
VIRUS ENTÉRICOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS: MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN Y DETECCIÓN

MEYBE SAAVEDRA, CERRAF TOVAR
y WALTER Q. BETANCOURT

RESUMEN

Los virus entéricos humanos han sido reconocidos mundialmente como agentes infecciosos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas a través del agua. La detección de estos patógenos en ambientes acuáticos es por ello extremadamente importante con el fin de salvaguardar la salud pública. Los métodos disponibles hoy en día para la detección de virus transmitidos a través del agua incluyen tres pasos básicos: concentración a través de filtración por membrana, concentración secundaria a través de centrifugación y detección a través de cultivo celular y métodos moleculares. Nuevas estrategias para

la concentración de partículas virales y avances en los métodos de detección molecular han revelado nuevos virus, así como virus emergentes que pueden transmitirse a través del agua. A pesar de que el cultivo celular sigue siendo la técnica estándar para aislar virus patógenos en aguas, los ensayos de amplificación molecular cuantitativa están siendo frecuentemente aplicados para detectar virus entéricos cultivables y no cultivables. Las ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y métodos alternativos de detección son discutidas en este artículo.

Los virus entéricos (VE) son agentes causales de numerosas enfermedades en humanos, entre ellas las gastroenteritis virales que ocurren como resultado de la transmisión oral-fecal de partículas virales infecciosas que excretan con las heces los individuos infectados. La transmisión oral-fecal de virus puede ocurrir de forma directa a través del contacto humano-humano o indirecta, a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados con virus. Los VE comúnmente asociados con enfermedad en humanos pertenecen a las familias *Adenoviridae* (*Adenovirus*), *Caliciviridae* (*Norovirus*, *Sapovirus*), *Picornaviridae* (*Enterovirus*, virus hepatitis A y *Echovirus*), *Reoviridae* (*Reovirus* y *Rotavirus*), y *Astroviridae* (*Astrovirus*). Estos virus infectan las células del

tracto gastrointestinal de su hospedero humano y allí se multiplican por replicación viral. Los VE son particularmente abundantes en las aguas residuales urbanas, como resultado de la elevada excreción de partículas virales con las heces (10^5 - 10^{11} partículas virales por gramo de heces). Debido a la alta especificidad de hospedero que tienen los VE humanos, la detección de estos virus en ambientes acuáticos permite determinar de manera inequívoca que existe contaminación fecal de origen humano (Farthing, 1989; Moe, 2002; Fong y Lipp, 2005; Carter, 2005; Schwab, 2007).

Además de las gastroenteritis virales, muchos VE son agentes causales de infecciones respiratorias, conjuntivitis, meningitis aséptica, encefalitis y enfermedades crónicas tales como la miocarditis

(Mena, 2007; Roda Husman y Bartram, 2007; Schwab, 2007). Recientemente se han reportado (Oh *et al.*, 2006; Hino y Miyata, 2007; Reynolds, 2010; Giordano *et al.*, 2011) nuevos VE y algunos virus emergentes asociados con enfermedades gastrointestinales (*Picobirnavirus* de la familia *Picobirnaviridae* y *Aichi virus* de la familia *Picornaviridae*), enfermedades del sistema nervioso central (*Parechovirus* de la familia *Picornaviridae*), así como afecciones pulmonares y hepáticas (*Torque Teno Virus* de la familia *Anelloviridae*). Hay además evidencia sobre la acelerada tasa de mutación que ocurre en los virus ARN, lo cual les permite cambios y adaptaciones para atravesar la barrera de especies y causar coinfecciones en animales y humanos, tal como ocurre con la transmisión zoonótica del virus de la hepatitis E en-

PALABRAS CLAVE / Aguas / Detección / VE /

Recibido: 29/06/2011. Modificado: 06/03/2012. Aceptado: 12/03/2012.

Meybe C. Saavedra. Licenciada en Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela (UCV). Bioanalista, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Venezuela.

Cerraf Tovar. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Biólogo, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Caracas, Venezuela.

Walter Q. Betancourt. Ph.D. en Ciencias Marinas, University of South Florida, EEUU. Investigador, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Dirección: Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular. IVIC, Apartado Postal 20632. Caracas, Venezuela 1020A. e-mail: wbetanco@ivic.gob.ve

tre humanos y cerdos (Huffman *et al.*, 2003). En este sentido, los reservorios animales complican los esfuerzos dirigidos a controlar la diseminación de las infecciones virales, incrementando el potencial para la formación de nuevas cepas mutantes (Reynolds, 2010). La Tabla I muestra los principales virus humanos transmitidos a través del agua y las enfermedades que ocasionan en los humanos.

