

COLABORACIÓN ESPECIAL**EFFECTOS SOBRE LA SALUD DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA
Y ALIMENTOS POR VIRUS EMERGENTES HUMANOS, (*)****Sílvia Bofill-Mas, Pilar Clemente-Casares, Néstor Albiñana-Giménez, Carlos Maluquer de Motes Porta, Ayalkibet Hundesa Gonfa y Rosina Girones Llop**

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

RESUMEN

El desarrollo de tecnologías moleculares aplicadas a estudios ambientales ha permitido constatar que incluso en países altamente industrializados existe una alta prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas, principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos. Concentraciones significativas de virus son detectadas en las aguas vertidas al ambiente y en los biosólidos generados en plantas de tratamiento de agua residual. En este trabajo se describen las características generales de la contaminación ambiental por virus, principalmente por virus emergentes, analizándose con mayor profundidad los virus de la hepatitis E (VHE) y los poliovirus humanos como los virus contaminantes ambientales de más reciente identificación en países industrializados. Se ha demostrado que existe una elevada prevalencia de los poliovirus humanos, BK y JC, en agua residual en todos los países estudiados, lo que implica la potencial transmisión de los virus y de genes potencialmente cancerígenos por vía oral. Estudios recientes demuestran que el patrón epidemiológico de la infección por VHE en países industrializados es complejo y que una gran diversidad de cepas del VHE infecta simultáneamente a la población. El control de la contaminación viral del medio ambiente requiere la estandarización de técnicas moleculares y el desarrollo de un programa de vigilancia que permita valorar parámetros víricos y reducir la diseminación de las enfermedades establecidas y de las infecciones víricas emergentes.

Palabras clave: Medio ambiente y salud pública. Contaminación ambiental. Virus. Hepatitis E. Poliovirus. Virus JC. Virus BK.

ABSTRACT

Correspondencia:
Rosina Girones Llop
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Av. Diagonal 645
08028 Barcelona
Correo electrónico: rgirones@ub.edu

**Effects on Health of Water and Food
Contamination by Emergent
Human Viruses**

The development of molecular technologies applied to environmental studies has shown that even in highly industrialized countries there is a high prevalence of viruses in the environment that represents an important impact on public health and substantial economic losses mainly related to the transmission of viruses through water and food. Significant concentrations of viruses are detected in the water flowed to the environment and in the biosolids generated in wastewater treatment plants. This work describes the general characteristics of the environmental contamination by viruses principally by emergent viruses, with a special emphasis on the hepatitis E virus (HEV) and the human polyomaviruses as the environmental contaminants more recently identified in industrialized countries. It has been shown that there is a high prevalence of the human polyomaviruses BKV and JCV in urban sewage in all studied countries, implying a potential transmission of these viruses and their potential oncogenic genes through the oral route. Recent studies have shown that the epidemiological pattern of the HEV infection in industrialized countries is complex and that a diversity of HEV strains simultaneously infects the population. The control of the viral contamination requires the standardization of molecular techniques and the development of a surveillance program for the evaluation of the viral parameters and to reduce the dissemination of already established diseases and emergent viral infections.

Key words: Environment and public health. Environmental pollution. Viruses. Hepatitis E. Polyomavirus. JC virus. BK virus.

(*) La investigación desarrollada ha sido financiada por: el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo; la *Food and Drug Administration (FDA)* de los Estados Unidos; el Centro de Referencia en Biotecnología de Cataluña (CeRBA); la Generalitat de Cataluña mediante las ayudas concedidas a grupos de investigación consolidados; y las becas otorgadas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y la Generalitat de Catalunya dentro del Programa de Formación de Investigadores.

INTRODUCCIÓN

El impacto de la población sobre los sistemas ecológicos del planeta se ha ido haciendo más aparente en los últimos años, poniendo de manifiesto la estrecha relación existente entre los niveles de contaminación ambiental y la salud de la población. Las enfermedades infecciosas representan un gran riesgo y son la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes¹. Según información facilitada por la Organización Mundial de la Salud², considerando únicamente las enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año, mayoritariamente niños de menos de 5 años. Ejemplos de brotes infecciosos asociados a la contaminación fecal en el medio ambiente fueron: los de Shanghai en 1988, en el que se produjeron 300.000 casos de hepatitis A y 25.000 de gastroenteritis virales debido al consumo de moluscos cultivados en un estuario con contaminación fecal³, un brote de gastroenteritis por norovirus probablemente asociado al consumo de agua con contaminación fecal en una residencia de ancianos en Albacete que afectó en 1999 a 341 personas⁴ y los brotes de hepatitis E en Kanpur en 1991 que afectaron a 79.000 personas⁵ o el más reciente de 2004 en Sudán que afectó a 6.861 personas y causó 87 muertes en la región de Darfur, donde el número de casos continúa incrementándose⁶.

Dentro de las enfermedades infecciosas los virus son los principales causantes de brotes relacionados con la contaminación del agua y los alimentos en los países más desarrollados, donde la mejora de los tratamientos de depuración de las aguas residuales ha reducido la transmisión de la mayor parte de los patógenos bacterianos⁷.

Desde una perspectiva ecológica es interesante sin embargo comentar que a la definición un poco antropocéntrica de los virus como microorganismos patógenos causantes

de enfermedades hay que añadir una visión más biológica en la que los virus se considerarán como parte de la naturaleza y como miembros de los diferentes ecosistemas naturales. En el medio ambiente natural existen grandes cantidades de virus que forman parte de los diferentes ecosistemas y no representan peligro para el hombre, dado que los virus son elementos genéticos específicos de huésped y se multiplican infectando organismos vivos que constituyen los diferentes ecosistemas: bacterias, algas, protozoos, etcétera. En aguas naturales sin contaminación fecal se han detectado concentraciones de partículas víricas de 10^8 ml⁻¹ y parece indudable que los virus juegan un papel importante en el intercambio genético y en la regulación de las poblaciones a las que infectan^{8,9}.

