

***Avenços metodològics en la detecció de virus entèrics en  
aigües***

***Laura Mocé i Llivina  
Tesi Doctoral***



***Departament de Microbiologia  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona***



***Avenços metodològics en la detecció de virus entèrics en  
aigües***

*Memòria presentada per Laura Mocé Llivina per optar al Grau de Doctor en Biologia.*

*Vist i plau del director de tesi*

*Laura Mocé i Llivina*

*Dr. Joan Jofre Torroella*

*Barcelona, abril de 2004*

*Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (1998-2000).*

A la iaia Paquita

*“La vida es torna una festa  
quan saps disfrutar de les coses normals”*

*(Phil Bosmans)*

Una persona molt especial per mi i que estimo molt, em va ensenyar a viure d'una manera que es podria resumir en la següent frase: "Quan donis fes-ho sense mesura, quan rebis sigues agraït". Ella era la iaia Paquita, i m'agradaria que sabés que cada dia provo de semblar-me més a ella. Seguint doncs la manera de viure que ens va inculcar amb el seu fer dia a dia, toca en aquest moment agrair un munt de coses a un munt de persones amb les que he compartit aquests darrers anys.

En primer lloc agrair al Dr. Joan Jofre l'excel·lent direcció d'aquest treball i el fet que confiés en mi per dur a terme aquest treball, tot i que en aquell moment ja comptava per dues. Gràcies Joan per la paciència, per la constància, pel munt de coses que he après de tu i per tenir sempre "un minut".

En aquesta línia agrair al Dr. Francisco Lucena el munt de consells i d'ànims que m'ha donat durant aquests anys. De nou li dono les gràcies per confiar en mi i per permetre'm treballar amb ell, un plaer, sens dubte. Sense oblidar al Dr. Anicet Blanch, el "culpable" de la meua incorporació al Departament, sempre recordaré els nervis d'aquells primers moments i aquells "Hola Laura, com va tot?".

Agrair també a la resta de professors titulars del Departament el suport i els moments compartits. I a l'equip d'administratius haver-me facilitat les tasques de paperassa.

Abans de passar a recordar aquells moments que de segur em faran saltar alguna llagrimeta, agrair el poder haver disposat de les mostres necessàries per a la realització del treball a les empreses EMSSA, AGBAR i ATLL.

M'agradaria tirar enrera en el temps, per agrair molt especialment a la Marta la paciència que va tenir amb mi i tot el temps dedicat a que pogués aprendre a "caminar" pel laboratori. Vaig passar-m'ho molt bé treballant amb *Vibrio*, en un ambient de laboratori sempre amable al que tornaria després del pas per la Leonera per retrobar-me amb la Yolanda, l'Albert, el Xavi Vilanova i la Melanie. Gràcies Yolanda pels bons moments viscuts i per les hores de pràctiques que se'ns dubte van ésser més amenes al teu costat. Records al Jorge. Del pas per la Leonera i el laboratori 13 (amb el primer trasllat viscut) me'n recordo de la Idoia, el Xavi, el Jordi, la Nuri i la gent de la Rosina (la Sonia, la Silvia, la Pili i la Meritxell). Van ésser pocs mesos, però molt intensos, no?

Amb la tesi ja començada, va venir el segon trasllat que va servir per separar i unir personatges. Recordaré sempre molt especialment haver conegut a l'Ana Emilia, amb qui vam compartir tants bons moments com a companyes de laboratori. Li vull agrair la comprensió, l'amabilitat i el coratge que va mostrar en tot moment. Van marxar a l'edifici nou molta gent que ara tornarem a trobar i d'altres que ja han volat. Gràcies a tots vosaltres, el Toni i el Jordi Urmeneta, el Quim, el Jordi Sabaté, el Marc i la Zaira, la Marta, la Marga. l'Oscar, el Cristian, el Pere i la Núria Prim, la Sonia P., la Sonia R., la Rosa, la Nuria, la Cristina i el Nacho (gracias por unas prácticas geniales y por las risas). Un record especial per la gent de l'Albert Bosch, la Cristina, la Susana, la Glòria, el Santi i com no, el Xavi Abad. Amb ells compartim un "amor especial" pels virus. Espero que l'ambient segueixi amb els joves Lluís, Néstor i

Mari (ei peque, ànims i molta sort, gràcies pel teu bon humor). De segur m'oblido algú, però a tots, gràcies.

