

## **Enterovirus detected by PCR in the effluent of a treatment system to be employed in irrigation. Preliminary study**

**Sabina Guastadisegni<sup>1</sup>, Leticia Porto<sup>2</sup>, Diana Callejas<sup>2</sup>  
y Ligia Botero<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias, Telfax 061-428184. E-mail: ligiabotero@cantv.net

<sup>2</sup>Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, Facultad de Medicina.

<sup>3</sup>Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

### **Abstract**

It was studied, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, the presence of enteroviruses in the final effluent of a system of stabilization lagoons for treatment of water that will be employed in irrigation. Enteroviruses were determined in 11 of 20 samples. The presence of enteroviruses in the final effluent ratifies the necessity of evaluation of these treatment systems, with the purpose of guaranteeing the quality of the water.

**Key words:** Enteroviruses, PCR, wastewater, stabilization lagoons.

## **Presencia de enterovirus detectados por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el efluente de un sistema de tratamiento a ser empleado en irrigación. Estudio preliminar**

### **Resumen**

Se estudió mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de enterovirus en el efluente final de un sistema de lagunas de estabilización para tratamiento de agua que va a ser empleada en irrigación de plantas ornamentales y árboles frutales. Los resultados obtenidos demostraron presencia de enterovirus en 11 de las 20 muestras procesadas. Estos resultados plantean la necesidad de la evaluación constante del funcionamiento de estos sistemas con el fin de garantizar la calidad del agua.

**Palabras clave:** Enterovirus, PCR, aguas residuales, lagunas de estabilización.

### **Introducción**

La utilización de aguas residuales tratadas en actividades de irrigación, es una excelente alternativa para el resguardo del agua potable, además de que proporciona una fuente de agua económica y produce mayor rendimiento de las cosechas [1]. El reuso de aguas residuales ha sido practicado en muchas partes del mundo durante siglos, pero en los últi-

mos años se ha venido incrementando, debido entre otras causas, a que se ha sentido la necesidad de optimizar el manejo de los recursos hídricos de acuerdo a las prioridades de la sociedad; hoy en día, existe una mayor conciencia de que los reservorios de agua deben ser protegidos de descargas de efluentes no tratados, que pueden presentar altas concentraciones de nutrientes y patógenos.

Las aguas residuales portan un alto número de microorganismos que son patógenos para el humano [2, 3]. Cuando se piensa reutilizar el agua con fines agrícolas, el estudio de los patógenos debe ser uno de los objetivos más importantes debido al riesgo que representa para la salud humana su presencia en el agua [4]. Los virus son uno de los tipos de microorganismos que representan mayor riesgo cuando están presentes en el agua residual [5- 7], entre los virus que producen mayor preocupación desde el punto de vista de salud pública humana están los virus RNA asociados al agua, que se multiplican en el tracto gastrointestinal, que se excretan en la materia fecal y que se denominan virus entéricos humanos. La ruta de transmisión de estos virus es fecal-oral, lo que significa que pueden causar enfermedades cuando un organismo susceptible ingiere agua o comida contaminada con material fecal [8].

Los virus causan diversos tipos de enfermedades: parálisis, meningitis, infecciones respiratorias, vómitos y diarreas epidémicas, miocarditis, anomalías cardíacas congénitas, hepatitis infecciosa e infecciones oculares [9].

El método que tradicionalmente se ha empleado para aislar virus entéricos del agua ha sido el cultivo celular, el cual es técnicamente difícil de realizar, consume mucho tiempo y es costoso [10-12]. Recientemente, se han desarrollado técnicas en biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica es un método *in vitro* que amplifica secuencias específicas de ácido nucleico mediante el empleo de una polimerasa, lo que permite determinar en forma rápida, la presencia de virus en muestras ambientales [5, 6, 13-15].

Debido a la ausencia de datos en nuestro país sobre la presencia de virus en aguas residuales empleadas en irrigación y a que se requiere disponer de técnicas con un alto grado de sensibilidad que permitan detectar virus en el medio ambiente para prevenir daños a la salud pública, se realizó este trabajo con el fin de optimizar un ensayo rápido y relativamente simple y económico, que pueda ser usado para la determinación de contaminación viral en el agua. Adicionalmente, se determinó en algunas de las muestras, la presencia de los coliformes termotolerantes (antes denominados fecales) considera-

dos indicadores tradicionales de contaminación microbiológica [16] y se relacionó su presencia con la de los virus.