Entre los virus que infectan al hombre existen muchos tipos diferentes que se excretan en grandes concentraciones en las heces de personas con gastroenteritis o hepatitis y en menores concentraciones en heces u orina de individuos sanos, por lo que los virus humanos están presentes en grandes cantidades en aguas residuales urbanas y son considerados contaminantes ambientales. Desde los inicios de la virología ambiental en los años 40 del siglo XX se han ido estudiando y conociendo los virus excretados al medio ambiente que a través de la contaminación fecal pueden contaminar agua y alimentos y representar un riesgo sanitario para la población. En los últimos años el desarrollo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a la posibilidad de caracterizar genéticamente con relativa facilidad los virus detectados, ha permitido obtener una información más completa y real de muchos de los virus excretados que no pueden cultivarse de forma eficiente en líneas celulares. En este trabajo se describen las características generales de la contaminación ambiental causada por virus y los datos más recientes sobre virus emergentes en el medio ambiente, ana-

lizándose con mayor profundidad los virus de la hepatitis E y los poliomavirus humanos como los contaminantes ambientales de más reciente identificación en países industrializados.

LOS VIRUS, CONTAMINANTES AMBIENTALES

Las aguas residuales son la principal fuente de microorganismos patógenos que se transmiten a través del ambiente y que llegan a la población especialmente a través de la contaminación del agua usada para beber, agua utilizada en cultivos de vegetales o en cultivos de moluscos bivalvos, en la preparación de comida, para lavar, en el baño o en los diversos usos recreativos¹⁰. El tratamiento actualmente aplicado a las aguas residuales procesadas por métodos biológicos y físico-químicos ha reducido significativamente la incidencia de enfermedades entre la población, especialmente las de etiología bacteriana, sin embargo los protozoos y los virus son más resistentes que las bacterias a muchos de estos tratamientos. Concentraciones significativas de virus son detectadas en las aguas vertidas al ambiente y en los biosólidos generados en plantas de tratamiento de agua residual¹¹⁻¹³ y, a pesar de que se considera que hay una reducción importante de la concentración de virus, se ha estimado, a partir de los 100.000 enterovirus por litro frecuentemente detectados en el agua residual, que en una población de 300.000 habitantes pueden liberarse al medio ambiente cantidades de 10^9 partículas víricas en 24 horas en aguas residuales tratadas¹⁴.

Los virus han demostrado además presentar una mayor estabilidad en el ambiente que los indicadores bacterianos comúnmente utilizados para evaluar la contaminación fecal¹⁵. La contaminación del medio ambiente a partir de aguas residuales se confirma al analizar la presencia de virus en aguas superficiales de ríos y lagos en los que

detectamos altos porcentajes de muestras positivas al analizar de 1-4 litros de muestra¹⁶, y en los frecuentes casos de infecciones virales asociados al consumo de moluscos bivalvos que se observan cada año en países industrializados¹⁷. Los virus entéricos en agua pueden permanecer estables durante meses o incluso más tiempo si están asociados a sólidos y pueden acumularse en sedimentos donde persistirán durante más tiempo y desde donde pueden resuspenderse en la columna de agua por diversos procesos naturales como lluvias fuertes, o por procesos artificiales, facilitando la diseminación viral^{15,19,18}.

Se ha observado en algunos casos que los estándares de calidad microbiológica actuales no garantizan la ausencia de virus y se han aislado virus en agua de bebida, aguas superficiales, agua de mar o moluscos bivalvos que cumplen los estándares actuales de índices bacterianos^{20, 21}. El único parámetro viral incluido en la normativa actual europea es la presencia de enterovirus en aguas recreacionales ya que en general se aíslan y cuantifican con facilidad en líneas celulares²². Los datos existentes obtenidos utilizando técnicas moleculares han permitido observar que la presencia de enterovirus no se relaciona con la presencia de otros virus patógenos y se ha sugerido la utilización de bacteriófagos como indicadores que permiten una rápida identificación de virus infecciosos y de adenovirus humanos como índice molecular de contaminación viral de origen humano^{16,23,24}. En la tabla 1 se describe la prevalencia de distintos virus identificados en agua residual.

METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA DETECCIÓN DE VIRUS EN EL MEDIO AMBIENTE

El control virológico del medio ambiente es un proceso complejo debido a la dificultad de identificar concentraciones normalmente pequeñas de virus diversos pertene-

Tabla 1
Valores estimados de la prevalencia de virus en aguas residuales

Virus	Lugar de recolección de las muestras estudiadas	Concentración	% de muestras positivas	Método de cuantificación	Referencia
Adenovirus	España, Francia, Suecia, Grecia, Estados Unidos, Egipto y Sudáfrica	10^7 - 10^8 genomas/ml	98%	PCR anidada	²⁵
Astrovirus	Francia	$4,1 \times 10^8$ genomas/100ml	100%	RT-PCR cuantitativa	²⁶
	Sudáfrica				
Enterovirus	Francia	$3,8 \times 10^3$ genomas/ml	87%	RT-PCR + hibridación	²⁷
	España	467UFP/l	90%	RT-PCR cuantitativa	²⁸
	España	2100UFP/l	100%	VIRADEN (cultivo celular)	²⁹
				Ensayo doble capa (cultivo celular)	³⁰
HAV	España		57.4%		³¹
HEV	España		43.5%		³²
	Estados Unidos y Francia		22.5%		³³
Norovirus	Reino Unido	$1,8 \times 10^8$ genomas/100ml		RT-PCR cuantitativa	²⁵
Poliomavirus JC	España, Francia, Suecia, Grecia, estados Unidos, Egipto y Sudáfrica	10^7 - 10^8 genomas/ml	98%	PCR anidada	
Poliomavirus BK	España	$3,5 \times 10^2$ genomas/ml		PCR cuantitativa	²⁵
	España, Francia, Suecia, Grecia, estados Unidos, Egipto y Sudáfrica	10^7 - 10^8 genomas/ml	88%	PCR anidada	
Rotavirus	España	$4,1 \times 10^1$ genomas/ml		PCR cuantitativa	³⁴
	Brasil	2.2 UFP/l	20.6%	Cultivo celular, inmunofluorescencia y inmunoperoxidasa	
	España		66.9%	RT-PCR + hibridación	³⁵
	Egipto		85.7%		

UFP, unidades formadoras de focos; UFP, unidades formadoras de calvas.

cientes a diferentes familias y que están dispersos en grandes volúmenes de agua, biosólidos o en otro tipo de muestras ambientales. La aplicación de la (RT)-PCR, ha permitido identificar el papel de los norovirus como principales causantes de gastroenteritis relacionadas con brotes alimentarios, o detectar la gran cantidad de virus de la hepatitis A (VHA) excretados incluso en países que ya no se consideran endémicos para esta enfermedad. Por ejemplo en el agua residual urbana de Barcelona se detecta VHA en un 57,4% de las muestras³¹. Se han identificado también adenovirus y poliovirus entre los virus más abundantes de los regularmente detectados en aguas residuales y se ha identificado el virus de la hepatitis E como un virus emergente que previamente se consideraba que existía únicamente en otras áreas geográficas consideradas endémicas^{16,32,43}.

