic risc sanitari per a les persones que estan en contacte amb aigües recreacionals contaminades, o que consumeixen aigua o marisc contaminats. La supervivència vírica és sempre més curta en aigua marina que no pas en aigües dolces. Aquest terme ha estat comprovat en estudis anteriors que s'han efectuat al nostre laboratori (Bosch, 1995).

### 1. SUPERVIVÈNCIA VÍRICA EN AIGUA DE MAR

Al nostre laboratori s'han dut a terme estudis sobre la persistència de virus entèrics en l'entorn marí. En aquests estudis s'ha investigat la influència de la temperatura, de la presència de sòlids en suspensió, del tipus de virus entèric o de l'origen geogràfic de l'aigua de mar. Els factors antivírics més rellevants presents en aigües marines són la salinitat i l'activitat de bacteris marins autòctons que poden manifestar un efecte virucida (Gironès *et al.*, 1990).

Per a palesar la importància de la temperatura sobre la supervivència de virus i de la rellevància de la soca de virus entèric, s'han fet estudis comparatius de la persistència de poliovirus (PV) i del virus de l'hepatitis A (HAV), a 5° i a 25°, en aigua de mar. Es va observar que es detectava infectivitat residual per a ambdós virus a 5° fins als trenta dies. Quan s'augmentava la temperatura fins a 25°, s'observava més supervivència de l'HAV que del PV. Tal com era previst, la persistència vírica és més elevada a baixa temperatura (5°) que a alta temperatura (25°). Quan s'afegia a l'aigua de mar sediments marins, hi havia un augment considerable de la supervivència vírica, que es palesava sobretot a 25°.

És lògic assumir que en la inactivació vírica hi partici-

paven factors ambientals i altres paràmetres relacionats amb la composició de l'aigua que varia segons la procedència geogràfica de la mostra. Hem dut a terme estudis de la persistència de PV en aigües marines de la costa atlàntica a Carolina del Nord, als Estats Units, i a la costa mediterrània catalana. Els nivells d'inactivació vírica van ser significativament més elevats en aigües mediterrànies que no pas en les atlàntiques. Aparentment, totes les aigües marines contenen una sèrie de factors que potencialment poden tenir un efecte antivíric, i de fet l'activitat antivírica global resulta dels factors antivírics que dominen en una determinada mostra d'aigua (Bosch *et al.*, 1993).

## 2. VIRUS ENTÈRICS HUMANS EN MARISC

En condicions hidrogràfiques favorables, els bivalves poden arribar a filtrar volums importants d'aigua i a retenir als seus teixits comestibles els contaminants presents en aquesta aigua. En estudis de contaminació experimental, hem comprovat que entre el 4 % i el 56 % dels virus presents en l'aigua s'acumulen en teixits de marisc en només sis hores (Abad *et al.*, 1997). S'han descrit moltes malalties víriques com a conseqüència del consum de marisc contaminat per virus: són remarcables nombrosos brots de gastroenteritis i d'hepatitis (Mele *et al.*, 1989). En aquest sentit, cal destacar el brot més gran que es recorda, que va ser causat pel consum de tellerines que el 1988 va originar a Shanghai prop de 300.000 casos d'hepatitis A (Hu *et al.*, 1991).

El consum anual de marisc a la Mediterrània és d'unes 12.000 t anuals. Malauradament, la normativa vigent de la Unió Europea ja no obliga a depurar el marisc («Normes de qualitat...», 1993). Un altre motiu de preocupació derivat del consum de marisc és que habitualment són consumits crus o

