

Detección del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41 y bacteriófagos en agua para consumo humano

Mariángela Bracho G.^{1*}, Vilisa Morón¹, Mariángel Luzardo¹, Marinés Montiel²
y Ligia Botero¹

¹Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones del Agua, Facultad de Ingeniería. ²Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 08/11/07 Aceptado: 08/07/08

Resumen

La importancia del agua en la transmisión de virus entéricos y su potencial riesgo para la salud ha quedado mundialmente demostrada por una gran cantidad de brotes de enfermedades ocasionadas por el consumo de agua contaminada por estos agentes virales. En este trabajo se evaluó la presencia del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41, bacteriófagos y organismos indicadores de contaminación (OIC) en muestras de agua para consumo humano de la ciudad de Maracaibo. Los virus fueron detectados por la técnica de RT-PCR. La concentración de bacteriófagos somáticos de *E. coli* C, F-específicos y OIC se evaluó por técnicas estándares. Como resultado se observó que el 12,1% de las muestras fueron positivas para la presencia del virus de la hepatitis A, el 4,87% presentó adenovirus 40 y 41 y el 35,6%, bacteriófagos de *E coli* C y F+ en concentraciones comprendidas entre 0,2 y 2,4 UFP/100 mL. El 82,9% de las muestras presentaron valores de OIC por encima de lo establecido en la normativa venezolana para la calidad del agua de consumo, por lo que no eran aptas para el consumo humano. En el 17,1% de las muestras que sí cumplían la normativa se detectó la presencia del virus de la hepatitis A (21,4%), adenovirus 40 y 41 (21,4%) y bacteriófagos (42,8%), lo que implica un riesgo para la salud pública y pone en evidencia la necesidad de la validación de los procesos de tratamiento y potabilización del agua para consumo, en términos de su eficacia en la remoción de virus, así como la necesidad del monitoreo periódico de la calidad virológica del agua que es consumida por la población.

Palabras claves: virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41, bacteriófagos, agua para el consumo humano.

Hepatitis A virus, adenovirus 40 - 41 and bacteriophages in water for human consumption

Abstract

The importance of water in enteric viruses' transmission and its potential health risk has been demonstrated in a large number of outbreaks caused by the consumption of water contaminated by these viral agents. This study evaluated the presence of hepatitis A virus, adenovirus 40 and 41, bacteriophages and fecal indicator organism (OIC) in drinking water samples

* Autor para la correspondencia. Fax: 58-261-7597182. E-mail: mariangela.bracho@gmail.com.

from Maracaibo city. Viruses were detected by RT-PCR. The concentration of somatic bacteriophages *E. coli* C, F-specific bacteriophage and OIC was assessed by standard techniques. As a result it was observed that 12.1% of the samples were positive for the presence of hepatitis A virus and 4.87% for adenovirus 40 - 41. 35.6% of the samples had *E. coli* C and F+ bacteriophages in concentrations ranging from 0.2 to 2.4 PFU/100 mL. 17.1% of the samples analyzed were safe for human consumption according to the drinking water venezuelan legislation. However, in 21.4% and 42.8% the presence of hepatitis A virus, adenovirus 40- 41 and bacteriophages was demonstrated. The results obtained in this work demonstrated that the consumption of the water without any additional treatment implying a risk for the public health and highlight the need for the periodic monitoring of the virological quality of the water that is consumed by the population.

Key words: hepatitis A virus, adenovirus 40 y 41, bacteriophages, water for human consumption.

Introducción

La situación de la disponibilidad y acceso al agua para consumo humano en la Región Zuliana es crítica y es un problema que se ha venido agravando con los años, al punto de que el Ejecutivo regional, luego de haber aplicado varios planes de racionamiento, se ha visto en la necesidad de emitir en varias oportunidades decretos de alerta ante la intensa escasez de agua que sufren los municipios San Francisco, Jesús Enrique Lossada, Mara, Miranda y Maracaibo (1). Pero los problemas del servicio de agua en la región no se restringen únicamente a la falta de agua, sino también a su calidad, como lo demuestran los elevados índices de ocurrencia de enfermedades consideradas de transmisión hídrica que se presentan mensualmente en la zona, como gastroenteritis, diarreas y hepatitis infecciosas, siendo las enfermedades diarreicas las de mayor prevalencia y la tercera causa de muerte infantil en el Estado (2).

A nivel mundial la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por el agua han estado relacionados con la presencia en esta de virus entéricos capaces de causar infección, los cuales han mostrado una alta resistencia a los tratamientos de desinfección y potabilización del agua, así como a condiciones extremas de pH, tempe-

ratura y humedad, todo lo cual ha contribuido a su persistencia en el medio ambiente acuático (3).