La mayor parte de virus que se transmiten por la vía oral-fecal no tienen envuelta lipídica y son relativamente resistentes al calor, la desinfección y los cambios de pH. En la actualidad no se dispone de métodos estandarizados de detección de virus en agua o alimentos y esta metodología no se aplica de forma rutinaria en los laboratorios de Microbiología. Las técnicas utilizadas para la obtención de los datos descritos por estos autores sobre adenovirus, enterovirus, norovirus, virus de la hepatitis A y E y poliovirus en el ambiente se han desarrollado a lo largo de diversos trabajos^{16,21,44} y se basan en la concentración de virus a partir de diversos volúmenes de aguas superficiales mediante filtros electropositivos (Zeta-plus; CUNO) según el método descrito por Sobsey y Jones⁴⁵. En agua de mar los virus se concentraron usando un método modificado de filtración a través de membranas de nitrato y acetato de celulosa descrito por Sinton *et al.*⁴⁶. A partir del concentrado o directamente de agua residual, de biosólidos o del homogenizado de moluscos bivalvos, los virus son eluidos de la materia particulada mediante tampón glicina a pH alcalino y concentrados en 100-200µl utilizando técni-

cas de ultracentrifugación. El procedimiento seleccionado para la extracción de ácidos nucleicos, tanto ARN como ADN, se basa en el método descrito por Boom *et al.*⁴⁷ que permite la eliminación de inhibidores de las posteriores reacciones de (RT)-PCR anidadas utilizadas en la identificación y posterior tipificación de los virus y descritas en detalle en los diversos estudios publicados^{16, 32,43,44}. Las técnicas de cuantificación de virus por PCR a tiempo real se están desarrollando actualmente y se han utilizado en la cuantificación de adenovirus²¹ y poliovirus y por otros autores en la cuantificación de enterovirus y norovirus. Hay que tener en cuenta que la eficiencia variable del proceso de retrotranscripción puede condicionar la exactitud de la cuantificación de genomas de virus ARN en muestras ambientales^{28,33}, por lo que la cuantificación de genomas ADN es en general más eficiente que la cuantificación de genomas ARN.

ENFERMEDADES ASOCIADAS A LOS VIRUS COMO CONTAMINANTES AMBIENTALES

Un gran número de virus diferentes infectan al hombre y a los animales y son excretados al medio ambiente a través de las heces y la orina pudiendo causar distintas enfermedades¹⁵ como meningitis, algunos tipos de parálisis, enfermedades respiratorias, diarreas y vómitos, miocarditis, anomalías congénitas de corazón, hepatitis, infecciones oculares y, según datos recientes, podrían estar también relacionados con diversos tipos de cáncer³⁶⁻³⁸.

Muchas infecciones virales son asintomáticas y pasan completamente desapercibidas en el huésped, aunque representan una fuente de virus y de nuevas infecciones en la población. Éste es el caso de la mayoría de infecciones causadas por enterovirus. Existe también un número elevado de diferentes virus que infectan al hombre de forma persistente y asintomática, constituyendo una

Tabla 2

Principales virus patógenos excretados en heces y orina y detectados en el medio ambiente

Familia	Género	Principales especies	Enfermedades asociadas
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adenovirus humanos	Infecciones oculares, respiratorias, urinarias, gastroenteritis
Polyomaviridae	Polyomavirus	JC BK	Leucoencefalopatía multifocal progresiva Nefropatía asociada a poliomavirus
Picornaviridae	Enterovirus	Poliovirus Coxsackievirus A Coxsackievirus B Echovirus Enterovirus 68-71	Infecciones del sistema nervioso, oculares y respiratorias, miocarditis, diarrea, anomalías congénitas de corazón
	Parechovirus	Parechovirus humano	Gastroenteritis
	Hepatovirus	VHA	Hepatitis tipo A
Caliciviridae,	Norovirus	Virus de Norwalk	Gastroenteritis
	Sappovirus	Virus de Sapporo	Gastroenteritis
Hepeviridae,	Hepevirus	VHE	Hepatitis tipo E
Reoviridae,	Rotavirus	Rotavirus grupos A y B	Gastroenteritis
Astroviridae	Astrovirus	Astrovirus humano	Gastroenteritis

parte de lo que se podría definir como la flora microbiana humana, siendo excretados en las heces u orina de personas sanas durante meses y años³⁹. No obstante es importante tener en cuenta que algunos de estos virus pueden causar importantes enfermedades en personas con inmunodeficiencias. Éste es el caso del poliomavirus JC que causa leucoencefalopatía multifocal progresiva, una enfermedad letal en aproximadamente un 4% de los enfermos de sida⁴⁰.

Los virus que el hombre excreta al medio ambiente y se han asociado a enfermedades importantes pertenecen a diferentes familias, de las que los géneros más importantes están enumerados en la tabla 2 junto con las patologías más significativas a las que se han asociado. La más frecuente es la gastroente-

ritis que representa también una causa de muerte no sólo en los países de economías emergentes sino también en los más industrializados, especialmente en personas de edad avanzada⁴¹. Le sigue en importancia clínica la hepatitis.

A diferencia de las bacterias, los virus son parásitos intracelulares estrictos y no se pueden replicar fuera de los huéspedes, así la contaminación viral del medio a lo largo del tiempo únicamente puede reducirse. Esto implica que las infecciones transmitidas a través del ambiente dependerán de la estabilidad de la partícula vírica, de la cantidad de virus excretados y de la susceptibilidad del huésped. Se ha observado que incluso dosis muy bajas de virus ingeridos pueden causar infecciones y muchas de las personas infec-

tadas pueden actuar como portadores asintomáticos y transmitir la infección a otras personas. La enfermedad puede evidenciarse cuando éstas se han infectado, lo que puede ocurrir en áreas distantes de la fuente original de la contaminación, por lo que a menudo son difíciles de realizar los estudios epidemiológicos de las infecciones distribuidas por el ambiente⁴².

