DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Rosa M. Pintó
Grup Virus Entèrics, Departament Microbiologia, Universitat de Barcelona
Av. Diagonal, 645; 08028 Barcelona
E-mail: rpinto@ub.edu
Tel: (+34) 934034621. Fax: (+34) 934034629

INTRODUCCIÓN

Antes que nada es necesario precisar la amplitud del término virus en el marco de la detección de virus en alimentos. A que virus nos referimos? Pues a aquellos virus que se transmiten por ingestión y que por lo tanto se pueden adquirir mediante el consumo de alimentos contaminados. A este tipo de virus se les denomina técnicamente virus de transmisión fecal-oral, es decir virus que se adquieren por ingestión y se excretan en las heces, o virus entéricos, es decir virus que replican en el aparato digestivo. Existen más de un centenar de virus distintos que pueden encontrarse como contaminantes alimentarios como pueden ser Enterovirus, Aichivirus, Hepatovirus, Hepevirus, Norovirus, Sapovirus, Rotavirus, Astrovirus y Adenovirus entre otros. Sin embargo, la gran mayoría de brotes de gastroenteritis y hepatitis víricas de transmisión alimentaria se han asociado a Norovirus (NoV) y Hepatovirus, comúnmente llamado virus de la hepatitis A (HAV) (Tabla 1), con lo cual se han convertido en las principales dianas de la virología de alimentos.

Las infecciones por NoV son muy comunes (Lopman et al 2003; Mead et al 1999) y van a más debido a la constante emergencia de nuevas cepas asociada a la replicación en dinámica de quasiespecies de los virus RNA. La situación con el HAV es bastante distinta puesto que a pesar de replicar en quasiespecies (Sánchez et al 2003a) posee fuertes restricciones estructurales en su cápside (Sánchez et al 2003b) que impiden la emergencia de nuevos serotipos (Aragonès et al 2008) con lo cual la vacuna existente es de amplia protección. Sin embargo, dicha vacuna es muy cara y de uso restringido en países del Tercer Mundo dónde por otra parte es muy necesaria debido a la deficiente situación higiénico-sanitaria. Además no hay que olvidar que mientras una gastroenteritis por Norovirus cursa durante 48-72 horas, una hepatitis A cursa durante un mínimo de 3-4 semanas.

En la actual situación de comercio global las infecciones víricas entéricas transmitidas por alimentos están cobrando mucha importancia (Tabla 1), lo cual hace necesario establecer un cierto control sobre la calidad vírica de los alimentos. Entre los alimentos más susceptibles de estar contaminados en origen y responsables de grandes brotes cabe destacar en primer lugar el marisco por su capacidad filtradora y concentradora de los potenciales virus que puedan haber en el entorno marino y por otro las verduras y frutos tipo baya regados con aguas contaminadas. Sin embargo el control de la calidad vírica de este tipo de alimentos se hace muy difícil debido a tres motivos: primero las dificultades técnicas de la detección de virus, segundo el gran volumen de producto que puede llegar a la unidad de toneladas y tercero el bajo precio de muchos de estos productos que no permite la gravación económica del valor añadido de la seguridad viral. Llegados a este punto vayamos a tratar como manejar la situación.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

En el diagnóstico clínico de virus son muy comunes las pruebas serológicas de detección de anticuerpos específicos contra los virus a identificar. Sin embargo las pruebas serológicas no tienen sentido en la detección de virus en alimentos puesto que en este caso es el antígeno el objeto de interés. Alternativamente se pueden también usar técnicas de detección de virus que se basan en el aislamiento del virus en cultivo celular o su detección por técnicas inmunológicas. Sin embargo estas técnicas son difícilmente aplicables al mundo alimentario, por un lado porque los virus diana (HAV y NoV) no replican de forma rutinaria en cultivo celular y por otro porque las técnicas inmunológicas

no ofrecen la sensibilidad necesaria para detectar las bajas cargas víricas de los alimentos contaminados. En cuanto a la replicación en cultivo celular sólo destacar que muy recientemente se han hecho avances en cuanto a la posibilidad de replicar cepas salvajes del HAV (Konduru & Kaplan 2006) y de NoV (Straub et al 2007) en sistemas celulares, pero que todavía es muy prematuro para afirmar que los sistemas de cultivo propuestos sean aplicables a la detección rutinaria de dichos virus.