Transmisión de Virus Entéricos a través del Agua

Los VE pueden ocasionar enfermedades cuando son ingeridos en dosis infecciosas bajas, de allí la relevancia que tienen para la salud pública (Roda Husman y Bartram, 2007). Se estima que la probabilidad de infección con rotavirus en humanos susceptibles (niños menores de 5 años) es del 31% y solo se requiere una partícula viral o unidad formadora de placa (1 PFU) para causar infección (Haas *et al.*, 1999; Mena, 2007). Los VE han sido detectados e implicados como agentes causales de brotes epidémicos ocurridos por ingestión de aguas de distribución contaminadas, por contacto e ingestión de aguas contaminadas durante las actividades recreacionales (ríos, lagos, ambientes marino costeros) y por ingestión de invertebrados marinos cultivados en aguas contaminadas con VE (Fong y Lipp, 2005). Las aguas residuales urbanas constituyen la mayor fuente de contaminación viral de las aguas superficiales y subterráneas (Gerba, 2007). Tanto los niveles como la diversidad de virus presentes en aguas residuales urbanas están asociados con la carga de enfermedades infecciosas en la población, los patrones estacionales de enfermedades infecciosas en la comunidad y la disponibilidad de tratamientos para las aguas de desecho (Roda Husman y Bartram 2007, Betancourt *et al.*, 2010).

Dos características relevantes de los VE son la prolongada supervivencia en los ambientes acuáticos (estabilidad ambiental) y la resistencia a los procesos de tratamiento (Haas *et al.*, 1999). Estos virus son capaces de persistir por largo tiempo en aguas marinas, lo cual incrementa la probabilidad de exposición humana por contacto recreacional y por ingestión de organismos marinos comestibles que han acumulado virus patógenos de aguas contaminadas. El virus de hepatitis A (VHA) ha sido identificado como uno de los VE capaces de sobrevivir por largo tiempo en ambientes acuáticos (Gerba, 2007). De igual manera los norovirus humanos han sido identificados como los agentes causales de gastroenteritis virales con una alta estabilidad en el ambiente y resistencia a los procesos de desinfección, lo cual facilita tanto la prevalencia como la transmisión de estos virus en las comunida-

TABLA I
VIRUS TRANSMITIDOS A TRAVÉS DEL AGUA Y LOS EFECTOS ASOCIADOS CON LA SALUD HUMANA*

Virus	Efecto en la salud humana
Adenovirus	Gastroenteritis, infecciones respiratorias, infecciones oculares, intususcepción, asma, obesidad, meningoencefalitis, cistitis hemorrágica
Astrovirus	Gastroenteritis
Virus BK y JC	Cistitis hemorrágica, Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (PML)
Enterovirus	
Coxsackievirus	Gastroenteritis, infecciones respiratorias, meningitis aséptica, miocarditis, encefalitis
Ecovirus	Gastroenteritis infecciones respiratorias, meningitis aséptica, miocarditis
Poliovirus	Meningitis aséptica, parálisis
Virus hepatitis A	Hepatitis infecciosa
Virus hepatitis E	Hepatitis infecciosa
Virus JC	Enfermedad renal
Norovirus	Gastroenteritis
Reovirus	Infecciones respiratorias, gastroenteritis
Rotavirus	Gastroenteritis

* Adaptado de Mena (2007).

TABLA II
FACTORES QUE AFECTAN LA SUPERVIVENCIA DE VE EN AMBIENTES ACUÁTICOS*

Temperatura	Probablemente el factor más importante, mayor supervivencia a temperaturas más bajas
Luz	La luz ultravioleta en la radiación solar puede causar daños en el ácido nucleico causando la formación de dímeros
pH	La mayoría de los virus son estables a valores de pH encontrados en ambientes acuáticos
Sales	Algunos virus están protegidos contra la inactivación térmica por la presencia de ciertos cationes
Materia orgánica	La presencia de aguas residuales con frecuencia contribuye con la supervivencia
Sólidos suspendidos o sedimentos	La asociación de los virus con los sólidos prolonga la supervivencia
Interfaces aire-agua	Los virus con mayor hidrofobicidad son más propensos a ser atraídos a las interfaces aire agua donde puede ocurrir desnaturalización de la cápside
Factores biológicos	La microflora acuática es usualmente antagonica

* Adaptado de Gerba (2007).

des (Hutson *et al.*, 2004). Todo lo anterior permite explicar el potencial de transmisión de VE a través de las aguas recreacionales contaminadas y aguas de distribución inadecuadamente tratadas. Los principales factores que controlan la supervivencia de los VE en ambientes acuáticos se sintetizan en la Tabla II.