VIRUS EMERGENTES QUE CONTAMINAN EL MEDIO AMBIENTE

El desarrollo tecnológico descrito va ligado en muchos casos al concepto de microorganismos emergentes, ya que las nuevas técnicas permiten identificar y estudiar infecciones virales que no podían estudiarse por técnicas clásicas de aislamiento en cultivo celular. Los microorganismos emergentes pueden definirse como nuevos microorganismos de reciente aparición, microorganismos que ya existían pero han aumentado rápidamente en incidencia y/o ámbito geográfico, y aquellos por los que la transmisión por agua o alimentos ha sido identificada recientemente. Esto último puede ser el resultado de la aplicación de nuevas tecnologías o de la mejora en los métodos de aislamiento que facilitan la detección de patógenos específicos y su asociación con brotes de enfermedades con los que no había sido previamente posible la asociación o por cambios ambientales o de condiciones de vida que proporcionan nuevos hábitats para estas infecciones⁴⁸. Varios estudios han confirmado que enfermedades infecciosas relacionadas con el agua no sólo siguen siendo causa primordial de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, sino que el espectro de enfermedades se está ampliando y la incidencia de muchas relacionadas con el agua está aumentando. Desde 1970 varias especies de microorganismos presentes en heces humanas o animales se han confirmado como patógenos; tal sería el caso del rotavirus, virus de la hepatitis E y norovirus. Otros

virus, como por ejemplo coronavirus entéricos y parvovirus, se han detectado en heces de pacientes con gastroenteritis pero su patogenicidad no ha sido probada⁴⁹.

Norovirus

La familia *Caliciviridae* está formada por cuatro grupos de virus genética y antigénicamente diversos que también difieren en el huésped animal de preferencia. Los calicivirus humanos se han agrupado en dos géneros *Norovirus* y *Sapovirus*. Los Norovirus, previamente denominados virus del grupo Norwalk, y otros calicivirus entéricos causan gastroenteritis agudas autolimitadas en humanos y aunque las infecciones asintomáticas son comunes, estudios recientes han demostrado que los norovirus son la causa más común de gastroenteritis en personas de todos los grupos de edad⁴⁹. La incidencia es mayor en niños pero la enfermedad también ocurre regularmente en adultos. Ésta sería una diferencia con respecto a los otros grupos de virus como los rotavirus, astrovirus y adenovirus que causan gastroenteritis principalmente en niños. Los norovirus son responsables de gastroenteritis esporádicas y de brotes infecciosos en escuelas, hospitales, residencias de ancianos, hoteles y cruceros. El virus es extremadamente infeccioso y los casos secundarios son muy característicos de los brotes infecciosos de norovirus.

La identificación de norovirus presenta una dificultad añadida al hecho de que no se han logrado cultivar en líneas celulares y es que presentan una gran diversidad genética de manera que su detección en muestras ambientales o alimentos requiere la utilización de RT-PCR y la confirmación por secuenciación o hibridación de la especificidad del resultado obtenido. El género se ha distribuido en dos genogrupos que a su vez se dividen en diversos genotipos entre los cuales se van incluyendo nuevos variantes y recombinantes que se identifican durante los

estudios de vigilancia epidemiológica que se llevan a cabo en diferentes países^{50,51}.

Existen diversas revisiones publicadas recientemente que describen las características de los norovirus y su papel como causante de gastroenteritis asociadas al consumo de alimentos contaminados^{52,53}.

Virus de la Hepatitis E

El VHE se ha clasificado como género *Hepevirus* de la nueva familia *Hepeviridae*. Es un virus ARN de genoma bastante estable, aunque las cepas presentan diferencias que permiten su distribución en 4 grandes genotipos⁵⁴. La mayoría de cepas autóctonas de zonas industrializadas y consideradas tradicionalmente no endémicas como EUA y Europa pertenecen al genotipo III^{32,55-57}.

La hepatitis E es una enfermedad aguda que no progresa hacia cronicidad⁵⁷. Los síntomas clínicos son básicamente los mismos que los de una hepatitis causada por VHA pero ligeramente más severa. La hepatitis fulminante está más comúnmente asociada con el VHE que con otro tipo de hepatitis virales⁵⁸, presentando una mortalidad en la población general de aproximadamente un 1%, aunque se incrementa cuando afecta a mujeres en el tercer trimestre de embarazo (hasta un 20%)⁵⁹.

Entre un 80% y un 100% de los cerdos en granjas comerciales de los Estados Unidos presentan anticuerpos contra el VHE⁶⁰. Resultados similares se han obtenido en otras regiones, tanto endémicas como no endémicas para el VHE en humanos, sugiriendo que el virus se encuentra de manera ubicua en las poblaciones de cerdos de todo el mundo. En estudios realizados en diversas granjas de Cataluña se ha observado una seroprevalencia de un 20% y se han identificado dos cepas del VHE de origen porcino muy similares a las identificadas en agua residual urbana y en muestras clínicas de la

misma región^{32,61}. También se han encontrado anticuerpos contra el VHE en ratas, gatos, primates, jabalíes y ciervos⁶²⁻⁶⁶.

Las características epidemiológicas de la infección por VHE son: transmisión fecal-oral; brotes epidémicos asociados a agua contaminada en áreas donde las condiciones sanitarias son deficientes, principalmente en regiones tropicales y subtropicales; mayor tasa de afectados entre jóvenes adultos de entre 15 y 40 años; mayor tasa de mortalidad en mujeres embarazadas (especialmente durante el tercer trimestre); baja seroprevalencia (IgG anti-VHE) en zonas con brotes y casos esporádicos de hepatitis E; baja tasa de transmisión por contacto persona a persona y ausencia de secuelas o cronicidad^{59,67}.

Además de brotes epidémicos el VHE también provoca casos esporádicos de hepatitis E, siendo responsable de más del 50% de las hepatitis agudas virales en muchos países de economía emergente en los que el virus es endémico⁵⁹.