En Venezuela, durante los últimos años, los índices de hepatitis virales se han mantenido elevados, con una incidencia de más de 1.336 casos para el primer trimestre del año 2007 (2). Sin embargo, hasta ahora no existen reportes sobre la evaluación y detección del agente causal en el agua para consumo humano.

Otro virus ampliamente reportado como causante de gastroenteritis por consumo de agua contaminada en todo el mundo es el adenovirus, específicamente sus serotipos entéricos 40 y 41, los cuales han sido reconocidos como uno de los agentes etiológicos más importantes que causan diarreas en niños, y se cree que a nivel mundial es el principal responsable de los casos de gastroenteritis transmitidos por el agua en los que no se ha podido identificar el agente causal (4).

En los últimos años, el estudio de los virus de la hepatitis A y adenovirus entéricos en muestras ambientales estuvo limitado debido a que estos agentes no se propagan adecuadamente en las líneas celulares humanas comúnmente empleadas para la propagación de los otros serotipos de adenovirus. Sin embargo, recientemente y gracias al desarrollo de las técnicas de biología mole-

cular ha sido posible llevar a cabo su diagnóstico en muestras de agua a través de la detección del genoma viral mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (5).

Tomando en consideración que en Maracaibo se presentan elevados índices de diarreas, hepatitis infecciosas y otras enfermedades debidas al agua y asociadas con ella, esta investigación se propuso con el fin de llevar a cabo un estudio diagnóstico de la presencia del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41, y bacteriófagos en el agua para consumo humano, y determinar si la sola vigilancia de los coliformes es suficiente para evaluar la calidad microbiológica del agua.

Materiales y métodos

Área de estudio

Se colectaron un total de 82 muestras de agua para consumo humano en el período comprendido entre los meses de noviembre de 2006 y febrero de 2007 en diferentes casas y apartamentos ubicados en los municipios Maracaibo y San Francisco, directamente de la salida de los grifos o de los tanques de almacenamiento.

Toma de muestras

Para la determinación de bacteriófagos de *E. coli* y virus entéricos, las muestras de 20 L de agua fueron colectadas en las residencias en bidones previamente desinfectados, de acuerdo con técnicas estándares (6), y fueron transportadas al laboratorio para su inmediata filtración.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron filtradas mediante una bomba de succión por la cual se dejaron pasar los 20 L de agua a través de un filtro electropositivo tipo membrana (Zetaplus, CUNO-Meriden). Durante la filtración se mantuvo una velocidad de flujo de entre 1 y 2 L/min. Una vez filtrada el agua, los filtros se colocaron en bolsas de cierre hermético indivi-

duales dentro de una cava con hielo para su procesamiento inmediato.

Análisis virológico

La elusión de las partículas virales se llevó a cabo haciendo pasar por el filtro, con ayuda de una bomba de succión, 50 mL de solución eluente (glicina 5 N pH 9,5). Para la reconcentración de las partículas virales se ajustó el pH del eluente a 3,5 con HCl 1N agitando durante 30 minutos. Se centrifugó la muestra a 16.000 X g por 10 minutos a 4 °C en un rotor tipo 19 de una centrífuga tipo Beckman L7. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 30 mL de fosfato disódico 1M pH 9,5 y la muestra fue guardada a -70 °C hasta su posterior utilización en la determinación de bacteriófagos y virus entéricos (7).

La extracción del genoma de los virus de la hepatitis A y adenovirus 40 y 41 de las muestras concentradas se llevó a cabo mediante las técnicas de extracción de ARN con Trizol®LS (Gibco BRL, NY, USA) y de extracción de ADN con tiocianato de guanidina y partículas de silica, respectivamente (8).

La detección de los genomas virales se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, siguiendo las indicaciones del Kit Access PCR System (A1250, Promega Corp., Madison, WI, USA) utilizando primers específicos (9) (tabla 1).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAMP®PCR System 24000 (Perkin Elmer) de acuerdo con el siguiente programa: 1. Retrotranscripción (solo para el virus de la hepatitis A): 42 °C durante 30 minutos y luego 95 °C por 5 minutos; 2. Amplificación de la secuencia blanco (PCR): 30 ciclos a 92 °C durante 90 segundos, 55 °C por 90 segundos y 72 °C por dos minutos; 3. Extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Como controles positivos de la reacción de PCR se utilizaron concentrados de los virus de la hepatitis A y adenovirus 40 y 41 gentilmente suministrados por el Laboratorio de Virología Ambiental de la Universidad

Tabla 1
Oligonucleótidos primers utilizados para la detección del virus de la hepatitis A y adenovirus 40 y 41 mediante PCR.