## Parte Experimental

### Área de estudio

Este estudio fue realizado en el Sistema A de las Lagunas de Estabilización del Centro de Investigaciones del Agua de la Facultad de Ingeniería. Este sistema piloto está conformado por tres series de lagunas (A-C), con una secuencia de tres facultativas y seis de maduración. El agua que ingresa al sistema proviene del colector C de Hidrolago, el cual recolecta las aguas de las áreas residenciales del norte de la ciudad de Maracaibo y de la Ciudad Universitaria (Universidad del Zulia) [17].

### Toma de muestras

Se recolectaron 20 muestras de 100 mL de agua, en recipientes de vidrio estériles, para la determinación de enterovirus. A 10 de las mismas muestras, se les determinó también el NMP/100 mL de coliformes termotolerantes.

### Procesamiento de las muestras

**Recuperación de partículas virales y extracción de ácidos nucleicos:** Las muestras fueron procesadas siguiendo el procedimiento descrito por Pina y col. [6]. 40 mL de la muestra de agua fueron ultracentrifugados (229.600 x g por 1 Hora a 4°C) para sedimentar todas las partículas virales junto a cualquier material en suspensión. El sedimento fue mezclado con 5 mL de glicina 0,25 N (pH 9,5) en hielo por 30 minutos y los sólidos suspendidos fueron separados por centrifugación (12.000 x g por 15 minutos a 4°C), luego se adicionó 5 mL de solución de fosfato (PBS 2X) y los virus fueron concentrados por ultracentrifugación (229.600 x g por 1 Hora a 4°C), resuspendidos en 0,1 mL de PBS 1X y guardados a -80°C.

Los ácidos nucleicos fueron extraídos siguiendo el método de Boom y col. [18], con las modificaciones propuestas por Puig y col. [14]. La suspensión de ácidos nucleicos se guardó a -20°C, hasta la realización de la retrotranscripción.

**Primers:** Los primers que se utilizaron, se derivan de la secuencia conservada de la región 5'

Tabla 1  
Primers utilizados para realizar la amplificación de Enterovirus mediante PCR

Tipo de Virus	Posición	Nombre del primer	Tamaño del amplificado	Secuencia nucleotídica
CV B4 (5'NTR)	64-83 <sup>c</sup>	Ent 1	540 pb	5'CGGTACCTTTGTACGCCTGT 3'
Polio 1 (5'NTR)	578-597 <sup>c</sup>	Ent 2	540 pb	5'ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'

no codificada del genoma de los enterovirus y fueron propuestos por Puig y col. [14], Las secuencias (Tabla 1), especificidad y sensibilidad de ellos han sido descritos anteriormente [13, 14].

**Retrotranscripción:** 10 µL de la mezcla de reacción para la retrotranscripción contenía 5 µL de ácidos nucleicos extraídos, solución para PCR 10X (Perkin Elmer Roche, Inc.) que incluía 100 mM de Tris HCl (pH 8,3 a 25°C), 500 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dinucleótidos trifosfatados y el primer Ent 2. La mezcla de reacción fue incubada a 95°C por 5 minutos antes de la adición de 50 U de Transcriptasa reversa (Promega, Madison, USA) y 10 U de Inhibidor de RNasa (Promega). La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C.

**Amplificación enzimática:** Se prepararon 50 µL de una mezcla de reacción que contenía: Solución para PCR (10X); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dinucleótidos trifosfatados; 0,15 µM de primer Ent 1 y 2 U de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer). La reacción se realizó empleando un termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer). El primer ciclo de denaturalización se realizó a 94°C durante 4 minutos. Las condiciones para la amplificación fueron: denaturalización a 94°C por 90 seg, anillamiento a 55°C por 90 seg y extensión a 72°C por 120 seg. Estos ciclos se repitieron 30 veces, finalizando a 4°C.

**Visualización del amplificado:** 12 µL del producto amplificado fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (SIGMA) al 2%, que contenía 4% de Bromuro de Etidio. La corrida electroforética fue fotografiada bajo luz ultravioleta.