Las regiones más industrializadas se han considerado tradicionalmente no endémicas para el VHE con casos esporádicos de hepatitis E atribuidos a cepas importadas de regiones endémicas⁶⁸. En estas regiones de Europa y Estados Unidos la seroprevalencia (IgG anti-VHE) oscila entre 1 y 3%⁶⁸, valores relativamente altos si se aceptaba que los casos de hepatitis E son todos importados. A partir de los años 90 empezaron a detectarse en Estados Unidos, Italia, Grecia y España cepas del VHE causantes de casos clínicos en personas sin antecedentes de haber viajado a zonas endémicas^{55-57,61}. Así, en un estudio realizado en colaboración con el Hospital Vall d'Hebró de Barcelona se ha identificado ARN del VHE en el suero de 4 personas con hepatitis E esporádicas causadas por cepas idénticas o estrechamente relacionadas con las detectadas en agua residual, las cuales se podrían considerar endémicas y en el suero de una persona con una infección probablemente importada^{61,69}.

Figura 1

Árbol obtenido por el método *Neighbor Joining* representando las relaciones filogenéticas en un fragmento de 101 nt de la región del ORF2 del VHE entre secuencias aisladas a partir de muestras de agua residual urbana



(Barcelona -BCN, AF058684; BCN3, AF490985; BCN4, AF491003; BCN5, AF490986; BCN12, AF490993; BCN16, AF490997-, Nancy en Francia -Nancy, AF490999- y Washington DC en EUA -Washington, AF490998-), muestras de agua residual de matadero de Barcelona (Mat1, Mat2, Mat3, Mat4 y Mat5, secuencias no publicadas), muestras de suero humano (de Barcelona -VH1, AF491000; VH2, AF491001; VH3, AY540113; VH4, AY540114; VH5, AY540115-, de EUA -EUA1, AF060668; EUA2, AF060669-, Grecia -Grecia1, AF110391; Grecia2, AF110392-, Italia -Italia, AF110390-, Austria -Austria, AF279123-, Japón -Japón1, AB074918; Japón2, AB089824-, Pakistán -Pakistán, M80581-, India -India, X98292-, Myanmar -Myanmar, M73218-, Egipto -Egipto, AF051352-, Chad -Chad, AY204877-, Marruecos -Marruecos, AY230202-, China -China1, D11092; China2, AJ272108; China3, AF082094-, México -México, M74506-) y muestras porcinas (de Barcelona -Por1, AF491002-, Holanda -Holanda1, AF336294; Holanda2, AF336290-, Reino Unido -Reino Unido1, AF503511; Reino Unido2, AF503512-, Canadá -Canadá, AY115488-, Nueva Zelanda -Nueva Zelanda, AF200704-, Argentina -Argentina, AY286304- y Kirguizistán -Kirguizistán, AF455784-). En negrita se representan las cepas aisladas en Barcelona. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 60.

En estudios preliminares sobre la estabilidad del VHE en agua residual se observó que el tiempo requerido para una inactivación del 90% era de 20 días a una temperatura de 20°C, inferior a los 38 días estimados para poliovirus 1 en las mismas condiciones¹⁶. En los estudios de prevalencia del virus en agua residual se ha detectado ARN del VHE en el 53,8% de las muestras de agua residual estudiadas y se han identificado más de 20 secuencias diferentes del virus³². El árbol filogenético generado con cepas representativas se describe en la figura 1. También se detectó el VHE en 1 de 5 muestras de agua residual urbana Washington DC y en 1 de 4 muestras de Nancy (Francia), zonas que presentaron también alta concentración del VHA en agua residual.

Existen muy pocos estudios por parte de otros autores sobre la presencia del VHE en el ambiente. Vaidya *et al.*⁷⁰ encontraron un 11% de muestras de agua residual positivas procedentes de una planta de Pune (India), región considerada tradicionalmente endémica para el VHE. En este caso el análisis se realizó sin concentración previa de las partículas víricas. En esta misma región se detectó un incremento de los valores de seroprevalencia en individuos que trabajaban en contacto con agua residual (56,5%) respecto a la población control (18,9%)⁷¹. Un estudio realizado en Turquía mostró que campesinos que usaban agua residual para la irrigación de los campos presentaban una seroprevalencia de un 34,8%, frente al 4,4% de los individuos controles de la región⁷². Se considera que personas que trabajan sin protección expuestas a aerosoles producidos por aguas residuales o en contacto estrecho con animales infectados, concretamente cerdos aunque otros animales están también siendo estudiados, pueden representar grupos con riesgo mas elevado de infección por VHE.

Los poliomavirus humanos JC y BK

Los poliomavirus son pequeños virus icosaédricos (figura 2) que presentan un geno-

ma de ADN circular, covalentemente cerrado, superenrollado de doble cadena que mide aproximadamente 5,2kb. Los antígenos T y t son proteínas multifuncionales que dotan a estos virus de cierto potencial oncogénico⁷⁴. Los poliomavirus infectan a una amplia variedad de vertebrados habiéndose descrito hasta el momento dos especies que infectan al hombre: JC y BK.

El virus JC fue aislado por primera vez en 1971 como causante de una enfermedad letal del sistema nervioso central (SNC) denominada leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML). Esta enfermedad afecta principalmente a individuos inmunodeprimidos por lo que su prevalencia se ha visto muy incrementada debido a la pandemia de sida. Aproximadamente un 4% de pacientes de sida fallecen de PML⁴⁰. Recientemente se ha relacionado este virus con tumores a nivel de SNC³⁷ y con tumores colorectales^{36,38,75,76}. Aunque no está claro el papel que el virus puede jugar en el desarrollo de estos tumores se sabe que es un potente inductor de tumores de cerebro en hámsters y primates y su capacidad oncogénica ha sido ampliamente demostrada en modelos animales.