A l'edifici "vell" hem compartit experiències de tota mena amb els que vam quedar. Provant de recórrer el passadís, a la Sibèria trobem la Cristina Garcia i l'Eli, ànims, sort i gràcies per la comprensió i saber escoltar, i el Xavi Bonjoch amb qui compartim un vincle astrològic. Xavi, gràcies per ser com ets, no canviïs. I els veïns, l'Anna, sempre rient, un consell: calma i ànims i moltes gràcies per escoltar i comprendre, l'Andrei, "much a suerte y gracias por los masajes y las risas" i el Michel, un dels artistes que apareixeran més en davant. Al laboratori 38 no voldria oblidar a l'Eli Gomez (crec que tots en tindrem un record especial d'ella), la Sara i la Núria, gràcies pels dinars i les sobretauls dels darrers temps. I a l'hora de dinar, un record especial per la Susana Merino, gràcies per la teva senzillesa, pels cops de mà i el bon humor. A l'ala oest, la gent del Dr. Joan Tomas, els nous rostres de la Silvia, la Sandra, la Rocío i la Natalia, i els records entranyables que me'n duc del Lluís, la Maria, la Ina i la Ceci, gràcies per fer-los possible. Seguint pel passadís, apareixen els nois i noies de la Rosina, carregats de bon humor i una capacitat increïble per arrencar un somriure. Realment un laboratori carregat de bon rotllo, gràcies Pili, Silvia, Néstor, Carles i Ayalke. Una mica més lluny, a les muntanyes de Prades, un record per l'Olga. Molta sort a tu i al Sergio amb els projectes de futur i gràcies per mostrar-me que no val defallir.

I on ens trobem actualment, de retorn a la Leonera, realment renovada, amb la Maite, la Cristina, la Ruth, i el fitxatge més recent, la Carolina. Amb elles compartim encara laboratori i ens esperen noves vivències, sens dubte. Maite, gràcies per l'ajuda que he rebut de tu en tot moment. Cristina i Ruth, disfruteu de la gran amistat que ha nascut i sigueu sempre felices. Gràcies pels farts de riure i pel "bon geni" que encomaneu. Carolina, mucha suerte con la nueva etapa que ahora empieza y gracias por tu gran amabilidad. Un record per l'Hugo, un personatge curiós, sens dubte, però un encant de persona, mucha suerte, peque.

Vull dedicar dos agraïments molt especials a la Susana i a la Rosario. Susana, a més dels munts de cèl·lules i els litres i litres de medi, gràcies pels moments viscuts, per aguantar les meves "neures" i els "rotllos". Ets un encant. I que he de dir de la Rosario, has sido la hermana que habría querido tener. Eres un cielo y me alegra mucho haberte conocido y haber podido compartir tantas horas estos años. Gracias por ser tan especial y por tu cariño y apoyo.

Fora del Departament, gràcies a tota la colla de personatges que han ajudat a formar-me com a persona. Recordo els anys de facultat i vull agrair al Sergi, al Sergio, a la Noelia, a la Judith i molt especialment a la Mari l'amistat, el munt d'hores viscudes i els bons records que em queden d'aquells anys. Gràcies també a la resta d'amistats i amb molt carinyo, gràcies a la nova família trobada, l'Ellis, l'Alfredo, el Rob i la Sandra. Gràcies per acollir-me tant bé i sort als més joves amb els projectes de futur.

