



# SEMINARIO ACHIPIA

CARGA MUNDIAL DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN  
ALIMENTARIA.

## VIRUS EN LOS ALIMENTOS : Hacia donde vamos?



BIOQUÍMICA VIVIANA CACHICAS

VCACHICA@ISPCH.CL

SECCION MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

SUBDEPTO ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

DEPARTAMENTO SALUD AMBIENTAL



## VIRUS & CHILE

**1996: Brote en New Zealand asociado epidemiológicamente a Ostras Chilenas (Bates, 1997; NZ risk profile)**

**Rechazo de exportación de ostras a China por NoV (2007)**

**Dos brotes masivos por NoV en ciudades con restricción hídrica : Antofagasta 2010 ( 31.036 casos) & Ovalle 2013 (4.615 casos)**

**Vigilancia clínica de NoV, Astrovirus, Adenovirus y Rotavirus:**

- NoV =1073 muestras 2010-2012: 87.8% GII (80.3% GII.4 ) y 10% G1 (G1.4)

**Hepatitis A : País con baja endemia similar a países desarrollados excepto Región del Bío Bío**

- Chile 2009-2013: 626 casos.
- Área endémica :
  - 2013 con 189 casos
  - 2014 con 1007 casos.
  - 2015 con 1500 casos .

Acción en la región 2015 : 57. 000 niños vacunados entre 18 meses y 6 años.

Acción en la región 2016 : Vacunación niños de 18 meses.

## Proyectos asociados a Microbiología de Alimentos ISP Chile.

2008-2009 Agencia Internacional de cooperación Japonesa JICA –MINSAL-  
Red de Laboratorios en Caracterización de peligros química y biológicos en alimentos

2008-2009 FAO USP FDA PR 38361 : Evaluación de Riesgo Microbiológico de Vibrios patogénicos en moluscos y ambiente.

2010-2013 CORFO 09CN14-5951: Universidad Los Lagos-U Chile-ISP-US:FDA  
Fortalecimiento de la red pública para la seguridad de moluscos a través de modelos de manejo de riesgo para *Vibrios* and Norovirus

2013-2015 :INNOVA BIO BIO N° 13.2227-IN.IIP Recuperación aguas rurales servidas con humedales.



# METODOLOGIA ESTUDIO DE BROTES CDC-FDA

1. Etapa de ultrafiltración tangencial :  
De 100 Litros a 100 mL  
(Hill et al 2007: CDC, EPA & FDA)

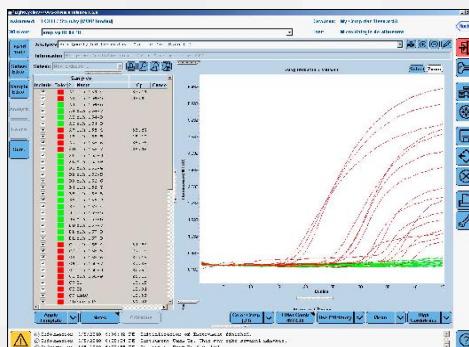


2. Concentración viral por ultraconcentración:  
(BAM FDA *on line* Chapter Hepatitis A 2004)



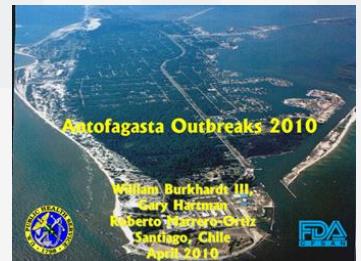
3. Extracción viral; Sistemas comerciales.

4. Detección y cuantificación por Retro PCR  
múltiple *one step*.



# BROTE DE GASTROENTERITIS DE ANTOFAGASTA

## Marzo a Abril 2010



31.036 casos clínicos entre Marzo 8 y Abril 28:

54 casos /1000 habitants en población de 575.268.

Presencia de NoV y enterobacterias

Brote asociado a vegetales irrigados con aguas tratadas desde Planta de Tratamiento.

