

## Detection of viruses in the Lake of Maracaibo

Ligia Botero, Giuliana Molaro, Rosalba Salas\* y Hugo Hernández\*\*

Laboratorio de Virus, Facultad Experimental de Ciencias  
Universidad del Zulia, Maracaibo

\*Departamento de Virus, Instituto Nacional de Higiene, Caracas

\*\*Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina  
Universidad del Zulia, Maracaibo

### Abstract

A methodology for concentrating viruses in water was used in a six month study to detect the presence of enteroviruses in an area of Lake Maracaibo. Concentrated samples were inoculated in BGM, MA-104 and VERO cell lines. The positive isolates for cytopathic effect were analyzed in order to determine the heat stabilization of divalent cations and later identified using a neutralization technique with LB-M serum. The samples analyzed proved 100% positive for enteroviruses. This indicates that the area studied was highly contaminated. Twelve were identified as poliovirus 2 and two as echovirus 21. Six of the samples gave results that do not correspond to any of the neutralizing combinations and two isolates did not neutralize any serum combination.

**Key words:** Virus, enterovirus, lake, estuary, poliovirus, water

## Detección de virus en el Lago de Maracaibo

### Resumen

Se adaptó una metodología para concentrar virus de agua y se estudió la presencia de enterovirus durante seis meses en una zona del Lago de Maracaibo. Las muestras concentradas fueron inoculadas en las líneas celulares BGM, MA-104 y VERO. Los aislamientos positivos para efecto citopático (ECP) fueron analizados para determinar la estabilización al calor por cationes divalentes y posteriormente identificados mediante la técnica de Neutralización usando los sueros LB-M. Las muestras analizadas fueron 100% positivas para presencia de enterovirus. Se identificaron 12 aislamientos como poliovirus 2 y dos como Echovirus 21, indicativo de una alta contaminación de la zona estudiada. Seis de las muestras dieron resultados que no correspondieron a ninguna de las combinaciones de neutralización y dos aislamientos no neutralizaron ninguna combinación de sueros.

**Palabras claves:** Virus, enterovirus, lagos, estuario, poliovirus, agua.

### Introducción

Las aguas de superficie que reciben descargas urbanas son un peligro para la salud pública debido a la presencia de microorganismos patógenos, entre ellos virus, los cuales causan variadas enfermedades que van desde infecciones respiratorias y oculares suaves hasta diarrea, conjuntivitis, gastroenteritis y hepatitis [1,2,3]. Más de 140 tipos de virus diferentes son excretados en las heces de humanos [4]. Entre

ellos los enterovirus: Poliovirus, Coxsackievirus Grupo A (24 tipos) y B (6 tipos), Echovirus (34 tipos), Rotavirus y otros Reovirus, Adenovirus, Agente tipo Norwalk y el virus de la Hepatitis A [5]. Aunque existen algunos factores involucrados en la inactivación de los virus tales como temperatura, salinidad, radiación solar y otros [4,6-10], se ha comprobado la supervivencia de estos microorganismos por períodos largos en condiciones de laboratorio [11] y en el medio ambiente [8,12]. La transmisión de virus, del

agua al huésped susceptible, puede ocurrir por varias vías: ingestión, contacto cuando se baña, nada o rema [13-16].

A nivel mundial son numerosos los reportes que confirman que las personas que nadan en aguas contaminadas con descargas cloacales sufren tasa de enfermedades gastrointestinales significativamente más altas que las personas que no lo hacen o que realizan estas actividades en aguas no contaminadas [14,15]. Esto debido a que durante la natación se puede ingerir de 10 a 50 ml de agua. Los datos disponibles sugieren que una sola dosis infecciosa de virus es capaz de producir enfermedad en el hombre [9].

En la Región Zulia, ubicada en el extremo Nor-occidental de Venezuela, se encuentra el Lago de Maracaibo, con una extensión de 12.013 Km<sup>2</sup>. El lago es una importante fuente de petróleo, de alimentos marinos y es usado para actividades recreacionales por los habitantes de las poblaciones ubicadas a su alrededor. Estas poblaciones, generan gran cantidad de aguas negras las cuales caen al lago. Debido a la importancia que tiene el Lago de Maracaibo, para la región y el país, se consideró oportuno la realización de este trabajo con el fin de evaluar la calidad virológica de este reservorio.