Todo ello deriva en la necesidad de recurrir a sistemas moleculares de detección y amplificación de ácidos nucleicos víricos y concretamente en el caso del HAV y NoV, que como se ha dicho son virus de genoma RNA, a la técnica de la RT-PCR.

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Aunque se han descrito otras alternativas como el NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) (Jean et al 2001; Jean et al 2004) para la detección de virus RNA, la RT-PCR (Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction) sigue siendo la técnica más utilizada. Una modificación de ésta, la RT-PCR a tiempo real (Real Time RT-PCR), hace uso de la adición de marcadores fluorescentes y permite no sólo la amplificación y detección sino además la cuantificación del número de copias genómicas. La ventaja de la cuantificación hace de esta nueva técnica una herramienta de gran valor para determinar la seguridad vírica de los alimentos. Aunque existen diversas químicas para la incorporación de la fluorescencia la más usada por su reproducibilidad es la tecnología TaqMan que hace uso de una sonda marcada.

Para el desarrollo de una RT-PCR a tiempo real es muy importante 1) establecer un buen diseño de primers y sonda para obtener resultados fiables, robustos y de amplio espectro, 2) optimizar las condiciones del programa de amplificación para tener la máxima sensibilidad y 3) determinar la molécula más adecuada para la construcción de las curvas estándar de cuantificación para asegurar una titulación correcta (Pintó & Bosch 2008).

El primer aspecto, el diseño de primers y sonda es de vital importancia, sobretodo en el mundo de los virus RNA, para garantizar la detección de todas las posibles variantes víricas por un lado y la robustez de la cuantificación de todas estas variantes. Para ello hay que llevar a cabo análisis de alineamiento de secuencias con todos los genomas existentes para un determinado virus, a fin de poder determinar las mejores regiones en cuanto a nivel de conservación de nucleótidos. Estas regiones altamente conservadas suelen coincidir con regiones altamente estructuradas del RNA, es decir aquellas regiones del RNA dónde la propia estructura secundaria tiene un papel funcional dando señales para la interacción con proteínas víricas y celulares involucradas en la replicación y expresión genómica. Concretamente en el caso del HAV, al tratarse de un picornavirus, posee un extremo 5'no codificante (5'NCR) en su RNA que se halla altamente estructurado y que contiene el sitio de entrada del ribosoma (Internal Ribosome Entry Site IRES). Esta región imprescindible para llevar a cabo la traducción cap-no dependiente es una excelente candidata para el diseño de primers y sonda. En el caso de NoV existe una región de solapamiento entre el ORF1 y ORF2 que también posee estructuras secundarias destinadas en este caso a señalizar dónde el ribosoma debe llevar a cabo un cambio de pauta de lectura mediante la vuelta atrás de dos nucleotidos.

El segundo aspecto hace referencia a la optimización de los pasos críticos de las reacciones moleculares de la RT-PCR a tiempo real, como adecuar temperatura y tiempo de la RT, temperatura y tiempo de la desnaturalización, temperatura y tiempo de la hibridación de primers y sonda y temperatura y tiempo de la extensión.

Finalmente es imprescindible determinar cuál es la mejor molécula para ser usada como patrón en la curva estándar de cuantificación. Existen tres posibilidades el propio genoma vírico, un ssRNA idéntico a la diana a detectar y un dsDNA idéntico al amplímero. La primera alternativa no es en la práctica adecuada puesto que exige trabajar con grandes cantidades de virus patógenos. Entre la segunda y la tercera los datos empíricos demuestran que mejor la segunda probablemente por

problemas de sobreestimación de la concentración de ssRNA después de llevar a cabo una transcripción *in vitro*.