Detección de niveles de cloro disminuidos (< 0.6%)

Muestras ambientales para Norovirus el 26 & 27 de Abril : aguas domésticas, aguas de mar, aguas desarsenadas , aguas desalinizadas , plantas de tratamiento de aguas servidas

Resultados:

5 /10 muestras positivas para GII de Norovirus

2 Muestras de afluente y efluente con similar secuencia nucleotídica de muestras clínicas asociadas a brote.

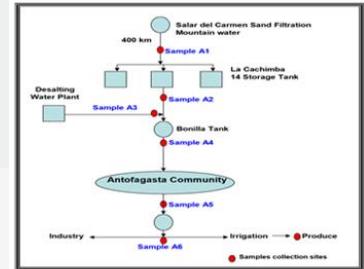
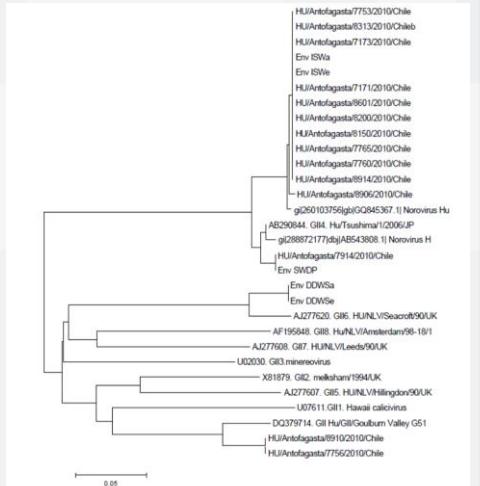


Figure 1. Antofagasta City Samples Collection Sites



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

Cachicas, Viviana<sup>1</sup>, Marrero-Ortiz, Roberto<sup>2</sup>, Hartman, Gary<sup>3</sup>, Marchant, Joey.G.<sup>2</sup>, Jara, Mónica<sup>1</sup>, Castillo, Leonor<sup>4</sup>, Araya, Alicia<sup>4</sup>, Cortés, Manuel<sup>4</sup>, Ferreira, Nicolás<sup>1</sup>, Belmar, Diego<sup>1</sup>, Farias, Leonardo<sup>1</sup>, Herrera, Pasme<sup>4</sup>, Mena, Javier<sup>4</sup>, Fuentes, David<sup>5</sup>, Galeno, Hector<sup>4</sup>, Muñoz Lissette<sup>1</sup>, Tognarelli, Javier<sup>1</sup>, Fernandez, Jorge<sup>1</sup> and Burkhardt III, William<sup>2</sup>.

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

## BROTE DE GASTROENTERITIS CIUDAD DE OVALLE SEPTIEMBRE 2013

4615 casos clínicos en 19 días en población de 100.000 habitantes .

Ausencia de patógenos bacterianos

Presencia de GII (55%) y GI (7%)

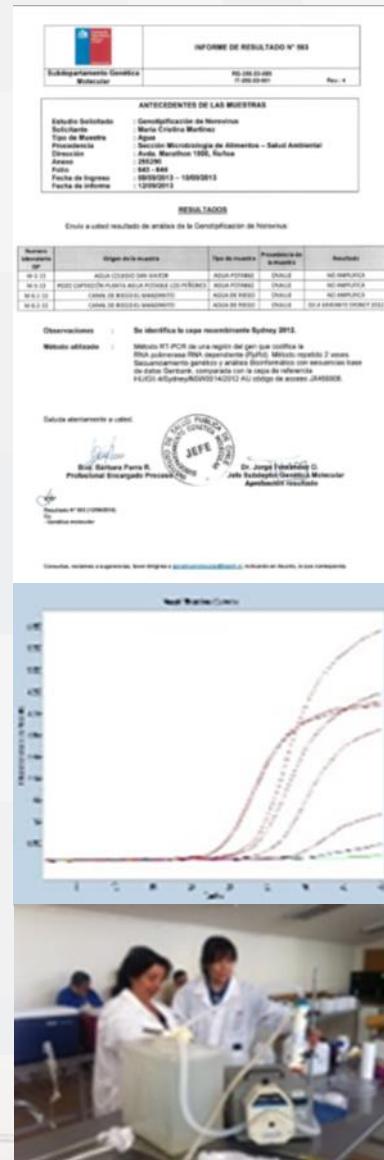
Muestreo ambiental en el dia N° 4 : Aguas potables (domicilios, escuelas, sistema de colección para agua potable, aguas de regadío)

Tamaño de muestras 20 Litros

Metodología US CDC & FDA de ultrafiltración tangencial y ultracentrifugación .

Muestra positiva no secuenciable en sistema colector de agua potable.