molt poc cuinats. En estudis amb musclos contaminats experimentalment amb virus, hem comprovat que entre el 0,41 % i l'1,78 % dels virus inicialment presents es detectaven en musclos fets al vapor en el moment de l'obertura de les valves, i cinc minuts més tard encara s'hi detectaven entre el 0,32 % i el 0,14 % dels virus que s'hi havien afegit (Abad, 1997). L'eficàcia dels sistemes habituals de depuració del marisc no eliminen completament els patògens vírics presents en el teixit dels bivalves. Malgrat tot això, el risc d'infecció és molt menor si es consumeix el marisc depurat i cuinat (Bosch, 1994). El nivell de risc derivat del consum d'uns seixanta grams de marisc cru contaminat amb virus causants de gastroenteritis es calcula que és del 54 %. El risc derivat del consum del mateix marisc fet al vapor és entre l'1,6% i el 2 %. Si el marisc és prèviament depurat durant 96 hores, el risc d'infecció cau a valors de l'11,5 % per a marisc cru i entre el 0,04% i el 0,06% per a marisc fet al vapor. Per tant, malgrat que per llei ja no és obligatori depurar el marisc, el cert és que la depuració pot reduir de forma important el risc d'adquirir una infecció vírica per consum de marisc.

Entre abril de 1988 i març de 1989, es van dur a terme estudis sobre la presència de virus entèrics humans en mostres d'aigües residuals i de mar de Sant Carles de la Ràpita, així com mostres de musclos provinents de la mateixa zona. Es van aïllar, respectivament, rotavirus, els principals agents de gastroenteritis infantil arreu del món, i el virus de l'hepatitis A en el 33,% i el 25 % de les mostres d'aigua residual, i en el 30 % i el 20 % de les mostres d'aigua de mar. En les mostres de teixit de musclos, es va detectar la presència de rotavirus i virus de l'hepatitis A en el 50 % i el 36, respectivament, de les mostres analitzades.

La normativa europea vigent sobre marisc i zones de mariscar està basada exclusivament en paràmetres bacterians («Norma de qualitat...», 1991; *Council directive...*,

1993). En els nostres estudis no vàrem trobar cap correlació entre els indicadors bacterians i els virus. Es van detectar virus patògens humans en zones marines que, sempre segons els criteris bacterians de qualitat d'aigües, poden ser considerades impol·lutes i adients per al cultiu de marisc (Jofre *et al.*, 1993). En aquestes mateixes aigües s'ha detectat, a més d'enterovirus i rotavirus, el virus de l'hepatitis A.

Els coliformes i els estreptococs han estat considerats indicadors adients de la qualitat de mostres de marisc. Després de distribuir mostres de musclos en dos grups segons si tenien en els teixits valors superiors o inferiors a 300 coliformes fecals per cada 100 grams de teixit, nivells límits estipulats a la normativa, es va procedir a detectar virus entèrics humans en les mateixes mostres. Es van detectar aquests patògens vírics en mostres de musclos, independentment dels nivells dels microorganismes indicadors bacterians (taula 3). Malgrat que les proporcions relatives de cada virus variaven lleugerament en cada grup de musclos, es van aïllar rotavirus i virus de l'hepatitis A en teixits de marisc que contenen nivells d'indicadors bacterians per sota dels límits fixats en la legislació actual i que, per tant, sempre segons aquesta mateixa legislació, són considerats aptes per al consum públic.

TAULA 3. *Virus entèrics humans detectats en musclos agrupats segons els nivells de coliformes fecals detectats en els seus teixits*

| <i>Grup de marisc</i>     | <i>Enterovirus</i> | <i>Rotavirus</i> | <i>Hepatitis A</i> | <i>Virus en general</i> |
|---------------------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------------|
| Núm. coliformes >300/100g | 57 %               | 71 %             | 40 %               | 86 %                    |
| Núm. coliformes <300/100g | 0 %                | 56 %             | 40 %               | 78 %                    |

Una idea que cal tenir clara és que en qualsevol cas els virus tenen una supervivència més gran que els bacteris entèrics i, per tant, és completament erroni, i insegur basar-se en paràmetres exclusivament bacterians per a garantir la seguretat vírica d'una aigua o d'un aliment. De fet, hi ha casos

ben estudiats de brots de malalties entèriques causats per ingestió d'aigua que complia la normativa referent a paràmetres bacterians. Nosaltres mateixos hem descrit un brot d'hepatitis que es va produir en un campament militar per consum d'aigua que era lliure de bacteris (Bosch *et al.*, 1991). Aquest mateix error és el que comet la Unió Europea en la seva normativa sobre el control microbiològic del marisc. Segons aquesta normativa, només cal tenir en compte paràmetres bacterians, la qual cosa és totalment inadequada, ja que es donen sovint casos d'hepatitis A i de gastroenteritis causats pel consum de marisc controlat segons aquestes normatives (Mele *et al.*, 1989).

