

Virus en Alimentos: Conociendo su prevalencia, detección y prevención de impactos.



**Instituto de
Salud Pública**
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

**Encargada de Laboratorio Biología Molecular
Sección Microbiología de Alimentos.
Viviana Cachicas
Bioquímico**

vcachica@ispch.cl

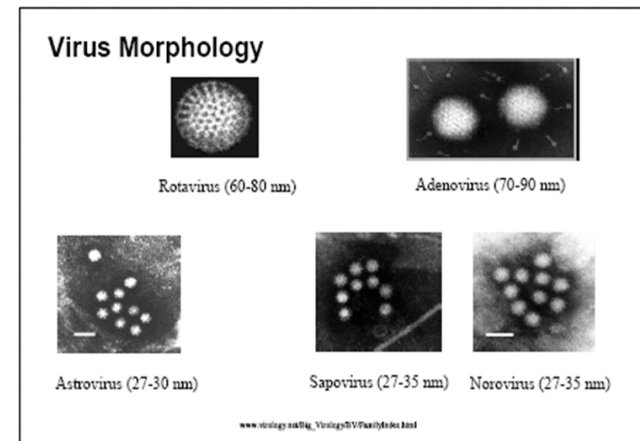
VIRUS EN LOS ALIMENTOS

Hepatitis A

Rotavirus

Familias virales

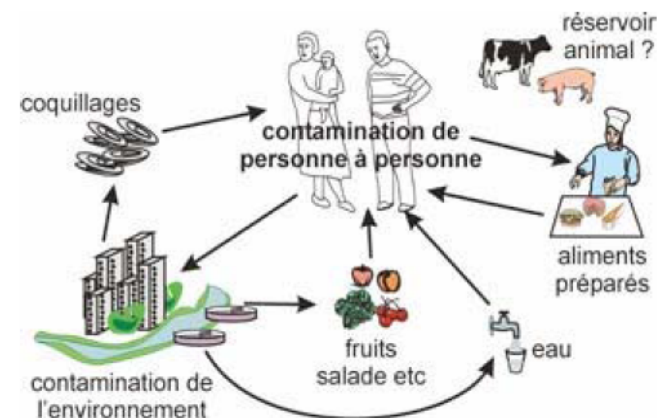
Familia viral	Ácido nucleico	Virus
Reoviridae	ARN	Rotavirus grupo A y otros
Adenoviridae	ADN	ADV 40, 41, 31 y serotipos 42-48
Caliciviridae	ARN	Norovirus: Virus Norwalk, Virus Sapporo y otros
Coronaviridae	ARN	Coronavirus Torovirus
Astroviridae	ARN	Astrovirus (8 erotipos)
Picobirnaviridae	ARN	Picobirnavirus
Picornaviridae	ARN	Virus Aichi



Limitaciones en la detección de Virus asociado a matrices alimentarias que afecta la salud pública

- Bajo nivel de contaminación
- ineficiencia en la extracción de los virus desde la matriz alimentaria
- imposibilidad de “enriquecer” un cultivo