Hechas estas consideraciones estamos ya a punto de cuantificar los virus diana en alimentos. Sin embargo, cuando los títulos de genomas víricos/g obtenidos por estas técnicas moleculares de cuantificación se relacionan con los datos reales de niveles de ataque asociados al consumo de estos alimentos, todas las previsiones de riesgo de infección fallan. Concretamente en un brote de hepatitis A asociado al consumo de marisco contaminado (Sánchez et al 2002) se determinaron dosis de 0.0025 virus infecciosos/g, después del proceso de cocción al que se sometió el marisco (100 copias genómicas/g antes del procesado), asociadas a niveles de ataque reales del 50%. Es decir suponiendo un consumo de 60 g de marisco, que contendrían tan sólo 0.15 virus infecciosos, la probabilidad de infección sería del 50%. Es evidente que debe de haber algún eslabón perdido.

ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

El eslabón perdido corresponde a la falta de medidas correctoras de aquellos pasos críticos del proceso. Ello se puede resolver mediante la adopción de medidas de control de calidad. Los puntos más críticos de todo el proceso de determinación del título de genomas víricos en un alimento son la extracción de virus y ácidos nucleicos y la reacción de RT-PCR, principalmente el paso de RT. Con el fin de controlar ambos pasos lo más idóneo es añadir concentraciones conocidas de virus y ssRNAs previamente a la ejecución de los citados procesos. Lo más difícil es escoger correctamente estos controles a añadir.

En cuanto al control de la extracción lo más idóneo es utilizar un virus animal, un bacteriófago o un armored RNA. Sin embargo, tanto los bacteriófagos como los armored RNA, que son cápsides del fago MS2 con un RNA diana en su interior, presentan el problema de poseer una cápside que a pesar de tener una estructura parecida a la de los virus entéricos químicamente es muy distinta y por lo tanto no modelizarían correctamente el comportamiento de éstos. Por lo tanto lo más aconsejable es usar virus estructural y químicamente similares como el picornavirus Mengo (Costafreda et al 2006) o los calicivirus murino y felino (Cannon et al 2006). Cualquiera de estos virus se puede cuantificar y añadir a concentraciones conocidas a la muestra a fin de determinar la eficiencia de los procesos de extracción de virus y ácidos nucleicos.

En cuanto a los controles de las reacciones de RT-PCR, lo ideal es disponer de moléculas de ssRNA amplificables con los mismos primers y de longitud similar. Lo más práctico es modificar los amplímeros mediante la introducción de nuevas dianas de restricción, su clonaje en un vector de transcripción y la obtención de los correspondientes tránscritos (ssRNA). Estas moléculas se cuantificarán y se añadirán a concentraciones conocidas para determinar la eficiencia de la RT-PCR.

Evidentemente no hay que olvidar que además el control de calidad exige siempre incorporar controles negativos de extracción, RT y PCR.

Aplicando este tipo de controles la cuantificación es mucho más aproximada a la realidad y adoptando estas correcciones se obtienen valores de estimación del riesgo de infección tras el consumo de alimentos contaminados mucho más acordes con el nivel de ataque real. En el ejemplo expuesto anteriormente los títulos corregidos del HAV en el marisco una vez cocinado serían de 2.5 virus infecciosos/g, y esta dosis presenta unos niveles de riesgo estimados del 41% mucho más cercanos a los reales que fueron del 50%.

RETOS ACTUALES EN LA DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

De todo lo dicho hay que concluir que en la actualidad se disponen de las herramientas para el control de la presencia/cuantificación de virus en alimentos. Sin embargo, todavía hay toda una serie de cuestiones que resolver: 1) Científicamente sigue estando por determinar el significado de una copia genomica, desde la perspectiva de la infectividad. 2) Desde una perspectiva de salud pública hay que decidir si se amplían los virus diana. 3) Estadísticamente sigue sin resolverse el tema del

muestreo significativo, así como todos los temas de incertidumbre de la cuantificación. 4) Legalmente se requiere establecer normas. 5) Económicamente hay que decidir cuando se analizan los alimentos, siempre o cuando existen indicios de contaminación, análisis prospectivo o retrospectivo. 6) Y finalmente hay que decidir quién lleva a cabo estos análisis los productores, los distribuidores o la administración.

Responder estas cuestiones es de vital importancia para la futura implementación del control de virus en alimentos y evidentemente requiere de más de una reflexión por parte de científicos, gestores e industriales.

BIBLIOGRAFIA

Aragones, LL., A. Bosch, and R.M. Pintó. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. (En Prensa)

Cannon, J. L., E. Papafragkou, G. W. Park, J. Osborne, L. A. Jaykus, and J. Vinje. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* **69**:2761–2765.