Estudio de Virus Entéricos en Ambientes Acuáticos

El análisis de VE en ambientes acuáticos es de importancia para la salud pública y sirve varios propósitos: i) investigar la incidencia y comportamiento de virus en aguas, ii) determinar la presencia de virus y el riesgo de infección, iii) evaluar

la eficiencia de tratamiento y procesos de desinfección, y iv) monitoreo rutinario de calidad de aguas para determinar su adecuación a los estándares de calidad de aguas (Grabow, 2007).

Los pasos generales que se siguen para el análisis virológico de aguas comprenden: i) aplicación de métodos de concentración (filtración y centrifugación) para recuperar los virus presentes en aguas, ii) detección de los virus recuperados (métodos moleculares e inmunoensayos), y iii) verificación de la infectividad por cultivo celular para determinar los riesgos de salud pública.

Para evaluar los riesgos de exposición a VE en aguas es entonces fundamental estudiar la concentración de estos

virus en los cuerpos de agua naturales (marinos y dulceacuícolas) y la reducción e inactivación de virus a través de los procesos de tratamiento de aguas residuales y aguas para la distribución. Se requiere además determinar el volumen de agua ingerida, la frecuencia y duración de la exposición (Haas *et al.*, 1999; Mena, 2007). Estos aspectos son específicos para cada región y están relacionados con las condiciones sanitarias prevalentes en las diferentes municipalidades que la conforma. Mientras mayor sea el nivel de contaminación ambiental es también mayor el riesgo de exposición humana a virus patógenos entéricos (Roda Husman y Bartram, 2007; Springthorpe y Sattar, 2007). A continuación se describen los métodos disponibles para el estudio de VE en aguas.

Métodos de Concentración

La concentración de partículas virales en aguas utilizando filtración por membrana ha sido uno de los métodos ampliamente utilizados para el estudio de virus. Estos métodos de concentración han sido adaptados de acuerdo a las propiedades físicas y químicas de los virus, como lo son la carga iónica, el tamaño de la partícula viral, la densidad y el coeficiente de sedimentación (Wyn-Jones, 2007).

Los métodos más comúnmente aplicados en los pasos de concentración inicial están basados en los principios de adsorción-elución utilizando filtros electropositivos o electronegativos (APHA, 2005) y filtros de lana de vidrio sodocálcica (Vilagines *et al.*, 1993; Lambertini *et al.*, 2008). Los virus son adsorbidos mediante fuerzas de atracción electrostática a la matriz de filtración bajo condiciones específicas de pH y fuerza iónica. Los filtros de membrana de acetato o nitrato de celulosa son los más utilizados y están disponibles en diferentes tamaños de poro (0,45; 1,2 o 5µm) y configuraciones (47, 142 y 270mm de diámetro).

Los ensayos de eficiencia de recuperación (EER) utilizando estos tipos de filtros han demostrado las ventajas y desventajas de sus aplicaciones para la concentración de VE en aguas (Katayama *et al.*, 2002; Wyn-Jones, 2007). Estos ensayos están basados en la siembra de virus en muestras de agua para el posterior procesamiento de tales muestras como controles positivos, a fin de determinar el porcentaje de recuperación de las partículas virales siguiendo los pasos correspondientes de concentración, detección y cuantificación. Cuando se utilizan filtros electronegativos se requiere ajustar el pH del agua a 3,5 y añadir soluciones con iones Al^{3+} o Mg^{2+} con el fin de maximizar la atracción electrostática entre los virus y la matriz de filtración. Los filtros electropositivos no requieren el paso

de acondicionamiento previo del agua; sin embargo, la eficiencia de recuperación de virus con este tipo de filtros se ve afectada debido a los materiales orgánicos y turbidez presentes en los cuerpos de agua naturales (Fong y Lipp, 2005). En estas situaciones, sobre todo cuando se requiere concentrar VE de aguas marinas, se recomienda (Griffin *et al.*, 2003) utilizar filtros de cartucho electronegativos tales como el Filterite DFN 0.45-10UN (Filterite/MEMTEC A. Corp., Timonium, Md, EEUU). Recientemente se desarrolló un método sencillo, práctico y de bajo costo para la recuperación de adenovirus de aguas marinas (Calgua *et al.*, 2008). Este método involucra la adsorción de virus a proteínas pre-floculadas de leche desnatada, lo cual permite la sedimentación de los flocúlos por gravedad, seguido por la disolución del sedimento separado en una solución tampón.