Norovirus cycle



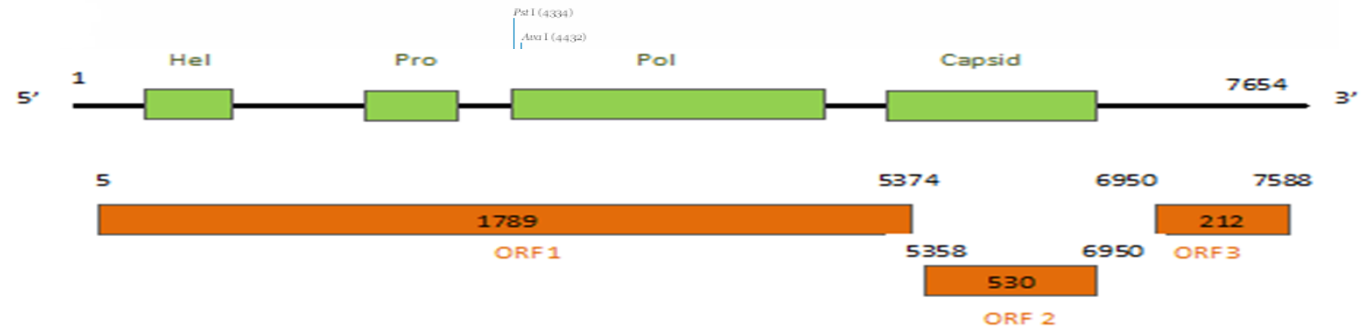
Antecedentes de Norovirus

- NoV Asociado a consumo de ostras crudas
- NoV Reconocido como la enfermedad del vómito
- NoV descubierto en heces por microscopia electrónico en ausencia de patógenos bacterianos (Kapikian 1972)
- NoV Asociado a brotes de numerosas matrices alimentarias: Jugos envasados, vegetales, mariscos y aguas.
- NoV Asociado a brotes masivos o cerrados como colegios y cruceros.
- NoV Considerada bajas dosis infectivas: 100 partículas virales
- NoV Excreción viral de semanas con 10^8 a 10^{10} partículas virales por gramo de material fecal.
- Meta-análisis 2015: Reducción de NoV en plantas de tratamiento de aguas servidas por Desinfección y por UV : 1487 registros de Japón, Francia, Suecia, Brasil, Irlanda, US y Canadá:
 - Concentración en efluente por modelamiento puede alcanzar valores altos mayores a 100 000 copias genoma por litro.

Antecedentes de NoV y Hepatitis A- Chile

- Brote de NoV en Nueva Zelandia 1996 atribuido a consumo de ostras chilenas (Bates, 1997; NZ risk profile)
- Rechazo de exportación de ostras chilenas a China (2007) por NoV con pérdida de capacidad de exportación de moluscos crudos.
- Dos brotes por NoV masivos en zona de restricción hídrica: Antofagasta 2010 y Ovalle 2013 (31.036 y 4615 casos)
- Vigilancia nacional clínica centinela y de brotes de NoV, Astrovirus, Adenovirus y Rotavirus:
 - NoV =1073 muestras 2010-2012: 87.8% GII (80.3% GII.4) y 10% GI (GI.4)
- Situación epidemiológica de Hepatitis A en Chile desde el 2004 : Baja endemia similar a países desarrollados con regiones de endemia mayor : Región de Arica y Parinacota y Tarapacá y Región del Bio Bio. Con 626 casos acumulados en el país 2009-2013.
- Brotes epidémicos por Hepatitis A en Región del Bio Bio año 2013 con 189 casos y año 2014 con 1007 casos.

Genotipos de Norovirus : Diferencias de secuencia Proteína de la Cápside: Genotipos Humanos= GI (Norwalk) , GII (Variantes New Orleans, Variantes Sydney)



5101	CGGGCCCAAT	CATTCAGATC	CATCAGAGAC	TCTAGTGCCA	CACACTCAA	GAAAAATACA	GTTGATTTC	CTTCTAGGGG	HindIII AAGCTTCACT	NcoI CCATGGTGAG
5201	AAATTTTACA	GAAAGATTTT	CAGCAAGGTC	ATACATGAAA	TCAAAGACTGG	TGGATTGGAA	ATGTATGTCC	CAGGATGGCA	GGCCATGTT	CGCTGGATGC
5301	GCTTCCATGA	CCTCGGATTG	TGGACAGGAG	ATCGCGATCT	TCTGCCCGAA	TTCGTAAATG	ATGATGGCGT	CTAAGGACGC	TACATCAAGC	GTGGATGGCG
5401	CTAGTGGCGC	TGGTCAGTTG	GTACCGGAGG	TTAATGCTTC	TGACCCTCTT	GCAATGGATC	CTGTAGCAGG	TTCTTCGACA	GCAGTCGCGA	CTGCTGGACA
5501	AGTTAATCCT	ATTGATCCCT	GGATAATTAA	TAATTTTGTG	CAAGCCCCC	AAGGTGAATT	TACTATTTC	CCAAATAATA	CCCCCGGTGA	TGTTTTGT
5601	GATTTGAGTT	TGGGTCCCCA	TCTTAATCCT	TTCTTGCTCC	ATCTATCACA	AACTGATAAT	GGTTGGGTTG	GTAAACATGAG	AGTCAGGATT	ATGCTAGCTG
5701	GTAATGCCTT	TACTGCGGGG	AAGATAATAG	TTTCTGCTAT	ACCCCTGGT	TTTGGTTCAC	ATAATCTTAC	TATAGCACAA	GCAACTCTCT	TTCCACATGT