### 3. ESTUDI D'UN BROT D'HEPATITIS A LA COMUNITAT VALENCIANA CAUSAT PEL CONSUM DE TELLERINES CONGELADES

320

La setmana 39 de 1999, es va observar un augment de la declaració de casos d'hepatitis A a l'Àrea de Salut 13 de la Comunitat Valenciana, en què se'n va notificar 10 casos. Entre les setmanes 37 i 52 del mateix any, es van declarar 107 casos, la qual cosa representa el 85,6% del total de casos declarats durant tot l'any 1999 a la mateixa àrea de salut.

A partir de la setmana 41 també es va observar un increment en la incidència d'hepatitis A a l'Àrea de Salut 10, limítrofa amb l'anterior, i es van comptabilitzar, des de la setmana 41 fins a la 51, 56 casos, que representen el 91,8 % del nombre anual de casos declarats a la mateixa àrea.

A l'Àrea de Salut 7 es va començar a notar augment de casos d'hepatitis A a partir de la setmana 42, i es van declarar 11 casos des d'aquesta setmana fins a la 46, que representa el 91,7 % de la incidència anual. D'altra banda, es



va observar a l'Àrea de Salut 6 un degoteig no habitual de casos d'hepatitis A, ja que entre la setmana 39 i la 51 es van enregistrar 15 casos relacionats amb el brot d'hepatitis A, la qual cosa representa el 29 % de la incidència anual.

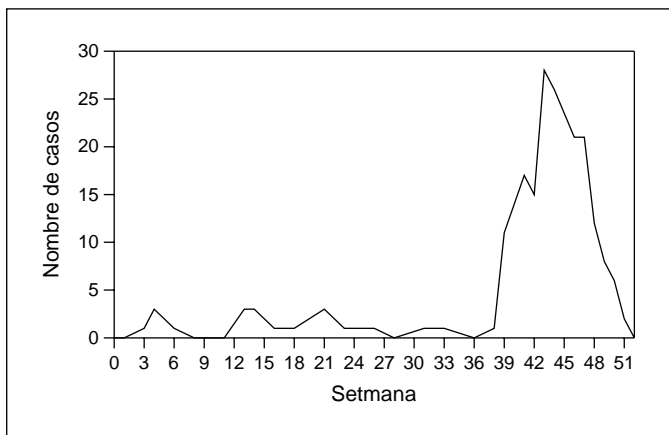


FIGURA 1. *Incidència anual d'hepatitis A a les àrees de salut afectades pel brot.*

Totes les àrees de salut afectades pertanyen a la província de València, amb una població de 593.375 habitants, la qual cosa representa el 14,8 % de la població total de la Comunitat Valenciana. A la figura 1 es pot comprovar la distribució temporal del total de casos declarats durant l'any 1999, en què s'observa l'augment de la notificació setmanal de casos a partir de la setmana 39, amb una incidència màxima entre les setmanes 42 i 46, en les quals es concentren gairebé el 50 % dels casos notificats al llarg de l'any.

Per a determinar les possibles causes del brot d'hepatitis A, es van dur a terme 389 enquestes epidemiològiques, que corresponen a 188 casos i a 201 controls. S'han inclòs com a factors de risc a estudiar l'assistència a llars d'infants

o escoles, el contacte familiar, el contacte sexual, les avaries de la xarxa pública d'abastament d'aigües, el consum d'aigua embotellada o de fonts no controlades, el consum d'aliments com ara verdures crues, tellerines, musclos, cloïsses, ostres i crustacis. L'anàlisi de l'associació entre els diferents factors de risc estudiats va donar una sola associació positiva entre el consum de tellerines —*tellines*, com es diu a València—, importades congelades del Perú i l'aparició de la malaltia hepàtica (taula 4).