## Metodología Experimental

### Muestreo

Se tomó una muestra semanal durante un periodo de seis meses (Febrero a Junio). Se practicó el muestreo en una zona del lago de Maracaibo ubicada en la Plaza del Buen Maestro de la Ciudad de Maracaibo, mediante el uso de un recipiente de 10 l de capacidad el cual se colocó a 2 m de la costa y a 30 cm de profundidad aproximadamente. Las muestras fueron transportadas inmediatamente sin refrigeración al Laboratorio de Virus de la Facultad Experimental de Ciencias.

### Procesamiento de las muestras

Las muestras se clarificaron a través de gasa estéril. Luego se filtraron usando un filtro de 0.45 µm (tipo cartucho de 25 cm de longitud, de la serie Duo-fine de Filterite) y un filtro AP-20 (tipo membrana de 0.45 µm de Millipore). Se

ajustó el pH a 3.5 con HCl 1N. Posteriormente la muestra fue tratada con 10 ml de AlCl<sub>3</sub> 1M y se filtró a través de una serie de dos membranas (Filterite de 3 y 0.45 µm de poro y de 142 mm de diámetro). Se eluyeron los filtros con 25 ml de extracto de carne al 3% que contenía 0.1 g de glicina pH 9. La elución se repitió dos veces. El eluido se ajustó a pH neutro y se almacenó a -70°C hasta el momento de la inoculación en líneas celulares.

### Sistemas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: riñón de mono Rhesus (MA-104), riñón de mono Verde Africano (BGM) y células embrionarias de riñón de mono Verde Africano (VERO).

### Multiplicación y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares se multiplicaron mediante el empleo de cultivos celulares mantenidos en monocapas a las cuales se les descartó el medio de cultivo y se lavaron por tres veces con 2 ml de solución buffer de fosfato (PBS). Después del lavado, se trataron con 2 ml de una mezcla tripsina-verseno 0.25% (1:1 v/v) durante tres minutos, hasta comprobar al microscopio la caída de la monocapa. Una vez desprendidas las células, se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se resuspendió la suspensión en el medio de cultivo MEM (Difco, Detroit Michigan) hasta lograr una concentración de 250.000 células por ml. Se prepararon monocapas en tubos agregando 2 ml de esta suspensión a tubos de vidrio de 150 x 13 mm, los cuales se taparon e incubaron a 37°C en posición inclinada. Al formarse las monocapas, se cambió el medio de crecimiento por medio de mantenimiento (MEM con 2% de suero fetal).

### Inoculación de las muestras en líneas celulares

Se siguió la metodología descrita por Agbailika y col [17]. Las monocapas de células MA-104, BGM y VERO, se lavaron dos veces con PBS y se inocularon con 0.5 ml de las muestras. Las muestras inoculadas en células MA-104 se trataron previamente con tripsina 100 µg/ml en

PBS justo antes de ser inoculadas. Las monocapas se incubaron a 37°C por 7 y 14 días. A cada muestra se le hicieron dos pases confirmativos en todos los sistemas celulares. Las positivas para efecto citopático (ECP) se guardaron a -70°C.

### **Estabilización al calor por cationes divalentes**

A los cultivos congelados a -70°C (positivos para ECP) se les realizó esta prueba siguiendo el método descrito por Wallis y col [18].

### **Identificación de los aislamientos**

Las muestras positivas para efecto citopático se titularon en células BGM según la técnica de Reed y Muench [19] y se les realizó la prueba de Neutralización con los sueros Lim-Beyesh-Melnick (LBM) [20].

## **Resultados**

La metodología empleada permitió detectar ECP en las 22 muestras de agua que fueron inoculadas en las líneas celulares MA-104 y BGM. En las células VERO sólo tres de las 22 presentaron este efecto. La prueba de estabilización al calor por cationes divalentes, resultó positiva para todos los aislamientos. La prueba de Neutralización detectó la presencia de 12 virus Polio 2 y dos Echovirus 21. Los resultados obtenidos en seis de las muestras no correspondieron a ninguna de las combinaciones de las tablas de LB-M y dos aislamientos no neutralizaron ninguna combinación de sueros. (Tabla 1).