Muestras positivas secuenciadas en aguas de regadío: Recombinante Sydney 2012 sequencing RpRd (Reference strain Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/2012 AU)



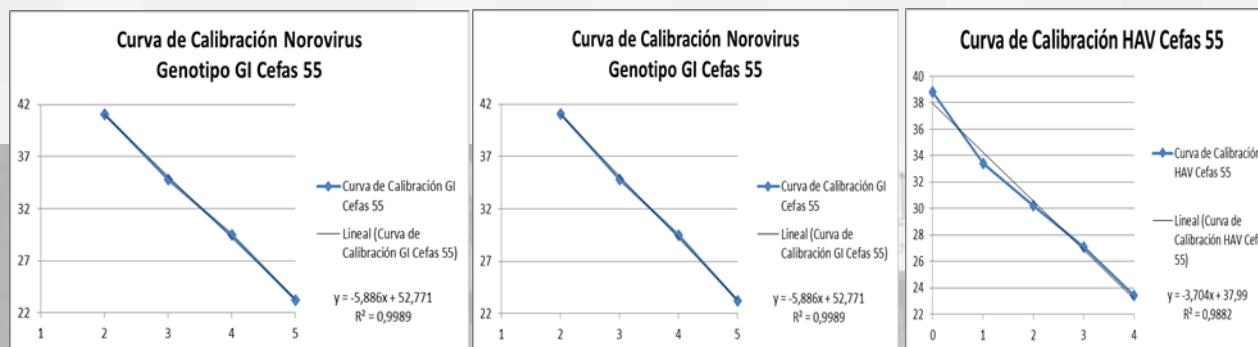
# ESTUDIO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HEPATITIS A EN AGUAS SERVIDAS

MUESTRAS DE AGUA SERVIDA DE PLANTA DE TRATAMIENTO ANTES DE LA DESINFECCIÓN  
PROYECTO INNOVA BIO BIO N° 13.2227-IN.IIP Dra Gladys Vidal.

SAMPLE	C t (n= 2)	Standard curve	Results	Genome copies /20 liters of sample
A	27.44	$Y = -3.7x + 37.99$ $r^2 = 0.98$	HAV genotype IA	$2.2 \times 10^4$
A	29.53	$Y = -5.88x + 52.77$ $r^2 = 0.99$	HAV Genotype IA	$2.8 \times 10^5$
A	24.49	$Y = -6.89x + 55.45$ $r^2 = 0.98$	GI	$9.9 \times 10^5$
B	24.50	$Y = -3.7x + 37.99$ $r^2 = 0.98$	GI	$1.4 \times 10^5$
B	31.07	$Y = -5.88x + 52.77$ $r^2 = 0.99$	GII	$1.5 \times 10^5$
B	25.67	$Y = -6.89x + 55.45$ $r^2 = 0.98$	GII	$6.7 \times 10^5$

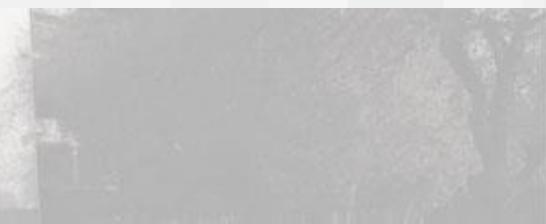
	INFORME DE RESULTADO N° 298		
National Institute of Health Molecular Biology	RD-45-17-298-45-005		
	06/09/2014 20-19-2014		
ANTECEDENTES DE LAS MUESTRAS			
Estudio Realizado:	Genotipificación de Hepatitis A		
Investigador:	Maria Cristina Martinez		
Tipo de Muestra:	HAVA		
Procedencia:	Instituciones Microbiología de Alimentos - Salud Ambiental		
Dirección:	Avenida Marathón 1060, Huasco		
Anexo:	056230		
Folio:	238		
Fecha de ingreso:	08/04/2015		
Fecha de informe:	29/04/2015		
RESULTADOS			
Secuenciación y análisis de una región de gen que codifica para la proteína VP1/G4 de Hepatitis A			
Número laboratorio RP:	Origen de la muestra:	Procedencia de la muestra:	Resultado:
0010-0004-11-00	Pieza Tissueario Hígado humano	Microbiología Alimentaria	DETALLADO
0010-0004-0	Pieza Tissueario Hígado humano	Microbiología Alimentaria	DETALLADO
Método utilizado:		PCR de la región del gen VP1/G4. Secuenciación poros y análisis Bioinformático con secuencias de la base de datos Genbank.	
Señala atentamente a usted,			
	Dr. Jorge Fernández O. Jefe Dibujante, Gabinete Molecular Revisoría de resultado		
	TM. Gladys Vidal V. Encargada de Calidad Revisora de resultado		
Graças, normas e exigências, favor dirigir a <a href="mailto:gladys.vidal@msa.gob.cl">gladys.vidal@msa.gob.cl</a> , voltando os resultados. Isso é obrigatório.			
Nota 1 de 1			