TAULA 4. *Associació de l'hepatitis A amb l'exposició a diferents aliments i begudes*

| <i>Factor</i>       | <i>OR<sup>a</sup></i> | <i>IC<sup>b</sup> 95 %</i> | <i>P<sup>c</sup></i> |
|---------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|
| Verdures            | 1,07                  | 0,68 – 1,69                | 0,42                 |
| Crustacis           | 0,79                  | 0,45 – 1,38                | 0,22                 |
| Musclos             | 0,85                  | 0,50 – 1,43                | 0,29                 |
| Tellerines          | 3,89                  | 2,36 – 6,41                | 0,000                |
| Navalles            | 1,90                  | 0,49 – 7,97                | 0,23                 |
| Aigua de xarxa      | 0,86                  | 0,53 – 1,39                | 0,29                 |
| Aigua no controlada | 0,64                  | 0,35 – 1,17                | 0,07                 |
| Aigua envasada      | 1,07                  | 0,67 – 1,71                | 0,42                 |

*a.* OR: odds ràtio.

*b.* IC: interval de confiança.

*c.* p: valor de la *p*.

Es va utilitzar la tècnica d'amplificació per RT-PCR com a sistema de diagnòstic de l'HAV en mostres de tellerines recollides en llars i restaurants relacionats amb casos d'hepatitis d'aquest brot. Es va detectar l'HAV en el 75 % de les mostres de tellerines analitzades (Bosch *et al.*, 2001). També es van detectar enterovirus i rotavirus, respectivament, en el 55 % i el 60 % de les mostres analitzades (Bosch *et al.*, 2001). En canvi no es va trobar ni astrovirus, ni el virus de Norwalk, ni el virus de l'hepatitis E, que també es van buscar en les mostres de tellerines (taula 5).

TAULA 5. *Detecció de l'HAV en tellerines procedents de llars i restaurants involucrats en casos d'hepatitis A*

| <i>Procedència</i> | <i>POS/TOT<sup>a</sup></i> | <i>%<sup>b</sup></i> |
|--------------------|----------------------------|----------------------|
| Alzira             | 4/6                        | 67                   |
| Utiel              | 1/1                        | 100                  |
| Pontón             | 1/1                        | 100                  |
| Requena            | 3/3                        | 100                  |
| Mislata            | 2/2                        | 100                  |
| Castelló           | 0/1                        | 0                    |
| Xàtiva             | 4/6                        | 67                   |
| Total              | 15/20                      | 75                   |

*a.* POS/TOT: nombre de mostres positives respecte del nombre total de mostres analitzades.

*b.* %: percentatge de positivitat.

Es van dur a terme estudis d'epidemiologia molecular d'aïllaments de l'HAV procedents de les mostres de marisc i també de mostres clíniques, sèrums i femtes, de pacients amb hepatitis A. Aquests estudis van evidenciar la existència de si més no sis variants de l'HAV, que diferien entre si en petites deleccions en la zona rica en pirimidines de l'extrem 5' del genoma víric. Aquestes variants pertanyien totes a un mateix genotip de l'HAV, IB, que és originari, malgrat que no exclusiu, de l'Amèrica del Sud (Roberston, 1992).

Actualment es disposa de sistemes de diagnòstic amb prou sensibilitat per a detectar i caracteritzar els patògens vírics presents en aliments, com poden ser aigües o marisc. És inqüestionablement erroni emprar indicadors bacterians per a controlar la presència de virus a les mostres esmentades. Per tant, caldria establir una legislació que restringís el nivell de virus entèrics en aigua i marisc, que evitaria bastants brots de gastroenteritis i hepatitis causats per aquests virus.

En el cas del brot d'hepatitis A de València es van prendre una sèrie de mesures profilàctiques, com la immobilització d'unes 200 t de tellerines importades del Perú, i