## **Discusión**

Este estudio evalúa la presencia de virus en aguas estuarinas en Venezuela. Los resultados demuestran contaminación viral de las aguas de la zona estudiada, dado que el 100% de las muestras analizadas mostraron efecto citopático compatible con presencia de virus.

Algunos autores han comparado la eficiencia de diferentes líneas celulares para el aislamiento de virus de aguas negras [21-24] y se ha reportado que no existe un sistema único que soporte el aislamiento de diferentes tipos de

virus. Con el fin de incrementar la probabilidad de aislar virus entéricos humanos de muestras ambientales, se ha sugerido utilizar al menos dos diferentes cultivos celulares, debido a la variada capacidad que tienen los virus de multiplicarse en ellos [25]. En este trabajo se emplearon tres líneas celulares. La línea BGM establecida por Barron y col. [26], la cual es ampliamente recomendada por algunos investigadores debido a su alta sensibilidad para recobrar virus de agua. [21,25]; esta línea se ha probado para el aislamiento de virus entéricos humanos de muestras de aguas negras, sedimentos y mariscos [21]. Otra línea celular empleada, fue la MA-104 propuesta para estudios de muestras ambientales, por Agbalika y col [17] debido a que sus estudios demostraron que a pesar de que los aislamientos en MA-104 son menores que en BGM, esta línea permite la multiplicación de mayor número de virus diferentes, es además fácil de manejar y resiste bien los efectos tóxicos. Nuestros resultados confirman la importancia de estas dos líneas celulares para aislamientos de virus de muestras ambientales. En cuanto a la línea celular VERO, ésta se viene empleando desde hace tiempo, pero en este trabajo, se obtuvo un porcentaje muy bajo de aislamientos virales (11%), por lo que no se recomienda su uso para este tipo de muestras.

Los resultados demuestran que la metodología empleada permite no sólo la recuperación de poliovirus, sino también de echovirus 21. También indica que esos virus estaban circulando ampliamente en la población en la época de la toma de muestras [27]. Poliovirus 2 fue el predominante, encontrándose en el 54 % de las muestras. Los poliovirus son fáciles de aislar debido a que se replican en una variedad de líneas celulares [9], por lo tanto son los que con mayor frecuencia se detectan. Nuestro trabajo confirma estos datos. La presencia de Poliovirus 2 en doce de las veintidós muestras podría ser explicado como resultado de la campaña de vacunación contra la poliomielitis que se hacía en el país. Su presencia pudo ser causante de que otros virus no se expresaran ya que se ha demostrado que cuando se encuentran cepas vacunales, se hace difícil el aislamiento de otros virus [25].

Tabla 1  
Efecto citopático en líneas celulares y tipos de virus aislados

Nº de muestra	Líneas Celulares			Tipo de Virus Aislado
	MA-104	BGM	VERO	
1	+	+	+	POLIO 2
2	+	+	+	POLIO 2
3	+	+	+	POLIO 2
4	+	+	-	ECHO 21
5	+	+	-	POLIO 2
6	+	+	-	POLIO 2
7	+	+	-	POLIO 2
8	+	+	-	NI
9	+	+	-	POLIO 2
10	+	+	-	POLIO 2
11	+	+	-	POLIO 2
12	+	+	-	POLIO 2
13	+	+	-	POLIO 2
14	+	+	-	NI
15	+	+	-	NI
16	+	+	-	NI
17	+	+	-	NI
18	+	+	-	ECHO 21
19	+	+	-	NI
20	+	+	-	NI
21	+	+	-	POLIO 2
22	+	+	-	NI

NI: No identificados

El que sólo se hubiera aislado un virus por muestra estudiada, se debió o a la metodología empleada para la concentración de los virus o a que la metodología que se siguió para la siembra de las muestras, inoculación en tubo, permite únicamente la multiplicación de un tipo de virus que puede ser el que esté en mayor concentración o el que se multiplique más rápidamente en el sistema empleado [25].

Los Echovirus son un poco menos fáciles de aislar por las técnicas convencionales [18] y a eso se debe probablemente el que sólo se hubiera aislado en dos de las veintidós muestras procesadas (9%).