G1

4801	AATACTCAGG	CAAATGTACT	GGACTAGGGG	CCCCAATCAT	GAAGACCCAT	CTGAAACAAT	GATTCACAC	TCCCAAGAC	CCATACAGTT	GATGTCCTTA
4901	CTGGGAGAGG	CCGCACCTCA	CGGCCAGCA	TTCTACAGCA	AAATCAGCAA	GTTAGTCATT	GCAGAGCTAA	AAGAAGGTGG	CATGGATTTT	TACGTGCCCA
5001	GGCAAGAGCC	AATGTTGAGA	TGGATGAGAT	TCTCAGATCT	GAGCACGTGG	GAGGGCGATC	GCAATCTGGC	TCCCAGTTTT	GTGAATGAAG	ATGGCGTCGA
5101	ATGACGCCAA	CCCATCTGAT	GGGTCCACAG	CCAACCTCGT	CCAGACGGTC	AACAATGAGG	TTATGGCTTT	GGAGCCCGTT	GTTGGTCCCG	CTATTGGCGG
5201	ACCTGTAGCG	GGCCAACAAA	ATGTAATTGA	CCCTGGATT	AGAAATAATT	TTGTACAAGC	CCCTGGTGGG	GAGTTTACAG	TGTCCCTAG	AAACGCTCCA
5301	GGTGAATATC	TATGGAGCGC	GCCCTTGGGC	CCTGATCTGA	ATCCCTACCT	TTCTCATTTA	GCCAGATGT	ACAATGGCTA	TGCAGGTGGC	TTTGAAGTGC
5401	AGGTAATCCT	TGCGGGGAAT	CGGTTACCGG	CGGGGAAAAT	CATATTTGCA	GCAGTCCAC	CAAATTTCCC	AACTGAAAGC	TTAAGCCCCA	GCCAGGTCAC

G2



Apoyo de Proyectos para desarrollo tecnológico

-Proyecto JICA -MINSAL- LAB SEREMIS e
ISP 2007-2008 de Inocuidad Alimentaria



-Proyecto FAO USP FDA PR 38361 Enfocado
en Evaluación de Riesgo Microbiológico de
Vibrios en el ambiente



-Proyecto CORFO 2010-09CN14-5951 U Los
Lagos-U Chile-ISP-FDA

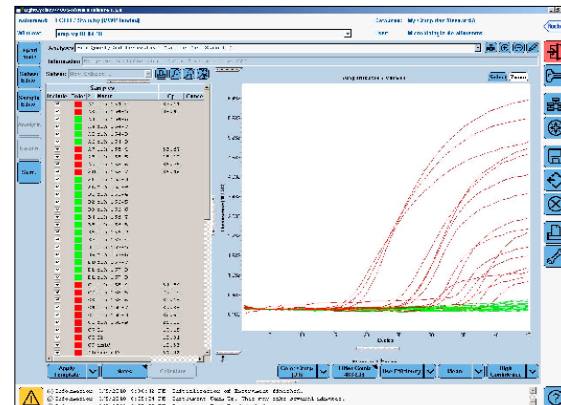
Para fortalecer la vigilancia molecular de Vibrios
y Norovirus en Salud pública .



-Proyecto INNOVA 133327 Bio Bio : Apoyo
analítico a estudios de tratamiento de aguas
servidas mediante humedales.