I molt especialment, gràcies a la "family". Sense vosaltres aquest treball no s'hauria acabat. Gràcies mama pel gran suport en tot moment, i per les hores de cangur que han permès dedicar-me a la tesi. Gràcies papa per la comprensió, el suport incondicional i els ànims. A tots dos us dec moltíssim, com no, i vull agrair-vos que sempre hagueu estat al meu costat. I els dos "tetes" l'Óscar (i la "cunyada" Sandra) i el Josep. És una xulada tenir uns germans com vosaltres. Un agraïment especial al tiet Jaume. Gràcies per aguantar estoicament les meves "neures" informàtiques. I un record especial a la iaia Dora, a la tieta Pili i a les "cosinetes" i parelles respectives.

En aquest moment ja només em queda agrair els meravellosos moments viscuts i els que espero viurem, als dos grans "peques artistes" de casa, el Michel i la Francesca. A ells vull agrair-los l'amor incondicional, el carinyo, que m'estimin malgrat el meu caràcter i que hagin portat tant bé les hores de segrest davant l'ordinador i els nervis d'aquests últims mesos. Vosaltres dos m'heu ensenyat a estimar, a veure que tot pot ésser diferent i a superar els problemes i les preocupacions. Moltes gràcies, la meva vida sense vosaltres no seria ni de bon tros, tan plena.

De tot cor, *GRÀCIES*.





# INDEX

Abreviatures i

## INTRODUCCIÓ GENERAL ---

- L'ambient aquàtic. Qualitat i gestió 1
- Qualitat virològica de l'aigua 1
  - Presència de virus 6
  - Cicle de contaminació vírica 9
  - El control de la contaminació vírica del medi aquàtic 10
- Els enterovirus 12
  - Classificació 15
  - Genoma 15
  - Morfologia 17
  - Replicació 17
  - Característiques dels enterovirus que apareixen a l'estudi 19
  - Patogènia dels enterovirus 20
  - Epidemiologia 23
- Perspectives en virologia ambiental 25
- Mètodes de detecció de virus a l'ambient aquàtic 26
  - Antecedents 26
  - Concentració de virus 28
  - El cas de l'aigua residual 39
  - Altres tipus de mostra 41

## OBJECTIUS GENERALS ---

## CAPÍTOL 1. OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN ---

- Introducció 45

○ El mètode Viraden	45
○ Adsorció dels virus a les membranes	46
○ Factors que afecten el rendiment del mètode Viraden	47
○ Optimització del mètode Viraden	49
○ Aplicacions del mètode Viraden per a la identificació de clapes víriques sobre filtres de membrana	50
● Objectius	51
● Material i Mètodes	52
○ El mètode Viraden	52
○ Modificació del medi <i>overlay</i>	54
○ Efecte de l'addició d'IDU al cultiu cel·lular en creixement	56
○ Adaptació del mètode Viraden a filtres de 90 mm de diàmetre	57
○ Aplicació del mètode Viraden amb la línia cel·lular PLC/PRF/5	59
○ Combinació de diferents línies cel·lulars en el mètode Viraden	60
○ Efecte del volum de mostra filtrat en el rendiment del mètode Viraden	60
○ Identificació de clapes víriques sobre filtres de membrana obtingudes en l'aplicació del mètode Viraden	61
● Resultats i Discussió	72
○ Modificació del medi <i>overlay</i>	72
○ Efecte de l'addició d'IDU al cultiu cel·lular en creixement	75
○ Adaptació del mètode Viraden a filtres de 90 mm de diàmetre	76
○ Aplicació del mètode Viraden amb la línia cel·lular PLC/PRF/5	78
○ Combinació de diferents línies cel·lulars en el mètode Viraden	79

○ Efecte del volum de mostra filtrat en el rendiment del mètode Viraden	80
○ Identificació de clapes víriques sobre filtres de membrana obtingudes en l'aplicació del mètode Viraden	83
• Conclusions	89

