



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia

La contaminació vírica en mol·luscs bivalves: detecció i caracterització

Vist-i-Plau de la
directora de la Tesi

Memoria presentada
per Meritxell Formiga
Cruz per a optar al grau
de Doctor en Biologia

Dra. Rosina Girones Llop

Barcelona, desembre 2003

Programa de Doctorat. Microbiologia Ambiental i Biotecnologia
Bien: 1999-2001

Al meu pare
A la meua àvia Maria

Recibiré postales del extranjero,
Tiernas y ajadas, besos, recuerdos,
cómo están todos, te echo de menos,
cómo pasa el tiempo...
Seremos otros, seremos más viejos,
y cuando por fin me observe en tu espejo,
espero al menos que me reconozca,
me recuerde al que soy ahora.

...

Vértigo que el mundo pare,
que corto se me hace el viaje.
¿Me escucharás, me buscarás
cuando me pierda
y no señale el norte
la estrella polar?

Las frías mañanas en la facultad,
Tú casi siempre huías conmigo al bar,
y me enfadaba si preferías
el aula a mi compañía.
Sobre la mesa botellas vacías,
Es tan sano arrancarte esa risa,
Y ahora cambiemos el mundo, amigo,
que tú ya has cambiado el mío.
Qué haré cuando te busque en la clase
y mi eco me responda al llamarte.
Otros vendrán y me dirán
que te marchaste, que te cansaste
ya de esperar.

...

Y en el futuro espero, compañero, hermanos,
ser un buen tipo, y no traicionaros.
Que el vértigo pase y que en vuestras ventanas
luzca el sol cada mañana.
Pero basta de lamentos,
brindemos, es el momento,
que estamos todos y no falta casi nadie,
que hay que apurar la noche que acaba de empezar.

– Ismael Serrano. Vértigo.

Per fi he arribat a bon port. Ha estat una llarga travessia, que de vegades semblava a punt de naufragar, però que, malgrat tot, ha arribat a bon terme. Això no hauria estat possible sense familiars i amics, companys tots de travessa, que m'han recolzat des del primer moment i pels quals no trobo prou paraules per agrair-los tot el seu suport. Aquestes línies són per a tots ells...GRÀCIES

Rosina, per enrolar-me al LEBVA, permetre'm submergir-me en el món de virus, musclos i conèixer diferents formes de treball, aquí i a fora.

Joan, no només per les "batalletes" de l'hora del cafè, sinó pel suport en aquells moments tan difícils. Gràcies de tot cor.

Als altres sèniors del grup: Francisco, per una visió sempre interessant de la ciència i de la vida; Anicet, veí de passadís i proveïdor de caramels; Rosa, amb un somriure i una paraula amable sempre a punt.

To the people from CEFAS: Kathy, David and Rachel, for the typical Scottish and English songs and all the help provided.

To Machi and Apostolos, shellfish-opening partners but also good friends.

To Annika, Yvonne, Ankie, Mikel, Maria, and all the stuff at the Umeå University Hospital for being so nice with me and make me feel so good in that cold November. And for teaching me to play PLUMP!!! Thanks Elisabeth, for "adopting" me, for our chats and diners.

Lola, Cristina i Màxim; tot i que els temporals al Delta i l'anada i vinguda de mostres van estar a punt de tornar-me boja, ha estat genial treballar amb vosaltres. Gràcies per fer-ho tot més fàcil.

Al Dr. Miquel Calvo, responsable de les anàlisis estadístiques desenvolupades en aquesta tesi, per ajudar-me a entendre conceptes bioestadístics com multicolinearitat, regressió logística i altres.

Al Gonzalo i la Rosa, amb els què he passat moltes hores i sense els quals res d'això no hagués estat possible. Dir que m'han ajudat no seria just, aquesta tesi és també mèrit seu i no només pels resultats de fags i Norwalk cedits pel Gonzalo i l'inestimable suport de la Rosa, sinó perquè entre tots tres ho hem fet possible. Aquesta tesi ha estat un treball d'equip i vosaltres n'heu estat protagonistes indiscutibles.

Als actuals companys de la tripulació del 13: Sílvia, sempre disposada a donar un cop de mà i amb una visió sempre conciliadora de les coses; i Pili, companya dels inicis i re-descobridora de les Amèriques. I no penseu que m'oblido dels tres caballeros: nuestro hombre en La Habana, Palki, amb una visió diferent de la vida; Carles, el nostre lonely traveller, i l'home de les performances, Néstor. Tots tres heu fet que els darrers dos anys siguin més divertits i agradables. I gràcies a tots per obrir musclos, rossellones i el què fes falta!

Als altres integrants del 13 que han anat desembarcant en diferents ports: Idoia, pionera en el món dels musclos; i Sònia, amb qui he compartit neures, penes i alegries, gracias por dejarme conocerte.

A les veïnes i veí del costat: Olga, feliç ara per les muntanyes de Prades, i amiga sempre, per escoltar-me, consolar-me i deixar-me bocabadada amb les diapos de les seves aventures. Marta, per les nostres llargues xerrades sobre la vida, la ciència i el futur. Jaume, l'últim poblador que s'ha instal·lat per aquestes contrades.