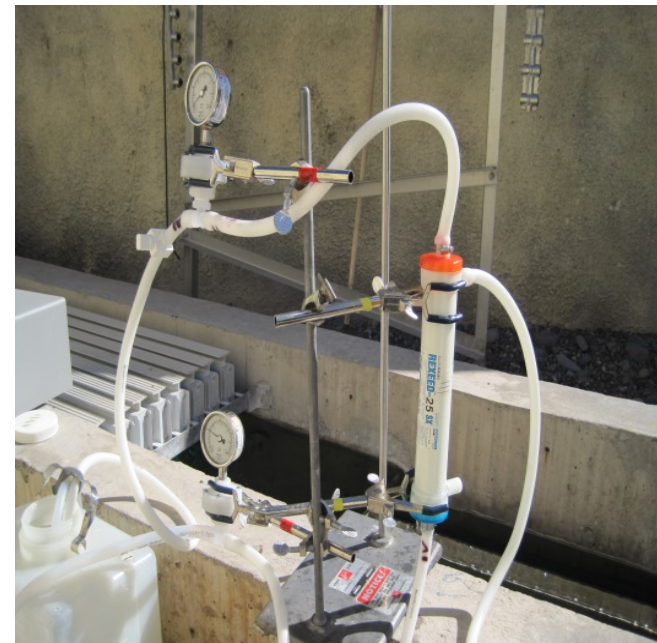
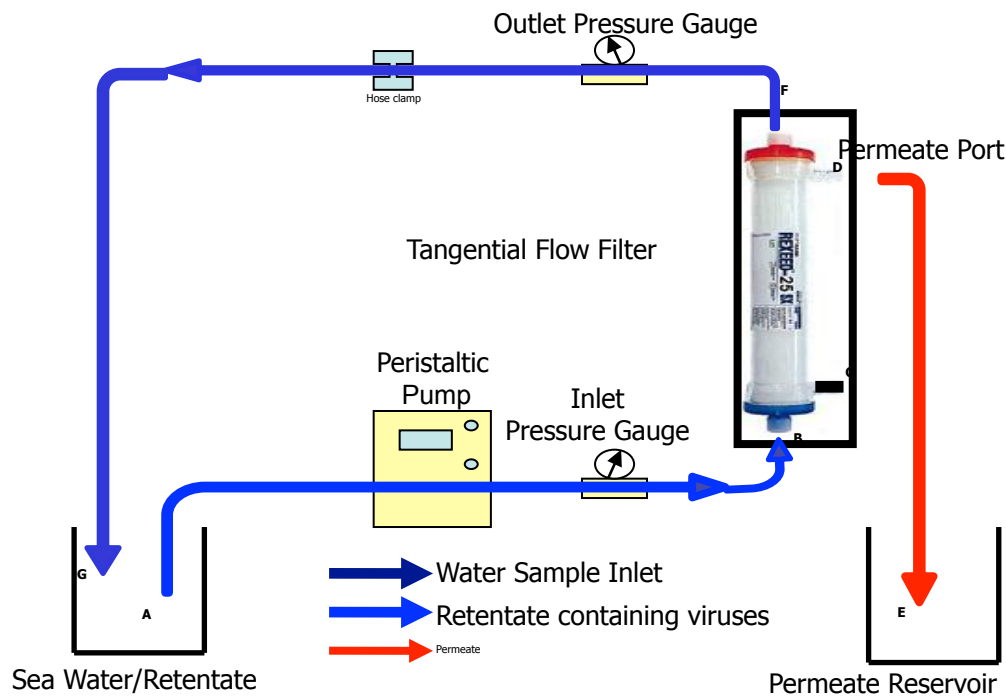
Metodología US FDA/CDC

1. Ultrafiltración Tangencial: Hasta 100 L de agua (Hill V et al CDC 2007 , FDA US y EPA:US)
2. 2. Ultraconcentración de partículas virales : Ultracentrifugación a 37 000 rpm (BAM FDA on line Chapter Hepatitis A 2014)
3. Extracción RNA: kit comerciales (Quantitect/Quantifast RT PCR kits Qiagen)
4. Control de Extracción: Norovirus Murino con Control interno US patent application 0060166232.
5. Detección & Cuantificación Molecular: Retro PCR en tiempo real One step triplex (G1, GII y CIA)



Método Ultrafiltración tangencial Smith & Hill 2009 CDC US y EPA US

Filtros de Hemodiálisis Asahi-Kasei Rexeed 25 S polysulfone 2,5 m² de área de filtro y tamaño de poro de ~30 kDa. Bloqueo con PEG.



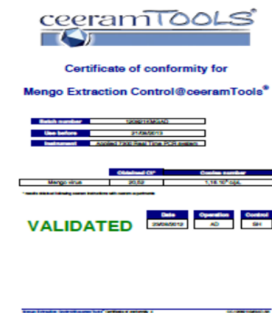
Porcentajes de recuperación de un 57 -94% a partir de 10.000 ufc para *E faecalis*, MS^{''}, esporas de *C perfringens* y oocitos de *Cryptosporidium parvum*.