## **CAPÍTOL 2. MÈTODES DE CLARIFICACIÓ I DESCONTAMINACIÓ DE MOSTRES \_\_\_\_\_**

• Introducció	91
○ Candidats per als procediments de descontaminació química de mostres ambientals	93
○ Procediments de clarificació	94
○ Procediments de filtració per a la descontaminació de mostres ambientals	94
• Objectius	95
• Material i Mètodes	96
○ Mostres	96
○ Mètodes de descontaminació química amb clarificació	97
○ Mètodes de clarificació	104
○ Mètodes de descontaminació per filtració	405
• Resultats i Discussió	107
○ Mètodes de descontaminació química amb clarificació	107
○ Mètodes de clarificació	116
○ Mètodes de descontaminació per filtració	117
• Conclusions	122

## **ANNEX CAPÍTOL 2 ..... 123**

## **CAPÍTOL 3. APLICACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN PER MESURAR LA INACTIVACIÓ DE VIRUS ADSORBITS A SUPERFÍCIES \_\_\_\_\_**

• Introducció	127
---------------	-----

o	Descripció dels desinfectants i antisèptics assajats. Característiques i mecanismes d'acció virucida	130
o	Inactivació de virus per factors físics	132
•	Objectius	134
•	Material i Mètodes	135
o	Efecte comparatiu de desinfectants i antisèptics sobre virus en suspensió i virus adsorbits	135
o	Persistència a diferents temperatures	138
o	Persistència a diferents humitats relatives	139
o	Valoració del possible efecte de l'adherència dels virus amb presència d'ions bivalents a les parets de microtubs	141
•	Resultats i Discussió	143
o	Efecte comparatiu de desinfectants i antisèptics sobre virus en suspensió i virus adsorbits	143
o	Persistència a diferents temperatures	148
o	Persistència a diferents humitats relatives	154
o	Valoració del possible efecte de l'adherència dels virus amb presència d'ions bivalents a les parets de microtubs	159
•	Conclusions	162

**ANNEX CAPÍTOL 3. CONSERVACIÓ A LLARG TERMINI D'ENTEROVIRUS ADSORBITS A (-70±10)°C..... 163**

**CAPÍTOL 4. EL MÈTODE DE DOBLE CAPA. UN NOU MÈTODE PER QUANTIFICAR VIRUS CULTIVABLES**

---

•	Introducció	165
o	Mètodes de detecció i quantificació de virus cultivables	165
o	Línies cel·lulars per a la detecció d'enterovirus a l'ambient	172
o	Combinació de diferents línies cel·lulars per a l'enumeració d'enterovirus cultivables	173
o	Mètodes de biologia molecular per a la identificació d'enterovirus	174

• Objectius	176
• Material i Mètodes	177
○ Línies cel·lulars i cultiu	177
○ Mètodes de quantificació d'enterovirus	178
○ Comparació de mètodes	181
○ Identificació d'aïllaments virals mitjançant RT-PCR seguida de RFLP i/o seqüenciació	189
• Resultats i Discussió	198
○ Comparació de mètodes	198
• Conclusions	224

**ANNEX CAPÍTOL 4. CONSERVACIÓ DE CÈL·LULES A 4°C DURANT PERÍODES CURTS DE TEMPS ..... 225**

**CAPÍTOL 5. DETERMINACIÓ D'ENTEROVIRUS EN MOSTRES AMBIENTALS \_\_\_\_\_**

• Introducció	235
○ Densitats d'enterovirus en mostres ambientals	235
○ Indicadors microbiològics de qualitat de l'aigua	245
• Objectius	247
• Material i Mètodes	248
○ Caracterització microbiològica de l'aigua residual. Quantificació i identificació d'enterovirus	248
○ Caracterització microbiològica de l'aigua de riu	249
○ Caracterització microbiològica de l'aigua de mar	252
• Resultats i Discussió	258
○ Caracterització microbiològica de l'aigua residual. Quantificació i identificació d'enterovirus	258
○ Caracterització microbiològica de l'aigua de riu	264
○ Caracterització microbiològica de l'aigua de mar	266
○ Enterovirus detectats en mostres ambientals de diferents orígens	274
• Conclusions	283