**Control de calidad del método de amplificación:** La preparación de las mezclas de reacción, la extracción de los ácidos nucleicos y la manipulación de los productos amplificados se realizaron en áreas separadas para reducir las posibilidades de contaminación. Las muestras

fueron procesadas en grupos y por cada grupo se empleó un control positivo (Poliovirus Vacunal) y un control negativo (que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del ácido nucleico viral; en su lugar se añadió el volumen correspondiente de agua bidestilada estéril, libre de RNAsas (SIGMA)).

**Estudio de bacterias indicadoras:** La cuantificación de los coliformes termotolerantes, se realizó mediante la técnica del Número más Probable (NMP/100mL) [19].

## Resultados y Discusión

El resultado de este estudio, en el cual se empleó la técnica de PCR para determinar la presencia de enterovirus en muestras de agua del efluente de un sistema de lagunas de estabilización que van a ser empleadas en irrigación, demostró la presencia de enterovirus en 11 de las 20 (55%) muestras de agua provenientes del efluente del sistema A de las lagunas de estabilización (Tabla 2). En la Figura 1 se puede observar algunas muestras representativas de la visualización del genoma de enterovirus después de la electroforesis.

La presencia de enterovirus en el 55% de las muestras del efluente final está dentro del rango de los valores que se han publicado [25]. Estos resultados ratifican la necesidad del monitoreo de los sistemas de tratamiento, con el fin de garantizar la calidad del agua que va a ser empleada en irrigación, ya que los virus, como se ha demostrado, pueden sobrevivir a diversos tratamientos, producir síntomas clínicos si son ingeridos por un huésped susceptible [20] y se requiere solo de una pequeña cantidad de ellos (1-10 partículas) para iniciar una enfermedad en los humanos [21]. La determinación de la presencia de estos microorganismos en aguas que van a ser empleadas en irrigación es importante, debido al peligro

Tabla 2  
Presencia de genoma viral y NMP/100 mL en las muestras del efluente del sistema A de las lagunas de estabilización

Muestreo N <sup>o</sup>	Presencia de genoma viral	(NMP/100mL) Coliformes termotolerantes
1	+	NSR
2	+	NSR
3	+	NSR
4	-	NSR
5	+	NSR
6	-	NSR
7	-	NSR
8	-	NSR
9	-	NSR
10	-	NSR
11	+	2.0 x10 <sup>3</sup>
12	+	3.0 x10 <sup>4</sup>
13	-	2.0 x10 <sup>3</sup>
14	+	4.0 x10 <sup>3</sup>
15	-	7.0 x10 <sup>3</sup>
16	-	1.3 x10 <sup>4</sup>
17	-	
18	+	9.0 x10 <sup>5</sup>
19	+	
20	+	

+ presencia del genoma viral. - Ausencia del genoma viral. NSR: No se realizó.

que representa para la salud pública el estar expuesto a estos patógenos.

Algunos investigadores [22, 23] han informado de resultados falsos negativos en la técnica de PCR, debido a la presencia de inhibidores en las muestras o a su introducción durante el proceso de concentración que se lleva a cabo antes del procesamiento. Se conoce que las aguas residuales contienen grandes cantidades de materia orgánica y sólidos disueltos; la materia orgánica está constituida por sustancias húmicas, las cuales se pueden adsorber a proteínas o a enzi-



Figura 1. Patrón electroforético del genoma de enterovirus detectados en aguas residuales. La columna de la izquierda contiene el Marcador de peso molecular, con una flecha se señala la banda de interés para el estudio. Las letras C- y C+, denotan los controles negativo y positivo y los números en la parte superior corresponden a las muestras.

mas e interferir química o estereométicamente con el sitio activo de ellas y/o pueden crear enlaces divalentes con cationes de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> evitando de esta manera que estos sean utilizados como cofactores por las enzimas RNAsa, transcriptasa y polimerasa, que intervienen en la PCR [24]. Estas enzimas son muy sensibles a estos contaminantes o a sustancias inhibitoras que están presentes en las muestras ambientales, de esta forma pueden interferir con la detección de virus por esta técnica [20].