Ocho de los aislamientos no pudieron ser identificados por los sueros de neutralización

empleados en este estudio, lo cual significa que no son probablemente enterovirus si no virus entéricos: esto significa que otros virus además de los ya mencionados, estaban presentes pero no pudieron ser identificados por la técnicas empleadas.

Existen diversos reportes [27-36] sobre aislamiento de virus de aguas superficiales que reciben descargas de aguas negras, aun en países en donde estas aguas son tratadas antes de ser descargadas a los cuerpos de agua, encontrándose comúnmente los virus poliovirus, coxsackievirus y echovirus.

Se hace necesario ejercer una actitud vigilante sobre la presencia de virus en este tipo de agua, ya que estos microorganismos pueden ser

causantes de graves problemas de salud pública, para aquellas personas que utilicen estas aguas para sus actividades recreacionales.

### Conclusiones

1- Se demostró la presencia de virus, principalmente enterovirus, en todas las muestras procesadas durante un período de seis meses en una zona del Lago de Maracaibo ubicada en la plaza del Buen Maestro, indicativo de alta contaminación de esta zona.

2- Se estandarizó una metodología que permite el aislamiento de virus de agua recreacionales contaminadas con aguas negras.

3- Se comprobó la eficacia de las líneas celulares MA-104 y BGM para el aislamiento de virus de muestras ambientales.

### Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, (CONDES) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo. Al Sr. Florencio Añez del Instituto de Investigaciones Clínicas por su colaboración en el proceso de concentración de las muestras.

### Referencias Bibliográficas

1. Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick, J. L. Viruses in water: the problem, some solutions. *Environ. Sci. Technol.* 9 (1975), 1122-1126.
2. Gerba, C.P., Rose, J.B. and Singh, S.N. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *CRC Crit. Rev. Environ. Control.* 15 (1985), 213-236.
3. Hejkal, T.W., Keswick, B., Labelle, R.L., Gerba, C.P., Sánchez, G., Dressman, B., Hafkin, B. and Melnick, J.L. Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infections hepatitis. *J. Am. Wat. Wks. Ass.* 74 (1982), 318-321.
4. Jansons, J., Edmins, L.W., Spelght, B. and Bricens, M. Survival of viruses in Groundwater. *Wat. Res.* 23 (1989), 301-306.
5. Melnick, J.L. Enteroviruses. In *Virology*. B. M. Fields and D. M. Knipe (eds). Raven Press. NY. 1990
6. Hurst, C. J. Fate of viruses during wastewater sludge treatment. *CRC. Crit. Rev. Environ. Control.* 18 (1989), 317-343.
7. LaBelle, L.B. and Gerba, C.P. Influence of pH, salinity and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979), 93-101.
8. O'Brien, R.T. and Newman J. S. Inactivation of poliovirus and coxsackievirus in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1977), 403-414.
9. Ward, R.L. and Akim, E. W. Minimum infections dose of animal viruses. *CRC. Crit. Rev. Environ. Control.* 14 (1984), 297-310.
10. Ward, R.L. and Ashley, C.S. Inactivation of poliovirus in digested sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (1975), 921-930.
11. Payment, P., Ayache, R. and Trudel, M. A survey of enteric viruses in domestic sewage. *Can J. Microbiol.* 29 (1983), 111-119.
12. Melnick, J.L. and Gerba, C. P. The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit. Rev. Environ. Control.* 10 (1980), 1065-1093.
13. Berg, O.K., Borshein, Y., Brarbak, G. and Hoidal, M. High Abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* (1989), 467-468.
14. Cabelli, F.J., Dufour, A.P., McCabe, P.L. and Levin, M. A. Swimming associated gastroenteritis and water quality. *Am. J. Epidemiol.* 115 (1982), 606-616.
15. Craun, G.F. Waterborne disease. CRC Press. Boca Raton, Florida USA. 1986.
16. Center for Disease Control. Gastroenteritis associated with lake swimming Michigan. Morbidity and mortality Weekly Rev. US-DHEW/PHS. 28 (1979).
17. Agbalika, F., Harteman, P. and Follquet, J. M. Trypsin treated MA-104: A sensitive Cell line for isolating enteric viruses from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984), 378-380.