immunitzacions passives i actives de la població en contacte amb casos d'hepatitis. Gràcies a aquestes mesures es va poder controlar el brot d'hepatitis A i donar-lo per acabat abans del final de 1999.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABAD, F. X.; PINTÓ, R. M.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. (1997). «Viruses in mussels: public health implications and depuration». *J. Food Prot.*, 60, p. 677-681.
- ASSAAD, F.; BORECKA, I. (1977). «Nine-year study of WHO virus reports on fatal viral infections». *Bull. World Health Organ.*, núm. 55, p. 445-453.
- BOSCH, A. (1995). «The survival of enteric viruses in the water environment». *Microbiologia SEM.*, núm. 11, p. 393-396.
- (1998). «Human enteric viruses in the water environment». *Internatl. Microbiol.*, núm. 1, p. 191-196.
- BOSCH, A.; ABAD, F. X.; GAJARDO, R.; PINTÓ, R. M. (1994). «Should shellfish be purified before public consumption?». *The Lancet*, núm. 344, p. 1024-1025.
- BOSCH, A.; GRAY, M.; DíEZ, J. M.; GAJARDO, R.; ABAD, F. X.; PINTÓ, R. M.; SOBSEY, M. D. (1993). «The survival of human enteric viruses in seawater». *MAP Tech. Rep. Ser.*, núm. 76, p. 1-7.
- BOSCH, A.; LUCENA, F.; DíEZ, J. M.; GAJARDO, R.; BLASI, M.; JOFRE, J. (1991). «Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak». *J. Amer.*, núm. 83, p. 80-83.
- BOSCH, A.; SÁNCHEZ, G.; LE GUYADER, F.; VANACLOCHA, H.; HAUGARREAU, L.; PINTÓ, R. M. (2001). «Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak». *Wat. Sci. Tech.* [En premsa]
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1995).

- Summary of notifiable diseases*. United States, MMWR Morb. Mortal. Wkly Re. 44 (53).
- Council directive of 15th of july. 91/492/CEE, J. Europ. Comm., 1991.
- CRAUN, G. F. (1991). «Causes of waterborne outbreaks in the United States». *Wat. Sci. Tech.*, núm. 24, p. 17-20.
- FARTHING, M. J. G. (1989). *Viruses and the gut*. Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French, Ltd.
- GIRONÈS, R.; JOFRE, J.; BOSCH, A. (1990). «Isolation of marine bacteria with antiviral properties». *Can. J. Microbiol.*, núm. 35, p. 1015-1021.
- HU, M.; KANG, L.; YAO, G. (1991). «An outbreak of viral hepatitis in Shanghai». A: BIANCHI, L.; GEROK, W.; MAIER, K. P.; DEINHARDT, F. [ed.]. *In Infectious diseases of the liver*. Falk symposium, núm. 54, p. 361-372.
- JOFRE, J.; LUCENA, F.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. (1993). «Detection of human enteric viruses in mussels (*Mytilus edulis*)». A: FARRAH, S. R.; GERBA, C. P.; WALTER, R. [ed.]. *Contamination of the environment by viruses and methods of control*. Tom 112, Wiener Mitteilungen, p. 105-110.
- MELE, A.; RASTELLI, M. G.; GILL, O. N.; DIBISCEGLIE, D.; ROSMINI, F.; PARDELLI, G.; VALTRIANI, C.; PATRIARCHI, P. (1989). «Recurrent epidemic hepatitis A associated with the consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures». *Am. J. Epidemiol.*, núm. 130, p. 540-546.
- «Decret de 31 de maig, pel qual s'estableixen les normes de qualitat per a mol·luscs bivalves depurats». *Butlletí Oficial de l'Estat*, núm. 137, p. 17298-17300.
- «Reial decret 345/1993, de 5 de març, pel qual s'estableixen les normes de qualitat de les aigües i de la producció de mol·luscs i altres invertebrats marins vius en el litoral espanyol». *Butlletí Oficial de l'Estat*, núm. 74 (27 març 1993).
- RAO, V. C.; MELNICK, J. L. (1986). «Environmental Viro-

logy». A: COLE, J. A.; KNOWLES, C. J.; SCHLESSINGER, D. [ed.]. *Aspects of Microbiology*. Vol. 13. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

ROBERTSON, B. H.; JANSEN, R. W.; HANNA, B.; TOTSUKA, A.; NAINAN, O. V.; SIEGL, G.; WIDELL, A.; MARCOLIS, H. S.; ISOMURA, S.; ITO, K.; ISHIZU, T.; MORITSUGU, Y.; LEMON, S. M. (1992). «Genetic relatedness of hepatitis A strains recovered from different geographical regions». *J. Gen. Virol.*, núm. 73, p. 1365-1377.