Virus	Posición	Primer	Secuencia	Producto
Hepatitis A ^(a)	332-352	HAV1	5'- CAAATTATGACAGAATCCTTC- 3'	368
	680-700	HAV2	5'- GAGAAATATGACATGGATTGC- 3'	
Adenovirus 40 y 41 ^(a)	18858-18883	AD 40	5'- GCCGCAGTGGTCTTACATGCACAATC- 3'	301
	19136-19158	AD 41	5'- CAGCACGCCGCGGGCTGTCAAAGT- 3'	

^a Tomado de Pina y col., 1998 (9).

de Tucson, Arizona (Estados Unidos). Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Promega Corp., Madison, WI, USA). La presencia de falsos negativos se descartó mediante inoculación y reamplificación de las muestras con los controles positivos correspondientes, comprobando así la ausencia de posibles inhibidores de la reacción de PCR en las muestras negativas.

Los productos obtenidos en la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% en buffer Tris-Borato EDTA (TBE) y 0,5 µg/µL de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 50 mA de corriente y a un voltaje de 100 V por 60 minutos. Una vez culminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador UV Pro. Como marcador de peso molecular se empleó el marcador de 1 Kb DNA plus de Promega (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Detección de bacteriófagos de *E. coli* C y F+

Para la detección de los bacteriófagos somáticos de *E. coli* C se empleó como hospedador la cepa de *E. coli* ATCC 15597, y para la determinación de los bacteriófagos de *E. coli* F+, la cepa ATCC 700891.

La determinación de los bacteriófagos de *E. coli* C se realizó siguiendo el procedimiento 9211 D de la American Public Health Association (APHA) (10) y la de los bacteriófagos de *E. coli* F+ por la técnica de capa simple propuesta por la EPA (6), en ambos casos

partiendo de 1 mL del concentrado de partículas virales.

La presencia de los fagos se evidenció por la aparición de zonas claras o placas de lisis bacteriana en el agar, las cuales se contaron y reportaron como Unidades Formadoras de Placas (UFP) en 100 mL de muestra. En cada ensayo de bacteriófagos se incluyó un control positivo que consistió en una muestra de agua residual previamente ensayada para verificar su positividad, y como control negativo, solución salina fisiológica (0,85% NaCl).

Análisis bacteriológico

El análisis de la presencia de los indicadores bacterianos se llevó a cabo siguiendo los procedimientos: 9222 para coliformes totales y termotolerantes, y 9215 para mesófilos aerobios de la APHA, utilizando filtros de membrana de ésteres de celulosa (GN-6 Metricel™, Gelman Sciences) de 0,45 µm de diámetro del poro (10).

Resultados y discusión

De las 82 muestras analizadas para la ocurrencia del genoma de virus entéricos, 14 (17%) fueron positivas, como se evidencia en la tabla 2. De estas, en 10 (12,19%) se detectó la presencia del virus de la hepatitis A, y en 4 (4,87%), la de adenovirus 40 y 41.

El porcentaje de contaminación viral encontrado en este estudio puede considerarse elevado si se compara con otros estu-

Tabla 2
Análisis microbiológico de las muestras de agua para consumo humano.

Parámetro	Virus entéricos		Bacteriófagos (a)		Indicadores bacterianos (b)		
	Hepatitis A	Adenovirus 40 y 41	<i>E. coli</i> C	<i>E. coli</i> F+	Het	CT	CTT
% muestras positivas	12,19	4,87	35,6	35,6	100	43,9	25,6
Rango	NA	NA	2x10 ⁻¹ - 2,4x10 ⁰	2x10 ⁻¹ - 3,2x10 ⁰	1 - 222	4 - 332	1 - 46
Media geométrica ^c	NA	NA	1,1 x 10 ⁰	1,2 x 10 ⁰	53,68	115	14,2

^a Valor reportado en UFP/100 mL. ^b Valor reportado en UFC/100 mL. ^c Valor calculado sin incluir las muestras negativas. Het = heterótrofos, CT = coliformes totales, CTT = coliformes termotolerantes, NA= no aplica.

dios llevados a cabo en diferentes países, en los cuales los porcentajes de contaminación viral en muestras de agua para consumo humano alcanzan un valor máximo promedio del 5-10% (11, 12, 13). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo solo indican la presencia de contaminación viral y no su concentración, dada la baja dosis infecciosa en la que estos virus pueden causar infección (1 partícula viral infecciosa), sin duda los resultados ponen en evidencia que el consumo de esta agua sin ningún tratamiento adicional en el hogar, como filtración o hervor, puede significar un riesgo para la salud (14).