Metodología UE

Norma ISO/TS 15216-1

Microbiology of foods and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR

1. Matrices : Aguas embotelladas (0,3-5L) , vegetales (25 g) , mariscos (2 g hepatopáncreas) y superficies (100 cm²)
2. Extracción Viral: Proteinasa K
3. Extracción RNA : Nuclisens Magnetic extraction reagents: Concentración con partículas magnéticas. Boom *et al* 1990. (BioMerieux NucliSens®)
4. Detección por retro PCR en tiempo real en formato monoplex con sondas FAM en one-step Protocolo CEN (European Committee for Standardization)
5. Controles
 1. Control proceso comercial: Virus Mengo: Rango 10 E 6 copias/ μ L (Ceeram Tools-BioMerieux).
 2. Control DNA doble hebra para cuantificación (Cefas).
 3. Control amplificación externa (ARN)



Ensayos de Aptitud
anuales NoV & HAV en
moluscos
LOD<10-100 genoma/rx
LOQ>100

www.cefas.org

Experiencia Brote de Gastroenteritis Ciudad Antofagasta 2010

- Inicio de Brote: 3 Marzo 2010 con diarrea, retorcijones, vómitos, fiebre y nauseas: Mas de 200 casos los tres primeros días.
- Inicialmente sin aislados bacterianos
- Investigación epidemiológica postuló origen de brote asociado a consumo de verduras y hortalizas regadas con agua insuficientemente desinfectadas.
- Muestreo de aguas : 26 y 27 Abril por Misión FDA
- Cinco de 10 muestras positivas a NoV (aguas domiciliaras, planta de abatimiento de As, planta desaladora, agua de mar y planta de tratamiento de aguas servidas)
- Gran Similitud en la secuenciación entre asilados de afluente y efluente de Planta de tratamiento de aguas servidas con aislados clínicos.

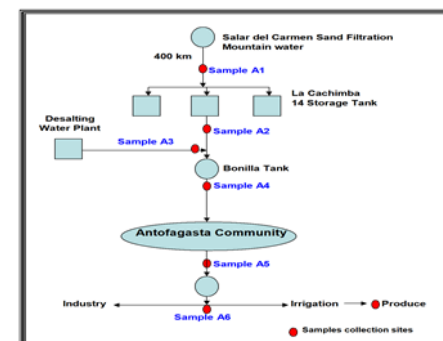
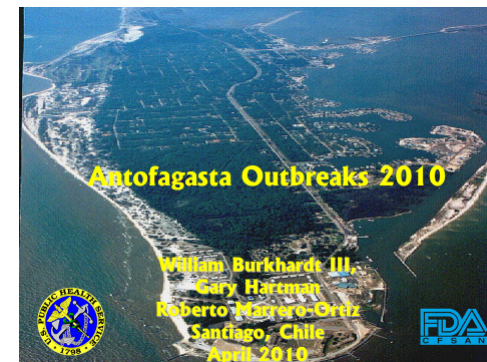
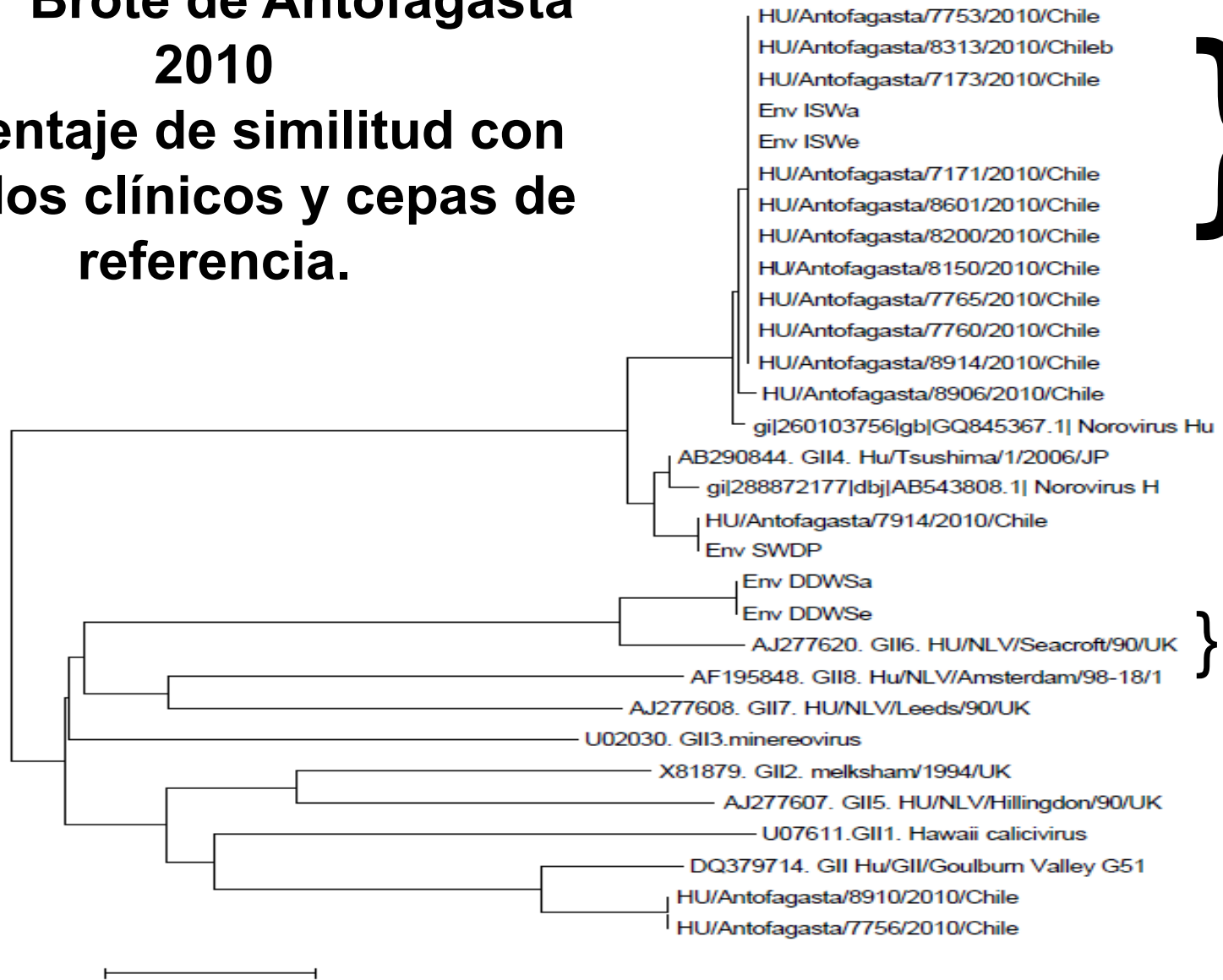