Costafreda, M. I., A. Bosch, and R. M. Pinto. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3846–3855.

Jean, J, Blais, B, Darveau, A, and, Fliss, and I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microb.* **67**:5593–5600.

Jean, J., D. H. D'Souza, and L. A. Jaykus. 2004. Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6603–6610.

Konduru, K., and G. Kaplan. 2006. Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture. *J. Virol.* **80**:1352–1360.

Lopman, B. A., M. H. Reacher, Y. van Duijnhoven, F. X. Hanon, D. Brown, and M. Koopmans. 2003. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:90–96.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:607–625.

Pintó, R.M., and A. Bosch. 2008. Rethinking virus detection in food. In: Foodborne Viruses: Progress and Challenges. Koopmans, M., Bosch, A. and Cliver, D (Eds). ASM Press.

Sanchez, G., R. M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch. 2002. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4148–4155.

Sánchez, G., A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pintó. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. Virology **315**:34-42.

Sánchez, G., A. Bosch, and R. M. Pintó. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. J. Virol. 77:452-9.

Straub, T. M., K. Höner zu Bentrup, P. O. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A. Bartholomew, C. O. Valdez, C. J. Bruckner, C. P. Gerba, M. Abbaszadegan, and C. A. Nickerson. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:396–403.

Tabla 1. Ejemplos de brotes alimentarios asociados a NoV y HAV.

Virus	Año	Alimento	Casos	País	Orígen Alimento
NoV	1988	Frambuesas	108	Finlandia	Unknown
	1993	Ostras	190	US	Louisiana (US)
	1996	Ostras	75	US	Louisiana (US)
		Ostras	153	US	Louisiana (US)
	1997	Frambuesas	200	Canada	Unknown
HAV	1979	Mejillones	41	UK	Ireland
	1988	Almejas	300,000	China	China
		Lechugas	202	US	Kentucky (US)
	1997	Fresas	153	US	Mexico / US Processing
	1998	Cebollas tiernas	43	US	Mexico / California (US)
	1999	Almejas	184	Spain	Peru
	2002	Arándanos	39	New Zealand	New Zealand
	2003	Cebollas tiernas	600	US	Mexico
	2005	Ostras	39	US	Mississippi (US)

UNIVERSITAT DE BARCELONA

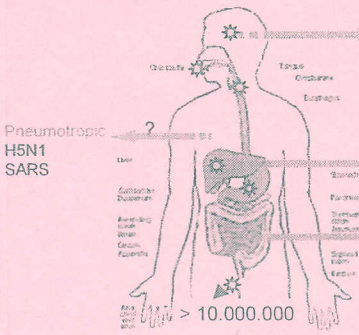
Virus Entèrics

Dep. Microbiologia

Detección de virus en alimentos: perspectivas y limitaciones

Rosa M. Pintó

Enteric Viruses



Neurotropic
Enterovirus
Poliovirus
Parechovirus
Nipah virus
TBE

Hepatotropic
Hepatitis A
Hepatitis E

Enterotropic
Norovirus
Sapovirus
Rotavirus
Astrovirus
Adenovirus
Aichivirus

Source: M. Koopmans, RIVM

	Estimated Total	Reported Cases			% Foodborne	Hospitalization	Case-fatality
Pathogen Agent	cases	In Single Town	Type	Of Illness	transmission	rate	rate
Bacterial							
[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