Las aguas residuales objeto de este estudio deben contener gran cantidad de compuestos orgánicos presentes en las heces y la orina de animales y humanos residentes de las zonas aledañas al sistema, y también, provenientes de los desechos industriales que son vertidos a esta agua; esto pudiera haber traído como consecuencia, la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras investigadas. También, como se mencionó anteriormente, al llevar a cabo el proceso de concentración de las partículas virales presentes en las muestras, se pudo haber contribuido a la concentración de las sustancias inhibitoras que compiten por los sitios activos de las enzimas que se emplean en la PCR. Por lo anterior, se puede considerar la posibilidad de que se hubieran presentado falsos negativos en esta investigación.

por lo que habrá que analizarse esta situación en estudios posteriores para verificar la presencia o no de sustancias interferentes.

En este estudio se confirmó la importancia de la PCR como técnica que permite en dos días tener resultados que, mediante el empleo de cultivos celulares, tardarían al menos un mes. Toze [25], considera la PCR muy importante, aun cuando no diferencie entre partículas infecciosas y no infecciosas, ya que ofrece una forma de demostrar la presencia de virus que no son detectables por otros métodos.

En este trabajo también se realizó la detección de bacterias indicadoras de contaminación en algunas de las muestras procesadas, con el fin de analizar la asociación que pudiera existir entre los organismos comúnmente utilizados como indicadores de contaminación fecal (Coliformes Termotolerantes) y la presencia de los enterovirus en la salida del sistema de lagunas. Los resultados se observan en la tabla 2. Solo en tres de diez muestreos en los que fue analizada la presencia de estas bacterias en los efluentes de las lagunas, las muestras cumplieron con los requisitos establecidos en la Normativa de la OMS [26], según la cual la cantidad de los organismos Coliformes Termotolerantes (CTT) presentes en el agua que va a ser empleada en irrigación, debe ser menor de 1000 NMP/100 mL. Dos de esas tres muestras resultaron positivas para la presencia de enterovirus, lo que significa que no necesariamente existe asociación entre ausencia de bacterias y de virus. Estos resultados concuerdan con diversas publicaciones [6-8, 25] en las cuales se plantea que los indicadores bacteriológicos de contaminación fecal usados comúnmente como indicadores de contaminación, no pueden ser utilizados para evaluar la calidad virológica del agua.

En conclusión, en este estudio se comprobó mediante la técnica de PC, la presencia de enterovirus en el efluente de un sistema de tratamiento de aguas residuales a ser empleado en irrigación. También se demostró la presencia de los indicadores tradicionales de contaminación microbiológica, bacterias coliformes termotolerantes, en algunas de las muestras procesadas, y se observó que no necesariamente la ausencia de estos indicadores en una muestra, predice la presencia de virus en ella.

## Agradecimientos

Al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

## Referencias Bibliográficas

1. León, G. "Aspectos Generales y Principios Básicos de los Sistemas de Lagunas de Estabilización". <http://www.cepis.org.pe/eswww/fulltext/repind57/sil/sil.html>, 1997.
2. Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y. y Schwartzbrod, L.: Enterovirus Detection from Wastewater by RT-PCR and Cell Culture. *Wat. Sci.Tech* Vol 40, Nº 2 (1999)102-105.
3. Gantzer C., Maul A., Audic J.M. y Schuartzbord L.: Detection of Infectious Enteroviruses, Enterovirus Genomes, Somatic Coliphages and *Bacteroides fragilis* Phages in Treated Wastewater. *Appl. Environ.Microbiol.* Vol 64, Nº 11 (1998) 4307-4312.
4. Moscoso J.: Reuso en Acuicultura de las Aguas Residuales Tratadas en las Lagunas de Estabilización de San Juan, Perú. Sección: Tratamiento de las Aguas Residuales y Aspectos Sanitarios. Programa de Salud Ambiental CEPIS/OPS, Lima Perú. (1991).
5. Abbaszadegan M., Stewart P. y Le Chevallier M.: A Strategy for Detection of Viruses in Groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol 65 Nº 2 (1999) 444-449.
6. 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 and Index of Human Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol, 64 Nº 9 (1998) 3376-3382.
7. Metcalf T.G., Melnick J.L. y Estes M.K.: Environmental Virology: From Detection of Virus in Sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology- A Trip of over 50 years. *Annual Rev. Microbiol.*, Vol 49 Nº 5 (1995) 461-487.
8. Hurts C.J., Knudsen G.R., McInerney J., Stetzenbach D., y Walter V. (ed). *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. 1325 Massachusetts