El filtro 1 MDS Viroorb (CUNO Inc., Meriden, CT, EEUU) es uno de los filtros electropositivos de tipo cartucho más utilizados para la concentración de VE a partir de grandes volúmenes de aguas dulceacuícolas y aguas para distribución (APHA, 2005; Fong y Lipp, 2005; Sedmak *et al.*, 2005); sin embargo, es elevada la inversión de tiempo y costo requeridos para filtrar grandes volúmenes de agua con los filtros 1 MDS. Existen sistemas de filtración alternativos que han sido desarrollados para la concentración inicial de VE en ambientes acuáticos, entre ellos la ultrafiltración a través de flujo tangencial (FFT) y la ultrafiltración a través de fibras huecas (Dziewulski y Belfort, 1983; Olszewski *et al.*, 2005; Rajal *et al.*, 2007). Estos sistemas de filtración han demostrado ser efectivos para la concentración inicial de virus, a pesar de su elevado costo inicial de inversión (Gibson y Schwab, 2011). Sin embargo, los gastos recurrentes para el análisis virológico de aguas son relativamente mínimos. La ultrafiltración por flujo tangencial y la de fibra hueca difieren en su aplicación de acuerdo al volumen de agua que puede ser filtrado y a los niveles de virus esperados en los ambientes acuáticos. En estos sistemas se emplean membranas con un tamaño del poro $\leq 0,05\mu m$ o con un límite de peso molecular nominal $\leq 100KD$. La ultrafiltración solo permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular, excluyendo los virus y macromoléculas que son luego concentrados en la membrana o fibra hueca (Wyn-Jones, 2007). Ambos sistemas han sido utilizados para el análisis virológico de aguas superficiales marinas (Breitbart *et al.*, 2002) y dulceacuícolas, incluyendo aguas potabilizadas (Hill *et al.*, 2007; Peláez *et al.*, 2010; Gibson y Schwab, 2011). En estos sistemas no se requiere el acondicionamiento previo del agua, a diferencia de lo que sucede en los procesos de adsorción-elución. Por ello la ultra-

filtración ha permitido recuperar virus que son susceptibles a cambios de pH de la muestra, no obstante la eficiencia de recuperación es también variable a pesar de ser mayor con respecto a los otros sistemas de filtración.

Luego de la concentración inicial de virus se requiere un paso de concentración secundaria, el cual es precedido en los procesos de adsorción-elución por el tratamiento de la matriz de filtración con solución amortiguada de extracto de carne y glicina a pH de 9,0. Durante este proceso de elución de virus con fluidos proteínicos se reduce el pH a 3,5-4,5 lo que ocasiona la coagulación isoelectrica de las proteínas o floculación. Los virus quedan adsorbidos al flocúlo y se sedimentan luego por centrifugación (USEPA, 2001; APHA, 2005). De manera similar, para la concentración secundaria de virus se ha utilizado la separación en dos fases utilizando glicol polietileno y cloruro de sodio. También las columnas concentradoras de proteínas son empleadas para concentrar virus por ultrafiltración rápida con centrifugación utilizando el Centriprep YM-50 o el Amicon Ultra-15, ambos disponibles comercialmente (Katayama *et al.*, 2002). En el caso del virus de la hepatitis A se cuenta además con un procedimiento de separación inmunomagnética que ha sido utilizado con éxito para la concentración secundaria de partículas virales a partir de muestras ambientales (Jothikumar *et al.*, 1998).

La ultracentrifugación es otro método de concentración secundaria que sigue al paso de floculación-centrifugación y permite concentrar los virus en un volumen de muestra apropiado (1-5ml) para los pasos subsiguientes de detección por cultivo celular o por métodos moleculares. La ultracentrifugación es también ampliamente utilizada como método de concentración primaria para recuperar múltiples VE a partir de aguas muy contaminadas, tales como las aguas residuales domésticas, donde es posible encontrar un mayor número y variedad de estos virus utilizando muestras $<50ml$ (Pina *et al.*, 1998; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2009; Alcalá *et al.*, 2010; Betancourt *et al.*, 2010; Fumian *et al.*, 2010).