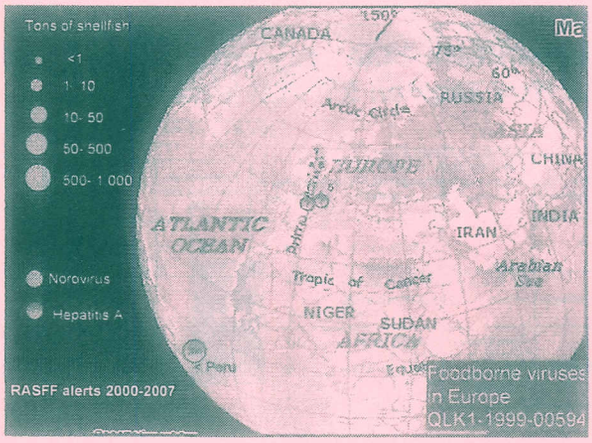
Hepatitis A

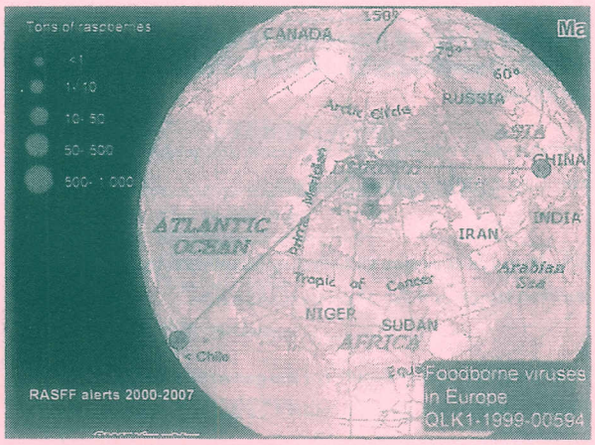
Table 1. Characteristics of selected bodborne hepatitis A outbreaks associated with shellfish.

Reference	Year	No. of infected persons	Implicated food	Location of cases	Source of implicated food	Suspected cause of contamination
[22]	1973	270	Oysters	Texas, Georgia	Louisiana	Untreated sewage from oil platforms in Mississippi Sound
[23]	[illegible]	122	Cockles	13 Europe, plus the United Kingdom	United Kingdom	Sewage discharged near shellfish beds
[24]	[illegible]	61	Oysters	Alabama, Georgia, Florida, Tennessee, Kansas	Florida	Mixed from unconverted outfall beds near sewage treatment plant
[25]	[illegible]	292,302	Raw oysters	Shanghai, China	Qi Dong County, China	Untreated sewage discharged near shellfish beds
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	322	Oysters	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Source: Fiore, CID 38:705, 2004

GLOBAL DISTRIBUTION OF HEPATITIS A VIRUS INFECTION





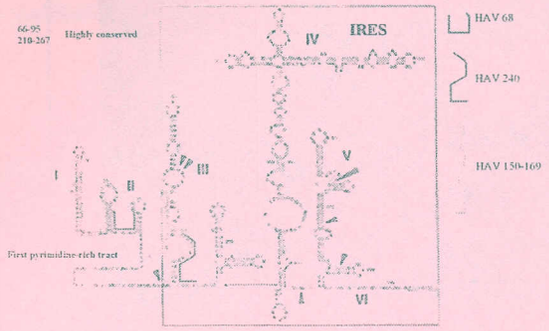
Viral infection via contaminated food depends on:

- Virus stability
- Degree of viral contamination
- Processing of food
- Likelihood of infection after ingestion of 1 or a few virus particles
- Susceptibility of the host

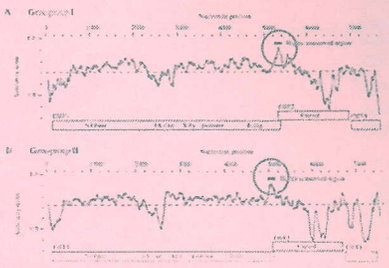
Design of a highly sensitive broadly reactive Real-Time RT-PCR for virus quantitation

- Selection of the best regions for primers and probe annealing: highly conserved and robust
- Technique optimization: PCR cycling adaptation to amplicon lenght and Tm of primers and probe
- Selection of the best molecule for the generation of the standard curve: viral genome, ssRNA or dsDNA amplicon

HAV68/HAV240/HAV150 RT-PCR



NoV variability



Design of a highly sensitive broadly reactive Real-Time RT-PCR for virus quantitation

- Selection of the best regions for primers and probe annealing: highly conserved and robust
- Technique optimization: PCR cycling adaptation to amplicon lenght and Tm of primers and probe
- Selection of the best molecule for the generation of the standard curve: viral genome, ssRNA or dsDNA amplicon

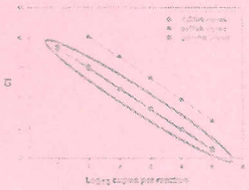
Temperature-time program for HAV and NoV TaqMan RT-PCR assays