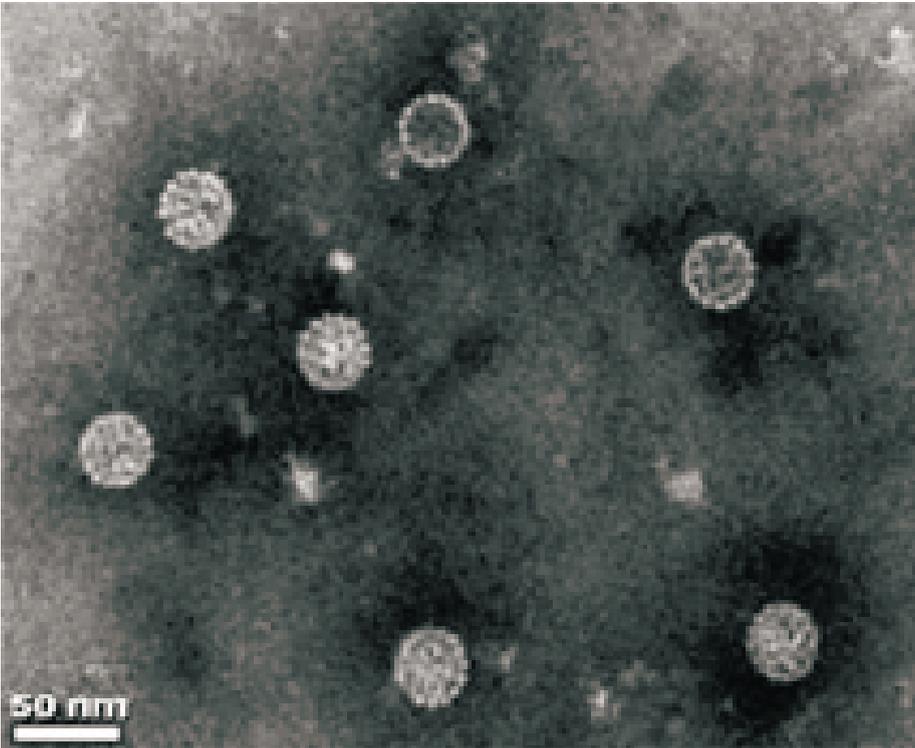
El virus BK es un poliomavirus humano que también ha visto incrementada su prevalencia debido a que afecta a personas sometidas a trasplantes de órganos, sobretodo de riñón y de médula ósea, siendo el principal causante de nefropatía asociada a poliomavirus, cistitis hemorrágica y estenosi uretérica en estos pacientes.

Ambos virus se excretan en orina, pues realizan infecciones persistentes en el riñón una vez ha tenido lugar la infección primaria. Un 20-80% de la población excreta poliomavirus en orina, dependiendo del grupo étnico y el rango de edad al que pertenecen^{39,77}.

La infección primaria por el virus JC tiene lugar durante la infancia y la adolescencia temprana⁷⁸⁻⁸⁰ y normalmente es asintomáti-

Figura 2

Micrografía de las partículas víricas de poliomavirus humanos presentes en el sobrenadante de un cultivo de células gliales humanas (SVG) infectadas con la orina de una mujer sana⁷²



ca. En individuos inmunocompetentes el virus JC persiste en el riñón y su presencia ha sido descrita también en otros órganos⁸¹. Un elevado porcentaje de la población es seropositiva para el virus JC. Este porcentaje crece conforme aumenta la edad de la población estudiada y puede llegar a ser de un 75% en poblaciones adultas⁸².

El virus BK infecta por primera vez al hombre también durante la infancia, parece ser que a edades más tempranas que el virus JC⁷⁸⁻⁸⁰. Los datos sobre la prevalencia de BK en la población son muy dispares y van del 50 al 90%⁸³. BK se excreta en orina menos que JC⁸⁴ y parece ser que el estado inmunológico del huésped influye más directamente en el grado de excreción⁸⁵.

Presencia de poliomavirus humanos en el ambiente. Con la intención de definir los posibles mecanismos de transmisión de estos virus nuestro grupo de investigación ha estudiado su presencia en aguas residuales de diferentes zonas geográficas de Europa, África y Estados Unidos, ya que hasta el momento no existían datos sobre la presencia y estabilidad en el ambiente de estos virus.

Del total de 52 muestras estudiadas un 98% resultaron ser positivas para el virus JC con concentraciones medias aproximadas de 10^2 - 10^3 partículas víricas/ml de agua residual y un 90% fueron positivas para el virus BK con concentraciones medias de 10 - 10^2 partículas víricas/ml de agua. El 98% de las

muestras analizadas fueron positivas para adenovirus humanos, virus utilizados por nuestro grupo como indicadores de contaminación fecal humana. También se detectaron los virus JC y BK en distintas muestras ambientales procedentes de la India y JC en muestras de moluscos bivalvos analizados^{25,43}. Así pues, los poliomavirus humanos están presentes en elevadas concentraciones en aguas residuales, y los estudios de estabilidad han demostrado que son estables en ellas y a pH ácidos, lo que nos llevó a sugerir el tracto gastrointestinal como posible portal de entrada de estos virus en el organismo y el virus JC como un potencial virus indicador de contaminación fecal de origen humano²⁵. El epitelio gastrointestinal esta frecuentemente expuesto a estos virus o/y a su ADN que contiene genes potencialmente oncogénicos y en estos últimos años se ha iniciado en diversos laboratorios el estudio de estas interacciones sin obtenerse hasta el momento resultados definitivos.

Otros patógenos emergentes

La aplicación de técnicas moleculares ha permitido identificar adenovirus en prácticamente el 100% de muestras de agua residual urbana analizada en diversas ciudades de África, Estados Unidos, Suecia, Francia, Grecia y Reino Unido y son los virus detectados en un mayor número de muestras de moluscos bivalvos cultivados en agua de mar con alguna presencia de contaminación fecal²⁵. Los adenovirus se han incluido recientemente en la lista de contaminantes candidatos de la *Environmental Protection Agency* de Estados Unidos dada su gran prevalencia en agua residual, su relación con diversas patologías y su resistencia en el medio ambiente y a algunos de los tratamientos utilizados en los procesos de depuración de agua. Los resultados obtenidos sobre la abundancia de adenovirus y la capacidad de detectar de forma específica la presencia de adenovirus de origen humano o de origen animal⁸⁶, sugiere su utilidad como

índice molecular de contaminación fecal y como instrumento para trazar el origen de la contaminación.

Muchos virus pueden ser excretados en heces u orina en períodos cortos durante una infección, aunque su detección en aguas residuales no se haya llevado a cabo probablemente por una reducida estabilidad de muchos grupos de virus en el medio ambiente y la fragilidad de muchas partículas víricas con envuelta lipídica. Recientes estudios desarrollados sobre la excreción en heces del coronavirus asociado al síndrome respiratorio severo agudo (SARS) han demostrado la excreción de este nuevo patógeno emergente (que se diseminó de forma global a principios del año 2003) mediante técnicas de RT-PCR en muestras clínicas de heces en un promedio de 27 días pudiendo a llegar en algunos casos a 126 días⁸⁷. Esto plantea la necesidad de llevar a cabo futuros estudios como sería el de la potencial transmisión respiratoria de virus excretados fecalmente, mecanismo conocido para algunos grupos de virus y que ha sido sugerido en algún caso en las infecciones de SARS y su impacto sobre la salud pública.