Resultados : Presencia  
Secuenciación : Genotipo II A  
Concentración : 10 E4 a 10 E 5 por litro



**METHODOLOGY 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 : Agua y mariscos.
2. Extracción de RNA : Sistema comercial de partículas magneticas : Boom *et al* 1990. (BioMerieux NucliSens®)
3. Retro Real Time PCR : fluoróforos FAM. Sistema one step. Protocolos CEN (European Committee for Standardization)
4. Controles:
  1. dd -cDNA of GI, GII and HAV of CEFAS.
  2. Control de Proceso Mengo Virus Ceeram Tools-BioMerieux
  3. Ensayo de aptitud centro de referencia europeo para moluscos , Cefas.



## ESTUDIO PILOTO 1

- Enero 2015 a Julio 2016.
- Detección de GI y GII en moluscos (almejas y mejillones) de mercado de distribución de Santiago of Chile
- Frecuencia semanal ó quincenal en pool de hepatopancreas con 10 especímenes.
- Metodología ISO/TS 15216-1
- Resultados en 170 muestras
  - ~10 % muestras positivas GII
  - < 100 copias del genoma/rx.

## ESTUDIO PILOTO 2

- Octubre 2015 a Mayo 2016
- Detección de HAV en región de alta endemia.
- Mariscos de tres zonas de banco naturales.
- Frecuencia quincenal con 54 muestras.
- Metodología ISO/TS 15216-1
- Resultados en 17 de 54 muestras: Negativas.





Food  
Standards  
Agency  
[food.gov.uk](http://food.gov.uk)

# FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON FOODBORNE VIRUSES FSA-EFSA

23-25 Febrero 2016  
The Royal Society Londres  
<https://www.food.gov.uk/.../experts-gather-to-tackle>



# ...Antecedentes del taller ...

<https://www.food.gov.uk/.../experts-gather-to-tackle>

*...Reexaminar evidencia para reenfocar la investigación y manejo del riesgo con oportunidades de financiamiento dentro de la UE los próximos años...*

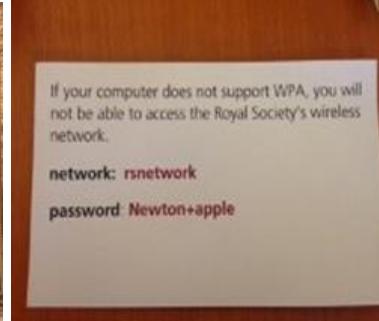
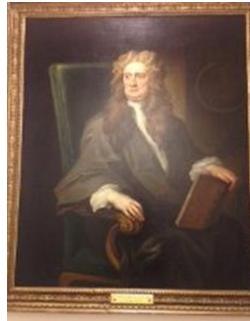
130 expertos Reguladores, Académicos y Productores

Tres días de trabajo modalidad seis *Breakout Groups*

-19% 2009 en UE causantes de 1000 brotes que afectaron 8700 ciudadanos.

-Informe ACMSF 2015: Evidencias más importantes NoV, HAV y HEV.

-Antecedentes de EFSA´s BIOHAZ Panel desde 2011: Actualización en información de la importancia de los virus en los alimentos en relación a la biología, epidemiología, diagnóstico y salud Pública



# Revisión de prioridades previas.

- Are these priorities still relevant?
- Have any of these issues been fully or partly answered by research to date?
- Are there any issues that require investigation instead of, or in addition to, the priorities listed below?
- Are any of the identified priorities dependent upon completion of other work?
- Are there any priorities which are country-specific?

# ...Presentaciones orales..

## 1. Norovirus epidemiología and public health impact.

Marion Koopmans. National Institute of Public Health and the Environment The Netherlands.

## 2. Hepatitis A epidemiología and public health impact

Rosa M Pintó University of Barcelona.

## 3. Hepatitis E epidemiología and public health impact.

Harry Dalton. Royal Cornwall Hospital UK.

## 4. Methodology for detection of Norovirus and Hepatitis A virus in foods, current status and future challenges.James Lowther.Centre for Environment. Fisheries and Aquaculture Science.