Step description		Temperature and time	Number of cycles	Temperature transition rate (°C/s)	Acquisition mode
RT		55 °C for 1 h	1	2	None
Preheating		95 °C for 5 min	1	2	None
Amplification	Denaturation	95 °C for 15 s	45	2	None
	Anneling-extension	60 °C for 1 min		2	None
		65 °C for 1 min		2	Single

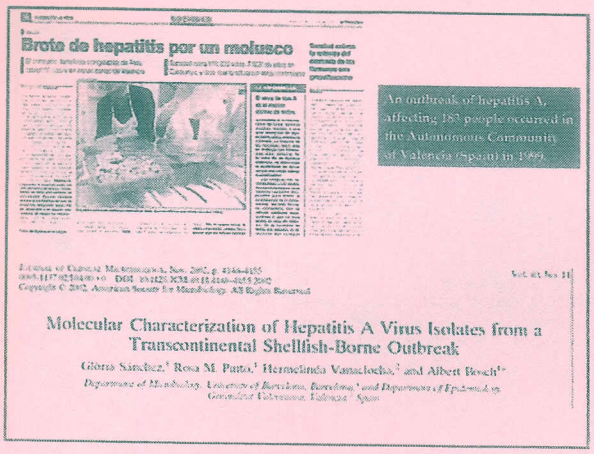
Design of a highly sensitive broadly reactive Real-Time RT-PCR for virus quantitation

- Selection of the best regions for primers and probe annealing: highly conserved and robust
- Technique optimization: PCR cycling adaptation to amplicon lenght and Tm of primers and probe
- Selection of the best molecule for the generation of the standard curve: viral genome, ssRNA or dsDNA amplicon

Standard curve: viral genome, ssRNA or dsDNA



Ct			
RNA copies	1179	164	23
	40	5.5	0.7
	35	4.4	0.5



HAV numbers in clams linked to the outbreak

Batch	Attack Rate[a]
20757	0.28
49254	0.14
53323	0.12
M-1054	0.54

[a]The attack rate was calculated for each batch with the number of cases and the number of consumers associated with the batch, assuming a single serving of 60 g of shellfish. Each batch consisted of 2 Kg (net weight).

HAV numbers in clams linked to the outbreak

Batch	Attack Rate observed[a]	Attack Rate estimated[b]
20757	0.28	
49254	0.14	
53323	0.12	
M-1054	0.54	

[a]The attack rate was calculated for each batch with the number of cases and the number of consumers associated with the batch, assuming a single serving of 60 g of shellfish. Each batch consisted of 2 Kg (net weight).

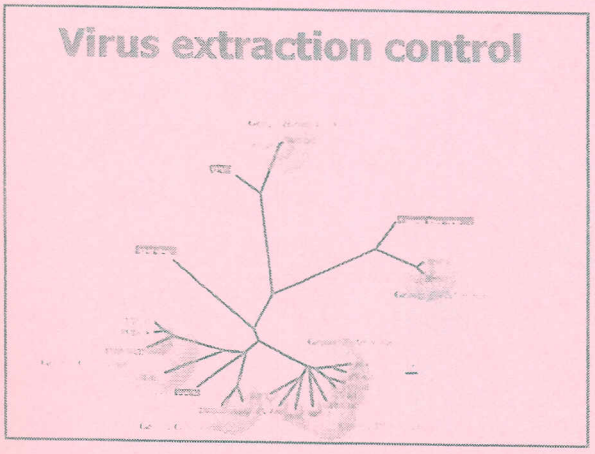
[b]Estimation based on reported dose-response models for different enteric virus (Rose & Sobsey, JFP 56:1043,1993) and determined for consumption of 60 grams of shellfish
For Echovirus 12, $P_i=1-(1+N/\beta)^{-\alpha}$
where $\alpha=0.374$ and $\beta=186.69$