Métodos de Detección

Los métodos de amplificación molecular han sido ampliamente utilizados para la detección de VE humanos en ambientes acuáticos. La aplicación de estos métodos requiere pasos previos de extracción y purificación de los ácidos nucleicos (ADN/ARN) virales, lo cual es fundamental para lograr la sensibilidad de detección requerida considerando el número relativamente bajo de partículas virales presentes en aguas de distribución, aguas superficiales y

subterráneas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y la transcripción reversa seguida por PCR convencional (RT-PCR) ofrecen sensibilidad y especificidad de detección de virus en aguas. Además, estos métodos suministran información rápida sobre los genotipos de VE humanos frecuentemente encontrados en ambientes acuáticos de diferentes regiones geográficas y permiten detectar e identificar aquellos virus que no pueden ser cultivados o que son capaces de multiplicarse en líneas celulares sin producir efecto citopático identificable (Fong y Lipp, 2005; Wyn-Jones, 2007; Bosch *et al.*, 2008; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2009; Betancourt *et al.*, 2010). De manera similar, los métodos basados en inmunoensayos (tinción con inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia) permiten la detección de tales virus (Wyn-Jones, 2007).

La técnica de PCR cuantitativo (qPCR) con colorantes fluorescentes intercalantes de ADN (SYBR Green), sondas TaqMan o sondas oligonucleótidos específicas de secuencias (*molecular beacons*) permiten incrementar la sensibilidad de detección y cuantificar los niveles de genomas de virus presentes en ambientes acuáticos (Donaldson *et al.* 2002; Yates y Chen, 2003; Jothikumar *et al.*, 2005; Albinana-Gimenez *et al.*, 2009). Estos métodos ofrecen la ventaja de que pueden ser automatizados con fines aún más prácticos (Girones *et al.*, 2010). Sin embargo, los métodos moleculares son capaces de detectar virus infecciosos y virus inactivos, lo cual impide evaluar de manera confiable los riesgos de salud pública asociados con virus en ambientes acuáticos. Recientemente se ha incorporado el colorante intercalante propidium monoazide (PMA) para distinguir entre VE infecciosos y no infecciosos aislados de muestras de agua (Parshionikar *et al.*, 2010). Los resultados de estos estudios indican que el tratamiento con PMA no interfiere con la detección de virus infecciosos, mientras que sí interfiere con la detección de virus no infecciosos o inactivados mediante tratamientos específicos.

La aplicación de métodos moleculares para la detección de virus en aguas requiere de manera imperativa la inclusión de controles negativos y positivos apropiados, además de controles positivos internos para monitorear la presencia de factores inhibitorios de la reacción de amplificación. Este último aspecto es muy importante en muestras ambientales donde los niveles bajos de carga viral pueden permanecer ocultos durante el análisis, lo que puede conducir a reportar resultados falsos negativos (Gibson y Schwab, 2011).

El método de amplificación isotérmica basada en secuencias de ácidos nucleicos o NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*; Cook, 2003) es un método desarrollado para la amplificación

rápida de regiones específicas de ácidos nucleicos (ARN o ADN). Este método es especialmente apropiado para la amplificación de ARN y de ahí su aplicabilidad para la detección de genomas virales en muestras ambientales. El método emplea una temperatura uniforme (41°C), cebadores complementarios a la secuencia de ARN de interés y tres enzimas (transcriptasa reversa, RNaseH y ARN polimerasa T7) que actúan de manera concertada para amplificar secuencias genómicas a partir de un templado ARN de cadena sencilla. Durante el proceso se forma una hebra complementaria de ADN (ADNc), la cual es luego separada por digestión enzimática del ARN para luego generar a partir del ADNc una copia de la secuencia original de doble cadena. Este último es transcrito por la ARN polimerasa T7 para generar miles de transcritos de ARN de cadena sencilla, incrementándose de esta manera la sensibilidad de detección.

Se considera que para la detección de VE por el método NASBA es necesario trabajar sobre los pasos de concentración iniciales, principalmente los pasos de extracción de ARN, con el fin de maximizar la extracción y disminuir las interferencias presentes en muestras ambientales (Cook, 2003; Girones *et al.*, 2010).

El cultivo celular continua siendo la técnica principal o estándar para el aislamiento de virus infecciosos de ambientes acuáticos (Wyn-Jones, 2007). La línea celular de riñón de mono Búfalo verde (BGMK) ha sido ampliamente utilizada en programas de monitoreo a gran escala (USEPA, 1995). El método de cultivo celular permite detectar virus infecciosos en base a la expresión de efecto citopático viral y permite además cuantificar el número de partículas virales infecciosas siguiendo el método del número más probable de virus totales cultivables (TCVA-MPN, de *total culturable virus assay-most-probable number*). Los métodos de cultivo pueden tomar 2-4 semanas para suministrar la información pertinente. Numerosas líneas celulares son además recomendadas para el aislamiento de VE de aguas debido a la variabilidad en cuanto a la sensibilidad de cada línea celular a los múltiples VE. Algunos grupos virales, tales como los norovirus humanos, no han podido ser cultivados en líneas celulares, mientras que otros como los adenovirus entéricos tipos 40 y 41 no son capaces de producir efecto citopático durante su ciclo de replicación en células BGMK (Chapron *et al.*, 2000). Para la detección de este último grupo de virus en ambientes acuáticos se emplean el ensayo en placas con las líneas celulares A549 y Graham, o el cultivo celular combinado con la detección de ARN mensajero (ARNm) usando transcripción reversa seguida de amplificación molecular (RT-PCR; Ko *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2009). La