- Ave, N.W. Washintong, D.C. USA (1996) 176-183.
9. Melnick J.L.: Enteroviruses: Polioviruses, Cosackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. En: B.N.Fields (ed), Virology. Raven Press, New York, USA (1990), 549-605.
  10. Chapron C., Ballester N., Fontaine J., Frades C. y Margolin A.: 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. and environ. Microbiol.* Vol 66 N° 6 (2000) 2520-2525.
  11. 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.* Vol 64 N° 9 (1998) 3376-3382.
  12. De León R. y. Sobsey M.D.: New Method for Virus Detection in Water. En: J.R. Hall and G.D. Glysson (ed.), *Monitoring Water in the 1990's Meeting New Challenges*. Publication. ASTM STP 1102, Philadelphia, USA. (1995) 400-421.
  13. Girones, R., Puig, M., Allard, A., Lucena, F and Wadell, G. Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Water. Sci. Technol*, Vol 31 N° 3 (1995) 351-357.
  14. 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.* Vol 60 N° 8 (1994) 2963-2970.
  15. Le Guyader F., Menard D., Pommepuy M., y Kopecka, H.: Use of RT Seminested PCR to Assess Viral Contamination in Caribbean Rivers (Martinique). *Wat. Sci. Tech*, Vol 31, N° 5-6 (1995) 391-394.
  16. Davies-Colley R. J., Donnison A.M., Speed D.J., Ross C.M. y Nagels J.W.: Inactivation of Faecal Indicator Microorganism in Waste Stabilization Ponds: Interactions of Environmental Factors with Sunlight. *Wat. Res.* Vol 33, N° 5 (1999) 1220-1230.
  17. Botero L., Montiel M., Estrada P., Villalobos M., y Herrera L.: Microorganism Removal in Wastewater Stabilisation Ponds in Maracaibo. *Wat. Sci. Tech.* Vol 35 N° 11-12(1997) 205-209.
  18. Boom R., Sol. C.J.A, Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen D.M.F. y Van Der Noordaa, J.: Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol*, Vol 28 N° (1990) 495-503.
  19. American Public Health Association.. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19<sup>th</sup> ed. APHA. Washington. D.C. 1995.
  20. Abbaszadegan M., Huber M., Gerba C., y Pepper I.: Detection of Enteroviruses in Groundwater with the Polimerase Chain Reaction. *Appl Environ. Microbiol.* Vol 59 N° 5 (1993)1318-1324.
  21. Vantarakis C.A. y Papapetropoulou M.: Detection of Enteroviruses and Adenoviruses in Coastal Waters of SW Greece by Nested Polymerase Chain Reaction. *Wat. Res*, Vol 32 N° 8 (1998) 2365-2372.
  22. Abbaszadegan M., Steward, P.y LeChevalier M.: A Strategy for Detection of Viruses in Groundwater by PCR. *Appl Environ. Microbiol.* Vol 65 N° 2 (1999)444-449.
  23. Wyer M. D., Fleisher J. M., Cough J., y Merret H.: An Investigation Into Parametric Relationship Between Enterovirus and Faecal Indicator Microorganism in the Coastal Waters of England and Wales. *Wat. Res*, Vol 29 N° 8 (1995)1863-1868.
  24. Schwab K.J., DeLeón R. y Sobsey M.: Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for the Detection of Enteroviruses, Hepatitis A Virus, and Norwalk Virus by Reverse Transcription-PCR. *Appl/ Environ. Microbio.* Vol 61 N° 2 (1995) 531-537.
  25. Toze S.: PCR and the Detection of Microbial Pathogens in Water and Wastewater. *Water Res*, Vol 33 N° 17 (1999) 3545-3556.
  26. OMS. Organización Mundial de la Salud. WHO Guidelines and National Standards for Reuse and Water Quality. *Wat. Res.* Vol 28 N° 1 (1994)119-124.

Recibido el 20 de Enero de 2001

En forma revisada el 12 de Marzo de 2002