Figure 1. Antofagasta City Samples Collection Sites



Brote de Antofagasta 2010

Porcentaje de similitud con
aislados clínicos y cepas de
referencia.



Detection and Characterization of Norovirus in Drinking and Reclaimed Water Implicated in a Gastroenteritis Outbreak after the Chilean Earthquake

Cachicas, Viviana¹, Marrero-Ortiz, Roberto², Hartman, Gary², Marchant, Joey.G.², Jara, Mónica¹, Castillo, Leonor⁴, Araya, Alicia⁴, Cortés, Manuel⁴, Ferreira, Nicolás¹, Belmar, Diego¹, Farias, Leonardo¹, Herrera, Pasmé⁴, Mena, Javier⁴, Fuentes, David², Galeno, Hector⁴, Muñoz Lissette¹, Tognarelli, Javier¹, Fernandez, Jorge¹ and Burkhardt III, William².

¹Instituto de Salud Pública de Chile, ²U.S. Food and Drug Administration, Gulf Coast Seafood Laboratory, Dauphin Island, AL, ³U.S. Food and Drug Administration, San Francisco Laboratory Branch, Office of Regulatory Affairs, Alameda, CA, ⁴SEREMI, Antofagasta, ⁵SEREMI, Santiago de Chile.



Experiencia Brote Gastroenteritis: Ciudad de Ovalle 2013

- 4615 casos clínicos en 19 días en una población de 100 000 habitantes.
- Ausencia de patógenos bacterianos.
- Presencia de Genotipo II en 55 % y Genotipo I en 7 %
- Muestreo al día 4 del brote de aguas potables domiciliarias y de colegios, drenes y planta de tratamiento.
- Muestra positiva no secuenciable en pozo captación (afluente)
- Muestra positiva secuenciable en Canal de Riego el Manzanito
- Tamaño de muestra 20 L
- Metodología : Ultrafiltración tangencial, ultracentrifugación.