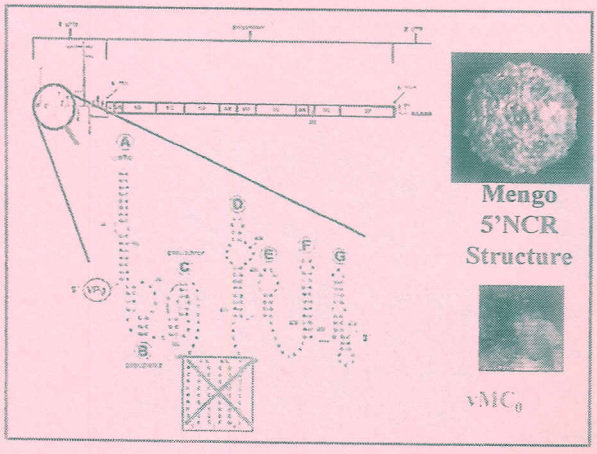
QA/QC: Standardization

Critical points

- Virus and nucleic acids extraction procedures
  - RNA animal virus
  - RNA bacterial virus
  - Armored RNA
  - Negative control
- RT-PCR reactions
  - ssRNA
  - dsDNA amplicon
  - Negative controls

Virus extraction control

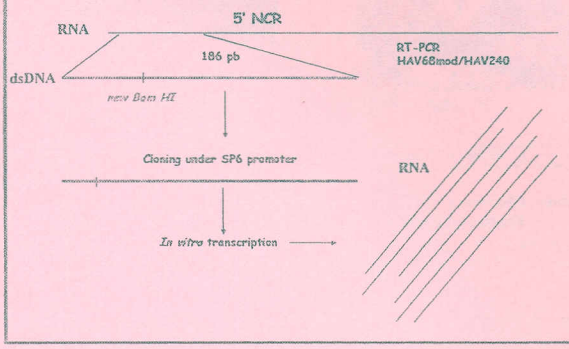




Mengovirus MC_0 as an extraction control

Sample	Spiked Mengo Virus	Recovered Mengo Virus	NA Extraction Efficiency (%)	Spiked HAV	Recovered HAV	NA Extraction Efficiency (%)
Serum	$8.6x10^6$	$1.3x10^5$	1.5	$2.0x10^6$	$1.1x10^5$	5.5
	$8.6x10^4$	$1.0x10^4$	11.6	$2.0x10^4$	$6.7x10^2$	3.3
Stool	$8.6x10^5$	$2.1x10^5$	23.8	$2.0x10^5$	$2.8x10^5$	14.0
	$8.6x10^4$	$3.0x10^4$	34.6	$2.0x10^4$	$1.4x10^3$	7.0
Shellfish	$1.0x10^5$	$1.6x10^3$	0.2	$2.0x10^5$	$4.0x10^3$	0.2
	$1.0x10^4$	$2.7x10^0$	0.3	$2.0x10^4$	$3.3x10^1$	0.2

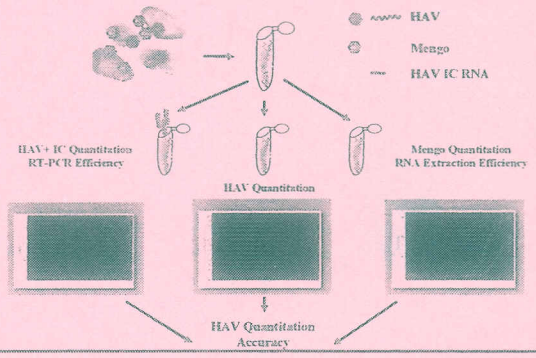
INTERNAL RNA STANDARD FOR THE HAV68/HAV240 REAL-TIME RT-PCR



ssRNA IC as an RT-PCR control

		RT-PCR	
	Spiked DNA	IC_{HAV} (copies/ml)	IC_{Mengo} (copies/ml)
Sera	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Stools	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Shellfish	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Standardization of the Real-Time RT-PCR (HAV68/HAV240)



HAV numbers in clams linked to the outbreak

Batch	Attack Rate[a]	Capture with IC	Detection strain in Shellfish	Associated virus in shellfish post cooking	
				Operational values	Extra-mild serving of values[b]
20757	0.28	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49254	0.14	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
53323	0.12	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
M-1054	0.54	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[a]The attack rate was calculated for each batch with the number of cases and the number of consumers associated with the batch, assuming a single serving of 60 g of shellfish. Each batch consisted of 2 Kg (net weight).