<b>CONCLUSIONS FINALS</b>	<b>285</b>
<b>RESUM</b>	<b>287</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>291</b>
<b>ANNEX I. MATERIAL I MÈTODES GENERAL</b>	<b>311</b>
<b>ANNEX II. MEDIS I REACTIUS</b>	<b>349</b>



## **ABREVIATURES**

ADN	<i>Àcid desoxirribonucleic</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARN	<i>Àcid ribonucleic</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DGC	<i>Digluconat de clorhexidina</i>
EDTA	<i>Àc. etilen-diamina-tetraacètic</i>
FMDV	<i>Foot and mouth disease virus</i>
HAV	<i>Virus de l'hepatitis A</i>
HEPES	<i>Àc. 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetan sulfònic</i>
HEV	<i>Virus de l'hepatitis E</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
ICTV	<i>International Committe on Taxonomy of Viruses</i>
kb	<i>quilobases</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	<i>Organització Mundial de la Salut</i>
pb	<i>Parells de bases</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PES	<i>Polyethersulfone</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
USEPA	<i>U. S. Environmental Protection Agency</i>
VIH	<i>Virus de la immunodeficiència humana</i>
VPg	<i>Genome-linked viral protein</i>
VZV	<i>Varicella zoster virus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>





# INTRODUCCIÓ GENERAL

## 1. L'AMBIENT AQUÀTIC. QUALITAT I GESTIÓ

La utilització dels recursos d'aigua no convencionals en el món actual és cada vegada més necessària, tant en el món desenvolupat com en els països en vies de desenvolupament, sobretot contemplant la societat en el marc d'una economia sostenible. L'ús segur d'aquesta aigua implica conèixer des de totes les vessants la seva qualitat. A més, cal aprofundir en l'estudi dels possibles efectes sobre el medi i la salut dels diferents elements, tant químics com microbiològics, susceptibles de trobar-se en aigües regenerades. Quan aquestes aigües es destinen a aplicacions que impliquen l'exposició humana, una gran part dels riscos aguts per la salut estan associats amb l'exposició als agents biològics (bacteris patògens, helmints, protozous i virus entèrics). Des del punt de vista de salut pública i del control sanitari en el món desenvolupat, els virus entèrics són un dels grups microbiològics crítics, degut a la possibilitat d'infecció per exposició a dosis baixes i per la problemàtica relativa a la identificació i quantificació per al seu control.

Les rutes d'exposició als agents microbiològics infecciosos són el contacte directe amb superfícies contaminades (el sòl, per exemple), la ingestió d'aigua contaminada, el consum de vegetals que hagin estat regats amb aigua residual, l'exposició

als aerosols, etc. Pel que fa als productes químics, cal considerar com més importants els metalls pesants, els pesticides i les substàncies clorades, sub-productes de la cloració de l'aigua residual. Molts d'aquests productes químics són potencialment mutàgens o carcinògens i aquest fet requereix una consideració especial quan l'aigua residual s'utilitza per a regar cultius o per a la recàrrega d'aqüífers (WHO, 1989; Shuval, 1991).