combinación de células BGMK con otras líneas celulares tales como células de carcinoma de colon humano (Caco-2) y células primarias de carcinoma hepático (PLC/PRF/5) han sido también recomendadas para el aislamiento y detección de adenovirus, virus coxsackie A, ecovirus y astrovirus, así como otros VE que no se replican efectivamente en células BGMK (Sedmak *et al.*, 2005). Con el fin de superar múltiples limitaciones asociadas con el cultivo celular se recurrió entonces a integrar el cultivo celular con la PCR para detectar y caracterizar virus infecciosos aislados de ambientes acuáticos, como se menciona anteriormente para los adenovirus entéricos humanos. Estos métodos integrados ofrecen mayor rapidez y sensibilidad para detectar y confirmar la presencia de VE infecciosos en muestras de agua (Reynolds *et al.*, 1997; Greening *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008). Los procedimientos integrados de cultivo celular con PCR y cultivo celular seguido de RT-PCR permiten además excluir la amplificación molecular de virus inactivos o no infecciosos; sin embargo, la confiabilidad y capacidad de detección de VE depende del grupo de cebadores utilizados en la mezcla de reacción (Lee y Jeong, 2004).

Conclusión

Los métodos de concentración y detección de virus entéricos en ambientes acuáticos han evolucionado enormemente; sin embargo, en la actualidad no existe un método estandarizado para la detección de todos los VE que pueden estar presentes en estos ambientes. La presencia de VE en aguas está bien documentada en diversos países, donde además se ha establecido la importancia que reviste el estudio directo de virus patógenos para establecer los riesgos para la salud pública, considerando que los indicadores de calidad sanitaria de las aguas (coliformes fecales, *Escherichia coli*) no son adecuados para determinar la presencia de virus.

Los procedimientos de ultrafiltración tangencial y de fibra hueca permiten incrementar el volumen de muestra de agua que puede ser procesado para concentrar VE presentes en aguas superficiales y aguas tratadas mediante procesos convencionales (floculación-sedimentación, filtración, cloración) destinadas para la distribución. La aplicación de estos métodos en combinación con PCR cuantitativo (qPCR) y su integración con el cultivo celular, representa una herramienta útil para la detección y cuantificación rápida y precisa de genomas virales y virus infecciosos en aguas, respectivamente. Estos procedimientos pueden cumplir un papel muy importante en los programas de monitoreo dirigidos a determinar la eficiencia de re-

moción de virus patógenos a través de los procesos de tratamiento de aguas de desecho y aguas para distribución a la población. Asimismo, la aplicación de estos métodos es sumamente útil para generar una base de datos sobre la distribución de numerosos VE en ambientes acuáticos en diferentes regiones geográficas, tanto para uso recreacional como para la distribución, y de esta manera poder comparar la ecología de estos agentes patógenos. Adicionalmente, se pueden establecer programas de manejo y control apropiados para proteger la salud pública y los ambientes acuáticos, dado que las aguas residuales urbanas inadecuadamente tratadas o no tratadas transportan numerosos agentes patógenos y constituyen una de las principales fuentes de degradación ambiental.

En Venezuela se requiere llevar a cabo estudios de calidad virológica de aguas junto con los programas regulares de monitoreo aplicados para evaluar la calidad sanitaria de las aguas recreacionales y aguas para distribución (crudas y tratadas). La estandarización de los métodos de detección de VE en aguas a cargo de varios laboratorios especializados en el país facilitaría la implementación de un programa de monitoreo a gran escala. Establecer estudios interdisciplinarios que involucren profesionales de la salud (médicos, bioanalistas) de ingeniería sanitaria y microbiólogos (clínicos y ambientales) junto con la participación de la población general haría posible elucidar el papel que juega el agua en la transmisión de VE en el país. El propósito fundamental es minimizar los riesgos de exposición a microorganismos patógenos en el ambiente.