## 5- Detection methods for hepatitis E virus in food.

Reimar Johne. Federal Institute for risk assessment Germany.

## 6. Norovirus and Hepatitis A-control option for viruses in the food chain.

Lee-Ann Jaykus. North Caroline State University US.

## 7. Hepatitis E virus, transmission and control in the food chain.

Wim van der Poel.Central Veterinary Institute of Wageningen University and Research Centre. The Netherlands.



# ..ESTADO DE AVANCE EN METODOLOGIA DE DETECCIÓN de NoV y HAV por ISO

... [www.cefas.com](http://www.cefas.com) European Union Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs. Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science. UK

-Working group comprised of international food and water virology experts, currently 43 members from 15 countries.

- 23 international labs involved in 2006 ring trial organized by EURL (detection of norovirus and HAV in contaminated oysters)
- Virus extraction; 13 methods
- Viral RNA extraction; 29 methods
- RT-PCR; one and two-step, conventional single round,nested and semi-nested and real-time RT-PCR formats used.
- Primers/probes; at least 13 different sets
- 2012-2014 validate in 7 food matrix : Oysters, Mussels, raspberries, lettuce, spring onions, bottled waters & food surfaces: Publication end of 2016????



# **Seis Grupos de trabajo...**

- 1. Impacto de Norovirus en la Epidemiología y Salud Pública**
- 2. Impacto de HAV en la Epidemiología y Salud Pública.**
- 3. Impacto de HEV en la Epidemiología y Salud Pública.**
- 4 Método de HAV y Norovirus en la cadena productiva.**
- 5 Método de HEV en cadena productiva.**
- 6. Opciones de control de HAV y NoV**



# RESUMEN DE INTERESES PRIORITARIOS

## .....los top 5....

Development and validation of direct and indirect methods for assessment of HEV infectivity (**28 votes**)

How does finding norovirus in foodstuff relate to public health risk? (**27 votes**)

Methods to evaluate infectivity in control measures and food samples (**26 votes**)

Development of standard methods and ISO methods for detection of HEV in meat and meat products (**24 votes**)

What is the burden of Hepatitis E in human populations in Europe (**23 votes**)

# ...top 10.....

Implementation of advanced methods to identify sources of contamination and prioritising risk factors from the food supply chain for shell fish & produce to inform risk assessment (**22 votes**).

Identification and validation of intervention strategies for decontamination of NoV and HAV at all stages of the food chain for shell fish & produce (**14 votes**)

Comparative virus phylogenies in human and pig populations, food products and production chains, in Member States (**13 votes**)

Development of conceptual models of HEV heat inactivation, and validation in foods (**12 votes**).

Dynamics of HEV in the pig population (in particular how this is affected by husbandry practices) (**11 votes**)



# Horizon 2020

## ....in three pillars...excellent science, industrial leadership and societal challenges.....

Calls 2016-17

Sustainable food security  
Blue growth  
Rural renaissance  
bio-bases innovation for sustainable goods and services.

Luis Vivas-Alegre Research Programme Officer  
DG RTD Bioeconomy Directorate Agri-Food Chain Unit



Siete desafíos.....

- 1 Health, demographic change and wellbeing.
2. Food security, sustainable agriculture and forestry, marine and maritime and inland water research and the bioeconomy
- 3- Secure, clean and efficient energy
- 4 Smart, green and integrated transport. Climate action, resource efficiency and raw materials.
- 5 Climate action, resource efficiency and raw materials.
- 6 Inclusive, innovative and reflective societies.
- 7 Secure societies.



## HORIZON 2020

[http://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/opportunities/h2020/ftags/international\\_cooperation.html#c,topics=flags/s/IntlCoop/1/1&+callID=eadline/desc](http://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/opportunities/h2020/ftags/international_cooperation.html#c,topics=flags/s/IntlCoop/1/1&+callID=eadline/desc)

*Research and innovation ...funding opportunities.... Topics for international coorperation.....*

EIT Food: FOOD 4 FUTURE : Sustainable supply chain for resources to consumers--- dead line ---Julio 14, 2016.

BG -07 -2016 Blue Green innovation for clean coasts and seas. 14 feb 2017.

ICT-07-2017 5G PPP Research and validation of critial technologies and systems.

31-2017\_ Micro and nanoelectronics technologies

LCE 22-2016 International colaboration **with Brazil on advanced lignocellulosic biofuelds** 8/9/16

NMP-24-2015 Low energy solution for drinking water production