No m'oblido dels infatigables currants del fons del passadís: Maite, Maria, Ceci, Luis, Ina, Rocío i Natalia. Gràcies per vitrines, termocicladors, pincells i transport de seqüències. Gracias Sandra, por marcar la diferencia.

I arribem a la taula cafetera i a les seves integrants, amb les què he compartit llargues converses sobre tots els temes; Maite, sempre disposada a donar un cop de mà; Susana C. i Laura, pels innumerables consells sobre cultiu cel·lular; Cristina, l'últim reducte fumador; Ruth, sempre ocurrent, i Susana M., per múltiples consells i xerrades. AnaE, por no preguntar y sí comprender.

Als integrants de la Sibèria, que és de tot menys freda, Michel, Ana, Eli, Xavi B. (realment tot un personatge), Cris (quantas vitrines compartides!) i Andrey (tot un caballer i massatgista). Als que ja no formen part d'aquesta tripulació, Xavi V., sempre políticament correcte i Yolanda, una gran ballarina i amiga, però sobretot, gran persona i, finalment, al seu company de travessa i 50% de la societat, Jorge.

Al camarot més petit i laboratori d'adopció: Núria, gràcies per escoltar, comprendre i acceptar-me tal com sóc. Per ser companya i amiga, per ser com ets, franca i sincera. Darrera d'aquesta petita gran dona hi ha un realment gran home: especial menció al Xavi i al seu toc especial fent vinagretes! A la Núria C., que des dels meus inicis com a grumet m'ha donat bons consells i que ara està embarcada en una nova aventura. A l'Eli, un terrabastall allà on va, i a les noves adquisicions: Sara i Vero.

Javi M., ahora unos pisos más abajo, por echarme una mano cada vez que lo he necesitado, por tus "¡Tranquila, mujer!" y "Buenos días, guapa".

Rosario, por tu ayuda con pedidos, autoclaves y reactivos. Por largas conversaciones y mucho más.

Montse, la que més ha sofert amb els meus musclos, ostres i altres animalons, per no perdre el somriure.

A tota la gent de l'edifici nou: Marc, Jordi S., Jorge, Quim, Marta, Oscar, Cristian, Toni, Xavi A., Santi, Glòria, Cristina, Susana G., Nacho, i en especial a la Núria P., Marga, Blanca i Zaira: grans companyes malgrat la distància.

Com oblidar-me d'un dels laboratoris on he passat més temps! Juani, compañera de aventuras aquí y en Uruguay, arrastradora al gimnasio, gran amiga y ya también en la recta final de esta etapa. Y vamos a por los niños: Víctor (ay! el pollo rico), Miquel (per les moltes belles flors llançades), Jordi (motor diésel última generació), Paps (camacó!), i pel gran cap: Rafa, espero enviar-te moltes més postalletes en futurs 14N. Fora conyes: gràcies pels consells, n'hi haurien d'haver molts més com tu.

Per ser justa, ara hauria d'escriure un mínim de tres llibres per agrair a tota la colla de la carrera els molts anys que porten aguantar-me i els molts que han de venir. Sempre heu estat al meu costat, moments bons i no tan bons: Ana, qui ho diria el dia que ens vam conèixer! Carmen, simplemente la mejor; Maite, per contagiar-me la teva energia i empenta malgrat tot. Àngels, gràcies per acollir-me tantes vegades a Arsèguel i fer-me sentir com a casa.

Gràcies Laura, companya de viatges, de tardes de cinema i de tràfic de llibres. Encantada d'haver-te conegut.

A la gent del CAP, per fer més suportables els dissabtes al matí.

A l'Antònia, que tantes vegades em va fer de cangur i va suportar estoicament que li anés llegint tot el que trobava pel camí.

A les persones més importants de la meva vida, la meva família: la meva mare, Júlia, per inculcar-me

les ganes d'aprendre coses noves cada dia i ser el meu suport sempre; els meus avis, Joana i Jaume, sempre al meu costat; els meus germans Gemma, Jaume i Joan; al meu cunyat i cunyades, en David, Jenny i Laura. Als meus tiets: Conchi, Antonio, Juani i Toni; als meus cosins: Chus, Susana, David i Toni.

A totes aquells que ja no hi són.