REFERENCIAS

- Albinana-Giménez N, Miagostovich MP, Calgua B, Huguet JM (2009) Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Wat. Res.* 43: 2011-2019.
- Alcalá A, Vizzi E, Rodríguez-Díaz J, Zambrano JL, Betancourt W, Liprandi F (2010) Molecular detection and characterization of Aichi viruses in sewage-polluted waters of Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 76: 4113-4115.
- APHA (2005) 9510 C. Virus concentration from large sample volumes by adsorption to and elution from microporous filters. En Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE (Eds.) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation Publication. APHA, Washington, DC, EEUU. pp. 9-141, 9-145.
- Betancourt WQ, Querales L, Sulbaran YF, Rodríguez-Díaz J, Caraballo L, Pujol FH (2010) Molecular characterization of sewage-borne pathogens and detection of sewage markers in an urban stream in Caracas, Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 2023-2026
- Bosch A, Guix S, Sano D, Pinto RM (2008) New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 295-301.
- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F (2002) Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *PNAS.* 99: 14250-14255.
- Carter MJ (2005) Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1354-1380.
- Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Masa S, Clemente-Casaresa P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pilab JM, Girones R (2008) Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Meth.* 153: 79-83.
- Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB (2000) Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the Information Collection Rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 2520-2525.
- Cook N (2003) The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* 53: 165-174.
- Donaldson KA, Griffin DW, Paul JH (2002) Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Res.* 36: 2505-2514.
- Dziewulski DM, Belfort G (1983) Virus concentration from water using high-rate tangential-flow hollow fiber ultrafiltration. *Wat. Sci. Technol.* 15: 75-89.
- Farthing MJ (1989) Gut viruses: a role in gastrointestinal disease? En Farthing MJ (Ed.) *Viruses and the Gut*. Smith Kline & French, Hertfordshire, RU. pp 1-4.
- Fong TT, Lipp EK (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 357-371.
- Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggeroc A, Cailloud MSL, Miagostovich MP (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J. Virol. Meth.* 170: 42-46.
- Gerba C (2007) Viruses occurrence and survival in the environmental waters. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 91-108.
- Gibson KE, Schwab KJ (2011) Tangential-flow ultrafiltration with integrated inhibition detection for recovery of surrogates and human pathogens from large-volume source water and finished drinking water. *Appl. Env. Microbiol.* 77: 385-391.
- Giordano MO, Martínez LC, Masachessi G, Barril PA, Ferreyra LJ, Isa MB, Valle MC, Massari PU, Nates SV (2011). Evidence of closely related picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina. *J. Infect.* 62: 45-51.
- Girones R, Ferru MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Abreu Correa A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S (2010) Molecular detection of pathogens in water: The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44: 4325-4339.
- Grabow WOK (2007) Overview of health-related water virology. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 1-25.
- Greening GE, Hewitt J, Lewis GD (2002) Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 93: 745-750.
- Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB (2003) Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 129-143.
- Haas CN, Rose JB, Gerba C (1999) Microbial agents and their transmission. En Haas CN, Rose JB, Gerba C (Eds.) *Quantitative Microbial Risk Assessment*. Wiley. Nueva York, EEUU. pp. 18-85.
- Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, Johnson TB (2007) Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 4218-4225.
- Hino S, Miyata, H (2007) Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.* 17: 45-57.
- Huffman D, Quintero-Betancourt W, Rose JB (2003) Emerging waterborne pathogens. En Mara D, Horan N (Eds.) *The Handbook of Water and Wastewater*. Academic Press. Londres, RU. pp. 193-208.
- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK (2004) Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *TRENDS Microbiol.* 12: 279-287.
- Jiang SC, Han J, He JW, Chu W (2009) Evaluation of four cell lines for assays of infectious adenoviruses in water samples. *J. Water Health* 7: 650-656.
- Jothikumar N, Cliver DO, Mariam TW (1998) Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 504-508.
- Jothikumar N, Cromeans TL, Sobsey MD, Robertson BH (2005) Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of Hepatitis A virus. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 3359-3363.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Env. Microbiol.* 68:1033-1039.
- Ko G, Cromeans TL, Sobsey MD (2003) Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 7377-7384.
- Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA (2008) Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 2990-2996.
- Lee HK, Yeong YS (2004) Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl. Env. Microbiol.* 70: 3632-3636.
- Mena KD (2007) Waterborne viruses: assessing the risks. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp.163-175.
- Moe CL (2002) Waterborne transmission of infectious agents. En Hurst CJ (Ed.) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington DC, EEUU. pp. 184-204.
- Oh DY, Silva PA, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso DD, Schreier E (2006) Molecular cha-

- racterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch. Virol.* 151: 1199-1206.
- Olszewski JL, Winona L, Oshima KH (2005) Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. *Can. J. Microbiol.* 51: 295-303.
- Parshionikar S, Laseke I, Fout GS (2010) Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and non-infectious enteric viruses in water samples. *Appl. Env. Microbiol.* 76: 4318-4326.
- Peláez, D, Rodríguez J, Rocha E (2010) Standardization of a method for concentration and detection of enteric viruses from drinking water. *Biomédica* 30: 276-286.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R (1998) Viral pollution in the environment and shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 3376-3382.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 41: 1411-1422.
- Reynolds KA (2010) Evidence of novel waterborne parechoviruses associated with US infant deaths. Water purification and conditioning. www.wcponline.com/pdf/1003OnTap.pdf
- Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL (1997) Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. *Water Sci. Technol.* 35: 423-427.
- Roda Husman AM, Bartram J (2007) Global supply of virus-safe drinking water. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 127-162.
- Rodríguez RA, Gundy PM, Gerba CP (2008) Comparison of BGM and PLC/PRC/5 cell lines for total culturable viral assay of treated sewage. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 2583-2587.
- Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, Betancourt WQ (2009) Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 75: 387-394.
- Sedmak G, Bina D, Macdonald J, Couillard L (2005) Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a wastewater treatment plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Appl. Env. Microbiol.* 71: 1042-1050.
- Schwab K (2007) Waterborne gastroenteritis viruses. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 27-38.
- Springthorpe S, Sattar S (2007) Virus removal during drinking water treatment. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 109-126.
- USEPA (1995) *Virus Monitoring Protocol for the Information Collection Requirements Rule*. Publication EPA/814-B-95-002. United States Environmental Protection Agency. Government Printing Office, Cincinnati, OH, EEUU.
- USEPA (2001) *Manual of Methods for Virology*. Publication EPA 600/4-84/013 (N14). Office of Research and Development. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC, EEUU.
- Vilagines P, Sarrette B, Husson G, Vilagines R (1993). Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Sci. Technol.* 27: 299-306.
- Wyn-Jones P (2007) The detection of waterborne viruses. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 177-204.
- Yates MV, Chen W (2003) Development of a rapid, sensitive, and quantitative method to detect infective hepatitis, a virus in water. Technical Completion Reports (University of California Water Resources Center) N° W-932. Berkeley, CA, EEUU. 17 pp.

WATERBORNE ENTERIC VIRUSES: CONCENTRATION AND DETECTION METHODS

Meybe Saavedra, Cerraf Tovar and Walter Q. Betancourt

SUMMARY

Human enteric viruses have been recognized as major infectious agents involved in numerous waterborne outbreaks worldwide. Detection of these pathogens in aquatic environments is therefore extremely important to safeguard public health. Current approaches for detection of waterborne enteric viruses involve three basic steps: primary concentration through membrane filtration, secondary concentration through centrifugation, and detection through molecular and cell culture methods. New strategies for concentration of viral particles and improve-

ments in molecular detection methods have revealed not only the most frequent genotypes involved in human disease but also new and emerging waterborne viruses. Although the cell culture assay is the gold standard for isolation of waterborne infectious viruses, new quantitative molecular amplification assays are being more frequently used for detection of cultivable and non-cultivable enteric viruses. The advantages and disadvantages of current and alternative detection methods are discussed in this paper.

VÍRUS ENTERICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS: MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO

Meybe Saavedra, Cerraf Tovar e Walter Q. Betancourt

RESUMO

Os vírus entéricos humanos têm sido reconhecidos mundialmente como agentes infecciosos envolvidos em surtos de doenças transmissíveis através da água. A detecção de estes agentes patogênicos em ambientes aquáticos é, portanto, extremamente importante, a fim de salvaguardar a saúde pública. Os métodos que estão disponíveis hoje para a detecção de vírus transmitidos através da água envolvem três etapas básicas: concentração através de filtração por membrana, concentração secundária por centrifugação e detecção através de cultura celular e métodos moleculares. Novas estratégias para a concentração de

partículas virais e os avanços nos métodos de detecção molecular têm revelado novos vírus, bem como os vírus emergentes que pode ser transmitido pela água. A pesar do facto de que a cultura de células continua a técnica padrão para isolar vírus patogênicos nas águas, novos testes de amplificação molecular quantitativos são muitas vezes aplicados para detectar os vírus que podem ser cultivados e aqueles que não podem ser cultivados. As vantagens e desvantagens dos actuais métodos e os métodos alternativos de detecção são discutidos no presente artigo.