 Subdepartamento Genética Molecular	INFORME DE RESULTADO N° 583	
	N° 000.00.000 07.000.00.001	Rev. 4
ANTECEDENTES DE LAS MUESTRAS		
Estudio Solicitado : Genotipificación de Norovirus Solicitante : María Cristina Martínez Tipo de Muestra : Agua Procedencia : Sección Microbiología de Alimentos – Salud Ambiental Dirección : Avda. Mariposa 1900, Talca Anexo : 20230 País : 845 - 644 Fecha de ingreso : 08/09/2013 Fecha de informe : 12/09/2013		

RESULTADOS

Envío a laboratorio de análisis de la Genotipificación de Norovirus

Número Muestra	Origen de la muestra	Tipo de muestra	Prevalencia de la muestra	Resultado
M.6.2.13	AGUA COLEJO SAN VATOR	AGUA POTABLE	OVALLE	NO AMPLIFICA
M.6.3.13	POZO CAPTACIÓN PLANTA AGUA POTABLE LOS PEÑONES	AGUA POTABLE	OVALLE	NO AMPLIFICA
M.6.2.13	CANAL DE RIEGO EL MANZANITO	AGUA DE RIEGO	OVALLE	NO AMPLIFICA
M.6.2.13	CANAL DE RIEGO EL MANZANITO	AGUA DE RIEGO	OVALLE	DE LA VARIANTE SYDNEY 2012

Observaciones : Se identifica la cepa recombinante Sydney 2012.
 Método utilizado : Método RT-PCR de una región del gen que codifica la RNA polimerasa RNA dependiente (RpRd). Método repetido 2 veces. Secuenciado genético y análisis filogenético con secuencias base de datos GenBank, comparada con la cepa de referencia HUGLI_4/Sydney/NSWO514/2012 AU (JX459908).

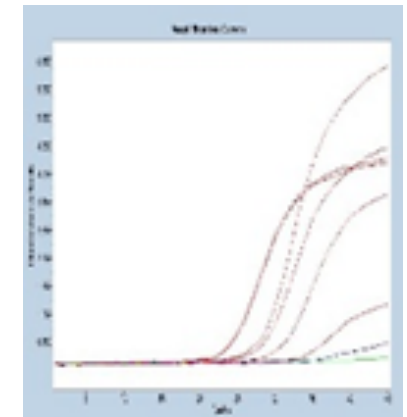
Saludo atentamente a usted,


 Raúl Salazar Parra R.
 Profesional Encargado Proceso de Diagnóstico

Dr. Jorge Fernández O.
 Jefe Subárea Genética Molecular
 Apoyador del resultado

Resultado N° 83 (09/2013)
 De: Genética molecular

Consultas, reclamos o sugerencias, favor dirigirse a genetica@genetica.uchile.cl, indicados en Asunto, lo que corresponde.




- Cepa recombinante Sydney 2012
 - Método RT PCR de región RpRd . Datos GenBank
 - Cepa referencia :
 - Hu/GII.4/Sydney/NSWO514/2012 AU
 - Código de acceso JX459908.

Aislamiento Virus Hepatitis A genotipo IA, GI y GII en planta de tratamiento de aguas servidas previo a desinfección

Proyecto INNOVA BIO BIO 13.3327

Muestra	Ct Promedio	Curva Estandar	Resultado	Copias genoma/20 litros de muestra
A	27.44	$Y = -3.7x + 37.99$ $r^2 = 0.98$	Presencia HAV genotipo IA	2.2×10^4
A	29.53	$Y = -5.88x + 52.77$ $r^2 = 0.99$	Presencia de GI	2.8×10^5
A	24.49	$Y = -6.89X + 55.45$ $r^2 = 0.98$	Presencia de GII	9.9×10^5
B	24.50	$Y = -3.7x + 37.99$ $r^2 = 0.98$	Presencia HAV IA	1.4×10^5
B	31.07	$Y = -5.88X + 52.77$ $r^2 = 0.99$	Presencia GI	1.5×10^5
B	25.67	$Y = -6.89X + 55.45$ $r^2 = 0.98$	Presencia GII	6.7×10^5

	INFORME DE RESULTADO N° 256
Subdesarrollo Genética Molecular	RD-03-IT-260-03-005 VERSIÓN: 4 (20-10-2014)
ANTECEDENTES DE LAS MUESTRAS	
Estudio Solicitado: Identificación de Hepatitis A	Solicitante: María Cristina Martínez
Tipo de Muestra: OWA	Sección: Sección Microbiología de Alimentos - Salud Ambiental
Precedencia: Análisis de Residuos 1500, Ruvico	Dirección: 252290
Anexo: 252	Fecha de ingreso: 09/04/2015
Folio: 252	Fecha de informe: 23/04/2015

RESULTADOS

Secuenciamento y análisis de una región del gen que codifica para la proteína VP1/2A de Hepatitis A.