CONCLUSIONES

Existe una alta prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos.

En los estudios realizados sobre el virus de la hepatitis E se ha observado, analizando aguas residuales en Europa y Estados Unidos, que existe una elevada prevalencia de este virus en áreas geográficas que se consideraban libres de cepas endémicas y también que existen casos clínicos esporádicos y reservorios animales, por lo que se puede considerar como una potencial zoonosis. Se requieren más estudios para evaluar otros

posibles reservorios animales, la patogenicidad de las cepas endémicas detectadas y mejorar los sistemas de diagnóstico clínico.

La detección de poliomavirus en prácticamente el 100% de las muestras de agua residual sugiere su utilización como potenciales indicadores de contaminación viral humana, en adición a los adenovirus humanos, y la necesidad de valorar el efecto que la exposición frecuente a la ingestión de virus y/o genomas virales con potencial oncogénico tiene sobre el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el de colon.

El control de la contaminación viral del medio ambiente requiere la estandarización de técnicas moleculares y el desarrollo de un programa de vigilancia que permita valorar parámetros víricos y reducir la diseminación de las enfermedades establecidas y de las infecciones víricas emergentes.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Drs. Maria Buti y Rosend Jardí del Hospital Vall d'Hebró de Barcelona su colaboración en los estudios clínicos relacionados con VHE y al Dr. Andrew M. Lewis del *Center for Biological Examination and Research, Division of Viral Products, Food and Drug Administration, USA*, su colaboración en los estudios sobre la prevalencia de los poliomavirus humanos en el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. Report on Infectious Diseases. Geneva: WHO; 2004. Disponible en: www.who.int/infectious-disease-report/.
- World Health Organization. Water, Sanitation and Health. GENEVA: WHO; 2004. Disponible en: www.who.int/water_sanitation_health.
- Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis* 1991; 164:852-9.
- Mayoral Cortes JM, Mateo Ramos A, Pons Sánchez MC, Herrera Calvet I, Gutiérrez Avila G, Vivo Rodríguez A et al. Brote de gastroenteritis en una residencia de ancianos de Albacete. *Rev Esp Salud Pública* 2000; 74:561-72.
- Ray R, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN, Talwar GP y Naik SR. Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. *Lancet* 1991; 338:783-4.
- World Health Organization. Hepatitis E in Sudan - update3 [citado 28 de sept. 2004]. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2004_09_28/en/
- Craun GF. Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Sci Technol* 1991; 24:17-20.
- Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G y Heldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 1989; 340:467-8.
- Pina S, Creus A, González N, Girones R, Felip M y Sommaruga R. Abundance, morphology and distribution of planktonic virus-like particles in two high-mountain lakes. *J Plankton Res* 1998; 20:2413-21.
- Cliver DO. Significance of water and the environment in the transmission of virus disease. En: Melnick JL, editor. *Monographs in Virology*, 15. Nueva York:: Karger Basel; 1984. p. 30-42.
- Hurst CJ. Overview of water microbiology as it relates to public health. En: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD y Walter MV, editores. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: ASM Press; 1997. p. 133-5.
- Nielsen AL y Lyndholm B. Methods for the isolation of viruses from raw and digested wastewater sludge. *Water Res* 1980; 14:175-8.
- Graff J, Ticehurst J y Flehmig B. Detection of Hepatitis A Virus in sewage Sludge by Antigen Capture Polymerase Chain Reaction. *App Environ Microbiol* 1993; 59:3165-70.
- Schwartzbrod L, Lucena L y Finance C. Étude quantitative de la pollution virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires. *J Fr Hydrol* 1979; 10:7-20.
- Melnick JL. Viruses in Water. En: Melnick JL, editor. *Monographs in Virology*, 15. Nueva York: Karger Basel; 1984. p. 1-16.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J y Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish:

- human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9):3376-82.
17. Lees D. Viruses in bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 2000; 59:81-116.
 18. Rzezutka A y Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:441-53.
 19. Rao VC, Seidel KM, Goyal SM, Metcalf TG y Melnick JL. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids and sediments from Galveston Bay: Survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48:404-9.
 20. Vivier JC, Ehlers MM y Grabow WO. Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Res* 2004; 38:2699-705.
 21. Formiga-Cruz M, Tofino-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK et al. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(12):5990-8.
 22. Lucena F, Schwartzbrod L y Bosch A. The effect of a mass poliomyelitis vaccination program on the occurrence of enterovirus in seawater. *Zentbl Bakteriell Hyg B* 1986; 183:63-9.
 23. Grabow W, Neubrech TE, Holtzhausen CS y Jofre J. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: Excretion by humans and animals. *Water Sci Technol* 1995; 31:223-30.
 24. Formiga-Cruz M, Allard AK, Condén-Hansson AC, Henshilwood K, Hermroth BE, Jofre J et al. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(3):1556-63.
 25. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F y Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol* 2001; 75(21):10290-9.
 26. Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F y Ferre V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 2004; 155(1):11-115.
 27. Nadan S, Walter JE, Grabow WO, Mitchell DK y Taylor MB. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(2):747-53.
 28. Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N et al. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 2001; 152(2):179-86.
 29. Moce-Llivina L, Jofre J, Mendez X, Akkelidou D, Lucena F y Papageorgiou GT. Counting cytopathogenic virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. *J Virol Methods* 2002; 102(1-2):83-92.
 30. Moce-Llivina L, Lucena F y Jofre J. Double-layer plaque assay for quantification of enteroviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(5):2801-5.
 31. Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J y Girones R. Genetic analysis of the hepatitis A virus strains recovered from the environment and from acute hepatitis patients. *J Gen Virol* 2001; 82:2955-63.
 32. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardí R, Martín M, Bofill-Mas S et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(4):448-54.
 33. Laverick MA, Wyn-Jones AP y Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* 2004; 39(2):127-36.
 34. Mehnert DU y Stewien E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(1):140-3.
 35. Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM y Bosch A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(7):3919-23.
 36. Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV et al. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:7484-9.
 37. Del Valle L, Gordon J, Assimakopoulou M, Enam S, Geddes JF, Varakis JN et al. Detection of JC Virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-Antigen in Tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 2001; 61:4287-93.