La presencia del virus de la hepatitis A en las muestras de agua para consumo humano analizadas es preocupante, considerando que a nivel mundial la contaminación de las fuentes de agua para consumo ha sido frecuentemente reportada como la primera causa de la aparición de brotes de hepatitis infecciosa (14).

En Venezuela los índices de hepatitis A se han mantenido elevados, con una incidencia de 14.085 casos para el año 2005, 7.205 casos para el año 2006 y 1.336 casos para el primer trimestre del año 2007 (2). Sin embargo, hasta ahora no se había realizado la detección del agente causal en el agua para consumo, por lo que los resulta-

dos obtenidos en esta investigación constituyen el primer indicio del papel del agua como agente causal de una porción importante de los casos de hepatitis A que en nuestro país se presentan anualmente.

La importancia de la detección de adenovirus entéricos en agua para consumo y el riesgo que esto representa para la salud de la personas ha sido reconocida mundialmente en diversas oportunidades. Al respecto se ha estimado que alrededor de 5 a 10 millones de niños mueren cada año en países en vías de desarrollo a causa de enfermedades diarreicas, la mayoría de las cuales son causadas por agentes virales (4). La evidencia epidemiológica indica que los adenovirus entéricos constituyen uno de los principales agentes aislados de muestras de heces en los niños que presentan gastroenteritis virales a nivel mundial (5).

Adicionalmente, es preciso destacar que muchos otros tipos de virus, además del virus de la hepatitis A y de los adenovirus entéricos, pudieran estar presentes en las muestras analizadas en este estudio, tal es el caso de virus como los enterovirus y calicivirus, los cuales ya han sido detectados con anterioridad en el agua para consumo humano de la ciudad de Maracaibo (15).

La presencia de virus en las muestras de agua estudiadas indica que estos micro-

organismos son capaces de sobrevivir a los tratamientos y procesos de desinfección que se emplean en la potabilización del agua o que estos pudieron penetrar al sistema debido a fallas en el proceso de distribución, a través de válvulas y casquillos con fugas, tuberías maestras reparadas o el sifonaje de retorno (16).

Determinación de la concentración de bacteriófagos de *E. coli* C y F+

La tabla 2 muestra los resultados de UFP/100 mL obtenidos para la detección de bacteriófagos de *E. coli* C y F+ en las muestras de agua para consumo humano analizadas. Se demostró la presencia de bacteriófagos en niveles detectables en 29 de 82 (35,6 %) del total de las muestras analizadas, con valores en el rango comprendido entre 2×10^{-1} y $3,2 \times 10$ UFP/100 mL.

El porcentaje de positividad para la presencia de bacteriófagos detectado en este estudio es notablemente superior al reportado en investigaciones previas llevadas a cabo en otros países. Al respecto, Fujioka y Joneyama (17) reportan porcentajes de positividad para la presencia de colifagos en el 3,12% de las muestras de agua destinadas al consumo humano en Honolulu, Hawái. Por su parte, Doherty y col. (18) detectaron la presencia de colifagos en el 1,42% de las muestras monitoreadas en New England, Inglaterra. Así mismo, Borchard y col. (11) detectaron la presencia de colifagos en el 1% de un total de 193 muestras de agua para consumo humano analizadas en Estados Unidos.

La tabla 3 muestra la relación existente entre la presencia/ausencia de bacteriófa-

gos y de virus entéricos en las muestras de agua analizadas. En esta puede observarse que del total de las 82 muestras analizadas 14 fueron positivas para la presencia de virus entéricos y de bacteriófagos, 53 fueron negativas para ambos y 15 fueron positivas para bacteriófagos y negativas para virus entéricos. Estos resultados indican la existencia de una correlación significativa entre la presencia de colifagos y la presencia de virus entéricos, y concuerdan con lo reportado en otras investigaciones a nivel mundial en las que se ha confirmado que los fagos se comportan como buenos indicadores de la presencia de virus en muestras de agua para consumo humano (19).

Análisis bacteriológico

De las 82 muestras analizadas, el 100% fueron positivas para la presencia de organismos heterótrofos y el 43,9% y 25,6% para la presencia de CT y CTT, respectivamente, con un rango que osciló entre 1 y más de 300 UFC/100 mL (tabla 2).

La Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela número 36395 de 1998 (20), que contiene la normativa que rige la calidad del agua potable, establece que el 95% de las muestras de 100 mL de la red de distribución no deberán indicar la presencia de CT y que ninguna debe indicar la presencia de CTT ni la de organismos heterótrofos aerobios en densidades mayores de 100 UFC/100 mL. Por lo tanto, y de acuerdo a esta normativa, 68 (82,9%) de las muestras analizadas incumplen los estándares de calidad del agua y solo 14 (17,1%) son aptas para el consumo humano. Sin em-

Tabla 3
Relación entre la presencia/ausencia de bacteriófagos y virus entéricos.

Tipo de muestra/ Total analizadas	Núm. de muestras	Núm. de muestras que contenían virus entéricos
Positivas para colifagos / 82	29	14 (29)
Negativas para colifagos / 82	53	0 (53)

bargo, en 3 de 14 (21,42%) de estas se detectó la presencia de virus y en 6 de 14 (42,85%), la de bacteriófagos de *E. coli* C y F+. Lo anterior demuestra que la ausencia de indicadores de contaminación fecal no indica necesariamente la ausencia de patógenos en el agua y pone en relieve la importancia de realizar estudios para el monitoreo de virus en las fuentes de agua para consumo humano.

Los resultados obtenidos en esta investigación ponen en evidencia la necesidad de la validación de los procesos de tratamiento y potabilización del agua para consumo, en términos de su eficacia en la remoción de virus, así como la necesidad del monitoreo periódico de la calidad virológica del agua que es consumida por la población.

Conclusiones

Se demuestra la presencia de contaminación por los virus de la hepatitis A y adenovirus 40 y 41 del agua para consumo humano que surte a la ciudad de Maracaibo y el posible papel del agua en la transmisión de hepatitis infecciosa y diarreas, enfermedades con una alta prevalencia en la región.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CondesLUZ), al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Venezuela (Fonacit) y al apoyo logístico del Centro de Investigaciones del Agua de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia.

Referencias bibliográficas

1. ROCHA R. *Diario La Verdad*. Viernes 18 de julio de 2003.
2. MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD DE VENEZUELA. *Boletín epidemiológico regional*. Semanas 49 de 2006 y 10 de 2007. Portal del Ministerio del Poder Popular para la Salud, www.mpps.gob.ve.
3. GHARBI-KHELIFI H., FERRE V., SIDIRI K., BERTHOME M. *J. Viro. Met.* 138: 109-116, 2006.
4. FORMIGA-CRUZ M., HUNDESA A., CLEMENTE-CASARESA P., ALBINANA G., ALLARD A., GIRONES R. *J. Viro. Met.* 125: 111-118, 2005.
5. VAN HEERDEN J., MARTHIE M., EHLERS W., VAN ZYL B., GRABOW O. *Wat. Res.* 37: 3704-3708, 2003.
6. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Fed. Regist.* 67 (9): 1812-1844, 2002.
7. LAKHE S., PAUNIKAR W., PARHAD N. *Wat. Res.* 36: 3298-3306, 2002.
8. BOOM R., SOL C., SALIMANS M., JANSEN C., WERTHEIMVAN-DILLEN P., VAN DER NOORDA J. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503, 1990.
9. PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J., GIRONES R. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9): 3376-3382, 1998.
10. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th edition. APHA, AWWA, WPCF Inc. Washington (USA), 1998.
11. BORCHARDT M., BERTZ P., SPENCER S., BATTIGELLI D. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 1172-1180, 2003.
12. FOUT G., MARTINSON B., MOYER M., DAHLING D. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3158-3164, 2003.
13. MELO V., SALETE V., DINIZ-MENDES L., LAMPE L., COIMBRA G. *J. Viro. Met.* 137: 169-176, 2006.
14. BRASSARD J., SEYERA K., HOUEB A., SIMARDA C., TROTTIERA Y. *J. Viro. Met.* 123: 163-169, 2005.

15. BRACHO M. ¿Existen virus, parásitos y bacterias en el agua para consumo humano de la ciudad de Maracaibo? (Tesis de maestría). Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), 97 pp., 2005.
16. REYNOLDS K. **Agua Latinoamérica**. Mayo/junio, 2003.
17. FUJIOKA R., YONEYAMA B. Vulnerability to pathogens: water quality monitoring and assessment study. Published report to the Honolulu Board of water supply by Hawaii water resource research center. University of Hawaii, Honolulu (USA), 54 pp., 1997.
18. DOHERTY K. "Status of the New England Ground Water Viral Study". In: **American Waters Works Association Annual Meeting**. Dallas, Texas (USA), pp 23-24, 1998.
19. GRABOW W.O. **Water SA**. 27(2): 251-268, 2001.
20. GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA DE VENEZUELA, núm. 36395. "Normas sanitarias de calidad de agua potable", 1998.