Numero laboratorio SP	Origen de la muestra	Procedencia de la muestra	Resultado
4332 2014 71206	Planta Tratamiento Aguas Servidas	Microbiología Alimentos	GENOTIPO IA
4332 2014	Planta Tratamiento Aguas Servidas	Microbiología Alimentos	GENOTIPO IA

Método utilizado: 1. PCR de la región del gen VP1/2A. Secuenciamento genético y análisis bioinformático con secuencias de la base de datos GenBank.

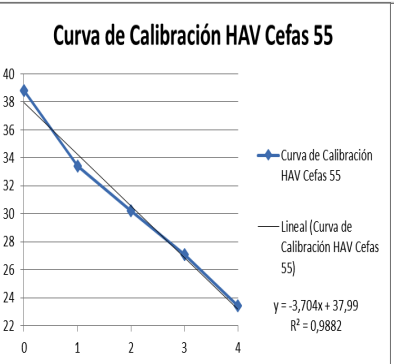
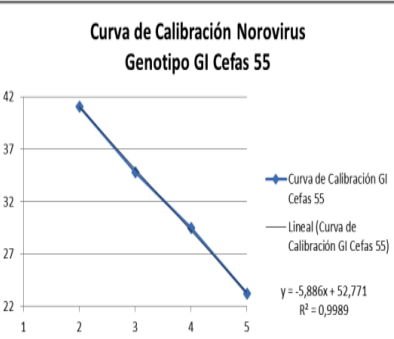
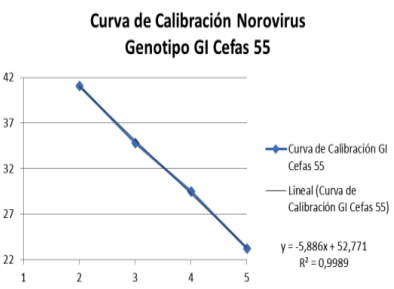
Saluda atentamente a usted.

 M. Berta Chávez V.
 Encargada de Calidad
 Revisión de resultado

 Dr. Jorge Fernández O.
 Jefe de Laboratorio Genética Molecular
 Aprobación de resultado


 Documento N° SP-03000910
 C. Genética Molecular

Comuníquese, reclame o sugiera, favor dirigirse a geneticamolecular@spbc.cl, indicando en Asunto, lo que corresponde.



Estudio Piloto 2015

- Presencia de NoV en mariscos desde Terminal Pesquero
- Frecuencia semanal de varias especies: Cholgas, Choro Maltón, Choritos.
- Metodología : ISO/TS 15216-1
 - desde 2 g de hepatopancreas de 10 especímenes por muestra.
- Resultados a la fecha en 100 muestras
 - ~10 % positivas en concentraciones menores a 100 copias genoma por gramo de molusco (<LOQ). No secuenciables.



Discusión

La detección , cuantificación y regulación de virus en alimentos ha sido lenta debido a las dificultades técnicas y económicas de las metodologías actualmente existentes.

Debido al avance tecnológico cada vez es mas frecuente aislar y caracterizar el agente infeccioso que nos puede causar la enfermedad y contrastarlo con los aislados clínicos para conocer su origen y prevenir nuevos brotes.

Sigue siendo fundamental “no descuidar el saneamiento ambiental, el acceso a agua potable, medidas de higiene personal y buen manejo y control de brotes”(Depto Epi Minsal).



**Instituto de
Salud Pública**
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

MUCHAS GRACIAS.



**Instituto de
Salud Pública**
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

Secretaria Sra Rosa Manriquez
Tec Sra Ximena Palma
Tec Sra Dafne Drobier
Tec Sra Mirtha Soto
Tec Sr Omar Morales
Tec Sra Pilar Orellana
Tec Sr Sergio Egaña
BQ Sr Esteban Paredes PhD
QL Sra Mónica Jara
BQ Sr Leonardo Farias
BQ Sra Viviana Cachicas
Jefa Sección BQ Sra Cristina Martinez