38. Enam S, Del Valle L, Lara C, Gan DD, Ortiz-Hidalgo C, Palazzo JP y Khalili K. Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res* 2002; 62(23):7093-101.
39. Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschke-witsch CF y Stoner GL. Asian genotypes of JC virus in native Americans and in a Pacific island population: Markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14542-6.
40. Berger JR, Kaszovita B, Donovan PJ y Dickinson G. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus. *Infection Ann Intern Med* 1987; 107:78-87.
41. Gangarosa RE, Glass RI, Lew JF y Boeing JR. Hospitalizations involving gastroenteritis in the United States, 1985: the special burden of the disease among the elderly. *Am J Epidemiol* 1992; 135:281-90.
42. World Health Organization. Report of WHO Scientific Group of human viruses in water, wastewater and soil. Technical Report Series. Geneva World Health Organization; 1979:639.
43. Bofill-Mas S, Pina S y Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(1):238-45.
44. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G y Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(8):2963-70.
45. Sobsey MD y Jones BL. Concentración of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl Environ Microbiol* 1979; 37:588-95.
46. Sinton LW, Finlay RK y Reid AJ. A simple membrane filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100-ml water samples. *J Microbiol Meth* 1996; 25:257-69.
47. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CJ, Wertheim-van Dillen PME y van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28:495-503.
48. Irving, TE, Louvois J y de Nichols GL. Fact Sheets on Emerging Waterborne Pathogens: Final Report to the Department of the Environment; 2000. Disponible en: www.awwarf.com/newprojects/factsheets.html.
49. White DO y Fenner FJ. Viral syndromes. En: White DO y Fenner FJ, editores. *Medical Virology*. San Diego: Academic Press; 994. p. 563-90.
50. Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W y van Duynhoven Y. Molecular Epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000; 181:S262-S69.
51. Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negrodo A et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and Epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004; 363:682-8.
52. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D y Monroe S. Foodborne Viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:187-205.
53. Seymour IJ, Appleton H. Foodborne viruses and fresh produce. *J Appl Microbiol* 2001; 91:759-73.
54. Schlauder GG y Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001; 65: 282-92.
55. Kwo PY, Schlauder GG, Carpenter HA, Murphy PJ, Rosenblatt JE, Dawson GJ Mast et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 1997; 72:1133-6.
56. Zanetti AR, Schlauder GG, Ramano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ et al. Hepatitis E virus in patients with acute non-A-C hepatitis in Italy. *J Med Virol* 1999; 57: 356-60.
57. Schlauder GS, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC y Mushahwar, IK. Novel Hepatitis E virus (VHE) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of VHE. *J Med Virol* 1999; 57: 243-51.
58. Mast EE y Krawczynski K. Hepatitis E: an overview. *Annu Rev. Med.* 1996; 47: 257-66.
59. Emerson UE y Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2003; 13: 145-54.
60. Meng XJ. Swine Hepatitis E virus: Cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; 278: 185-216.
61. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J and Girones R. VHE identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000; 33: 826-33.

62. Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 331-5.
63. Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol Res* 2003; 27: 1-5.
64. Usui R, Kobayashi E, Takahashi M, Nishizawa T y Okamoto H. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 2004; 32 (1): 57-8.
65. Hirano M, Ding X, Tran HTT, Li TC, Takeda N, Sata T et al. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 8-11.
66. Sonada H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deers and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 5371-4.
67. Worm HC, van der Poel WH y Brandstätter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect* 2002; 4: 657-66.
68. Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat* 1997; 4: 155-65.
69. Buti M, Clemente-Casares P, Jardi R, Formiga-Cruz M, Schaper M, Valdes A, et al. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* 2004; 41(1):126-31.
70. Vaidya SR, Chitambar, SD y Arankalle VA. Polymerase Chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* 2002; 37: 131-6.
71. Vaidya SR, Tilekar BN, Walimbe AM y Arankalle VA. Increased risk of hepatitis E in sewage workers from India. *J Occup Environ Med*, 2003; 45: 1167-70.
72. Ceylan A, Ertem M, Ilcin E y Ozekinci T. A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 753-6.
73. Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Major EO, Curfman B y Girones R. Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. *J Neurovirol* 2003; 9(4):498-507.
74. Brodsky JL y Pipas JM. Polyomavirus T antigens: Molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol* 1998; 72(7):5329-34.
75. Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE et al. JC virus DNA sequences are frequently present in human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterol* 2000; 119:1228-35.
76. Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A et al. Induction of chromosomal instability in colonic cells by the human polyomavirus JC virus. *Cancer Res* 2003; 63(21):7256-62.
77. Kitamura T, Satoh K, Tominaga T, Taguchi F, Tajima A, Suzuki K et al. Alteration in the JC polyomavirus genome is enhanced in immunosuppressed renal transplant patients. *Virology* 1994; 198:341-5.
78. Taguchi F, Kajioaka J y Miyamura T. Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiol Immunol* 1982; 26(11):1057-64.
79. Gardner SD. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK). *BMJ* 1973; 1:77-8.
80. Padgett BL y Walker DL. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1973; 127:467-70.
81. Jensen PN y Major EO. A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. *J Neurovirol* 2001; 7:280-7.
82. Walker DL y Padgett BL. The epidemiology of human polyomaviruses, En: Sever JL y Madden DL, editores. *Polyomaviruses and Human Neurological Disease*. Nueva York: Alan R Liss; 1983. p. 99-106.
83. Knowles WA. The epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. En: Khalili K y Stoner GL, editores. *Human polyomaviruses, molecular and clinical perspectives*. Nueva York: Willey-Liss, Inc; 2001. p. 45-53.
84. Shah KV, Daniel RW, Strickler HD y Goedert JJ. Investigation of human urine for genomic sequences of the primate polyomaviruses simian virus 40, BK virus, and JC virus. *J Infect Dis* 1997; 176(6):1618-21.

85. Markowitz RB, Thompson HC, Mueller JF, Cohen JA y Dynan WS. Incidence of BK virus and JC virus viruria in human immunodeficiency virus-infected and uninfected subjects. *J Infect Dis* 1993; 167:13-20.
86. Maluquer de Motes C, Clemente-Casares, P, Hundsda A, Martín M y Girones R. Detection of bovine and porcine adenovirus in fecal and environmental samples. *App Environ Microbiol* 2003; 70:1448-1454.
87. Liu W, Tang F, Fontanet A, Zhan L, Zhao QM, Zhang PH et al. Long-term SARS Coronavirus Excretion from Patient Cohort, China. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1841-1843.