HAV numbers in clams linked to the outbreak

Batch	Attack Rate observed[a]	Attack Rate estimated[b]
20757	0.28	[illegible]
49254	0.14	[illegible]
53323	0.12	[illegible]
M-1054	0.54	[illegible]

[a]The attack rate was calculated for each batch with the number of cases and the number of consumers associated with the batch, assuming a single serving of 60 g of shellfish. Each batch consisted of 2 Kg (net weight).

[b]Estimation based on reported dose-response models for different enteric virus (Rose & Sobsey, JFP 56:1043,1993) and determined for consumption of 60 grams of shellfish.
For Echovirus 12, $P_i=1-(1+N/\beta)^{-\alpha}$
where α=0.374 and β=186.69.

European Committee for Standardization (CEN)
Framework for a horizontal method for detection of enteric viruses in food

- Horizontal method (all foodstuffs included)
- Viruses of primary focus:
  - Hepatitis A virus
  - Norovirus
- Matrices of primary focus:
  - Salad crops
  - Soft fruits
  - Bivalve shellfish
  - Bottled water (and processed water)
- Detection method of choice:
  - PCR (Real-Time)

CEN TAG4 draft document

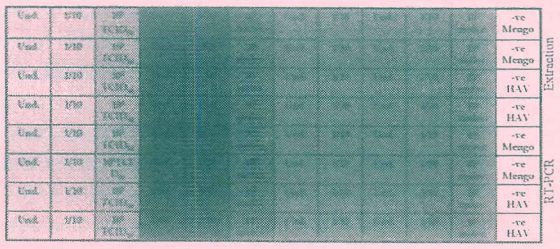
TaqMan reagents selected by the CEN TAG4 committee

- HAV (Costafreda et al., AEM 72: 3846, 2006)
  - HAV68 (FW): TCA CCG CCG TTT GCC TAG
  - HAV240 (REV): GGA GAG CCC TGG AAG AAA G
  - HAV150(-) (PROBE): CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA
    - Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' MGB (minor groove binder)
- NoV GI (Le Guyader et al., submitted for publication)
  - QNIF4 (FW): CGC TGG ATG CGN TTC CAT
  - NV1LCR (REV): CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC
  - NVGG1p (PROBE): TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT
    - Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)
- NoV GII (Loisy et al., JVM 123: 1, 2005)
  - QNIF2 (FW): ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA
  - COG2R (REV): TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
  - QNIFS (PROBE): AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG
    - Probe labelled 5' 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA)

Target food matrices

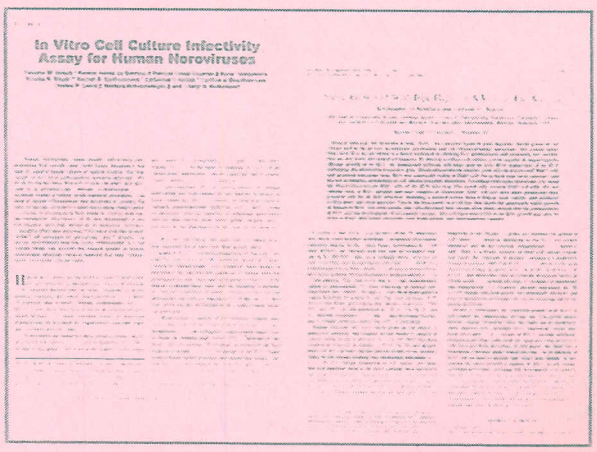
- Preharvest contamination
  - Shellfish
  - Produce (green onions, lettuce,…)
  - Soft fruits (raspberries, blueberries,…)
- Postharvest contamination
  - Food handlers
  - All type of foods

Temptative layout assay: 8 samples



Mengo | Mengo RNA standard | IC RNA | IC RNA standard | Target virus | Target virus dsDNA standard

40 €/sample only reagents (without man power or apparatus amortization)

Do new High-Tech methods mean increasing unanswered questions?

- Acceptable extraction efficiencies
  - Higher than 1%?
- Uncertainty of quantitative methods
  - Mean±SD of how many replicas?
- Meaning of genome copies in terms of infectivity
  - 60 : 1 (92:74 : 1:2 : 1-225 : 1) in HAV, in unaltered populations.
    What about inactivated particles in environmental or food samples??
  - What about NoV??