ÍNDEX	i
Llistat d'abreviacions utilitzades	i
INTRODUCCIÓ	1
1. Origen i distribució dels virus en l'ambient	1
2. Virus humans presents en l'ambient	5
2.1. Adenovirus	5
2.2. Picornavirus	5
2.2.1. Parechovirus	7
2.2.2. Enterovirus	8
2.2.3. Virus de l'hepatitis A	8
2.3. Calicivirus	9
2.4. Virus de l'hepatitis E	10
2.5. Poliomavirus	11
3. Els mol·luscs bivalves com a agents transmissors de malalties infeccioses	13
4. Control de la qualitat microbiològica dels mol·luscs bivalves	15
4.1. Legislació actual	15
4.1.1. Classificació de les zones de producció	15
4.1.2. Normativa per a la comercialització dels mol·luscs bivalves	15
4.1.3. Comparació de les normatives europea i americana	16
4.2. Processament dels mol·luscs bivalves per a eliminar la contaminació fecal	16
4.2.1. Cocció	16
4.2.2. Tractament per alta pressió hidrostàtica	17
4.2.3. Depuració i reinstal·lació	17
4.3. Microorganismes model	18
4.3.1. Colifags somàtics	19
4.3.2. Fags F-específics d'ARN	19
4.3.3. Fags de <i>Bacteroides fragilis</i>	19
4.3.4. Enterovirus infecciosos	21
4.3.5. Adenovirus humans	21
5. Mètodes de detecció de la contaminació per virus humans en mol·luscs bivalves	23
5.1. Aïllament en cultiu cel·lular	23
5.2. Microscòpia electrònica	23
5.3. Tècniques immunoenzimàtiques	23
5.4. Reacció en cadena de la polimerasa	25
5.4.1. PCR multiplex	25

5.4.2. Detecció en temps real	25
OBJECTIUS GENERALS	31
<hr/>	
RESULTATS	35
<hr/>	
CAPÍTOL I. Estudi de la contaminació viral humana en mol·luscs bivalves procedents de diferents zones d'Europa	
• Resum	37
• <i>Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom</i>	39
• Annexes	49
– Annex I. Localització de les zones de mostreig	49
– Annex II. Iniciadors utilitzats	53
– Annex III. Desenvolupament de la metodologia aplicada en l'estudi	55
CAPÍTOL II. Avaluació de possibles indicadors de contaminació vírica en bivalves de diferents àrees geogràfiques	
• Resum	61
• <i>Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish with applicability to diverse geographical areas</i>	63
• Annexes	71
– Annex I. Control de la qualitat de l'anàlisi dels bacteriòfags F-específics d'ARN, colifags somàtics i fags de <i>Bacteroides fragilis</i>	71
– Annex II. Control de qualitat de l'anàlisi d' <i>Escherichia coli</i> per una tècnica del número més probable de 5 tubs i 3 dilucions	83
CAPÍTOL III. Desenvolupament d'una PCR multiplex per a la detecció d'adenovirus, enterovirus i virus de l'hepatitis A en mol·luscs bivalves i aigua residual	
• Resum	87
• <i>Nested Multiplex PCR assay for the detection of human enteric viruses in shellfish and sewage</i>	89
• Annexes	97
– Annex I. Desenvolupament i optimització de sistemes de PCR multiplex	97
CAPÍTOL IV. Avaluació de la classificació de zones de producció de marisc al delta de l'Ebre	
• Resum	101
• <i>Relation between current classification of shellfish-growing areas and viral pollution in bivalve molluscan shellfish</i>	103
• Annexes	113
– Annex I. Descripció de les àrees de mostreig analitzades	113

DISCUSSIÓ	119
<hr/>	
CONCLUSIONS	125
<hr/>	
BIBLIOGRAFIA	129
<hr/>	
ANNEXES	137
<hr/>	
ANNEX I. Xarxes neurals artificials (<i>Artificial Neural Networks, ANN</i>)	139
ANNEX II. Altres publicacions i comunicacions relacionades amb aquesta tesi	140

LLISTAT D'ABREVIACIONS UTILITZADES

Ad: adenovirus
AdH: adenovirus humans
ADN: àcid deoxiribonucleic
ARN: àcid ribonucleic
BSA: albúmina sèrica bovina
CF: coliformes fecals
Da: dalton
D-MEM: medi essencial mínim de Dulbecco
DMSO: dimetil sulfòxid
dNTPS: deoxinucleòtids trifosfat
DTT: ditiotreitòl
EV: enterovirus
F-ARN: fags F-específics d'ARN
FCV: calicivirus felins
FDA: Food and Drug Administration
HPeV: parechovirus humans
ICTV: International Committee for the Taxonomy of Viruses
Log: logaritme
kb: kilobase
NMP: número més probable
NV: norovirus (virus tipus Norwalk); en els articles apareix amb l'anterior nomenclatura, NLV, Norwalk-like viruses
OMS: Organització Mundial de la Salut
ORF: pauta oberta de lectura
pb: parell de bases
PCR: reacció en cadena de la polimerasa
pH: $-\log_{10}$ de la concentració d'hidrogenions
p/v: relació pes/volum
rpm: revolucions per minut
RT-PCR: retrotranscripció
RV: rotavirus
SV: sapovirus (virus tipus Sapporo)
UFC: unitats formadores de colònies
UFP: unitats formadores de clapes
VHA: virus de l'hepatitis A
VHE: virus de l'hepatitis E
× g: força centrífuga relativa

En aquest llistat no s'inclouen unitats de mesura, ni altres abreviacions de termes científics utilitzats de forma convencional en publicacions internacionals.