Els tractaments convencionals d'aigües residuals eliminen una part dels microorganismes presents, donat que aquests solen estar associats a la matèria orgànica particulada (sòlids en suspensió) però, no tenen com a objectiu prioritari l'eliminació de microorganismes. En general, la qualitat de les aigües regenerades ve determinada pel seu tractament el qual, està supeditat al destí final de la mateixa (rec, recàrrega d'aqüífers, etc.). Aquesta qualitat ve determinada per paràmetres tan senzills com la salinitat, l'acidesa i la composició mineralògica, a més d'altres més complexos, com la presència de contaminants tòxics o organismes patògens. Amb la depuració es genera una aigua residual tractada amb un nombre de microorganismes patògens inferior al de l'aigua residual bruta però variable. Pel que fa als virus, aquest

nombre depèn de l'estació de l'any, dels virus que circulen a la població en un moment determinat, i del grau de tractament que duu a l'eliminació d'aquests de l'aigua residual. Conèixer i determinar la qualitat dels recursos no convencionals d'acord amb els usos d'aquests és, actualment, imprescindible i, més especialment quan l'ús d'aquesta aigua pot afectar la salut pública.

Quan els efluent de depuradores o l'aigua residual bruta s'aboquen a rius o mars, els virus humans poden llavors estar presents en aquests tipus d'aigua. El coneixement disponible sobre el paper de l'aigua en l'ecologia i la transmissió dels microorganismes patògens entèrics a l'ambient varia; i la part que juguen els virus entèrics i els protozous es coneix menys que la de molts bacteris, principalment per les dificultats associades amb la detecció d'aquests microorganismes a l'ambient aquàtic.

Val a dir que les mesures de salut pública per al tractament de l'aigua

residual i la potabilització de l'aigua de beguda han permès reduir i fins i tot eliminar moltes de les malalties de transmissió hídrica als països desenvolupats, tot i que aquestes malalties són encara presents en altres països en vies de desenvolupament. La majoria dels brots de malalties produïdes per virus de transmissió hídrica als Estats Units i Europa han estat causats per contaminació evident per aigua residual d'abastaments d'aigua privats i semipúblics que posteriorment no s'han tractat o s'han tractat de manera no adient (Anderson i Bohan, 2001; Craun et al, 2003; Jofre et al, 2003). Els brots de malalties víriques en abastaments d'aigua comunitaris normalment han estat causats per contaminació a través dels sistemes de distribució (Levy et al, 1998).

La taula 1.1 mostra el nombre i tipus de microorganismes patògens més freqüents en una aigua residual urbana. I a més d'aquests, els que manquen identificar en una matriu fortament complexa.

**Taula 1.1.** Microorganismes patògens que poden trobar-se en l'ambient aquàtic.

	<b>Microorganisme</b>	<b>Malaltia</b>	<b>Concentració mitjana en aigua residual</b>	<b>Dosi infecciosa</b>
<b>Virus</b>	<i>Enterovirus</i>	Paràlisi, meningitis, febre, poliomielitis, miocarditis, erupció cutània, infecció respiratòria, diarrea.	$10^2-10^3 \cdot L^{-1}$	1-10 UI
	<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis infecciosa	$10^2 \cdot L^{-1}$	
	<i>Reovirus</i>	No establerta		
	<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis		
	<i>Norovirus</i>	Gastroenteritis		
	<i>Sapovirus</i>	Gastroenteritis	$10^2-10^5 \cdot L^{-1}$	
	<i>Astrovirus</i>	Gastroenteritis		
	<i>Coronavirus</i>	Enterocolitis, gastroenteritis	$10^6-10^8 \cdot L^{-1}$ (genomes)	
	<i>Mastadenovirus</i>	Infecció respiratòria, conjuntivitis i gastroenteritis		
	<i>Parvovirus</i>	Gastroenteritis	$10^2-10^3 \cdot L^{-1}$	
	<i>Torovirus</i>	Gastroenteritis		
	<i>Hepevirus</i>	Hepatitis		
<b>Bacteris</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	Còlera		$10^8-10^{11}$ ufc
	<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifoidea		$10^6-10^7$ ufc
	<i>Salmonella</i> altres	Salmonelosi	$10^2-10^3$ ufc $\cdot L^{-1}$	$10^6-10^7$ ufc
	<i>Aeromonas</i>			
	<i>Plesiomonas</i>			
	<i>E. coli</i> patògena	Gastroenteritis		$10^2-10^9$ ufc
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	$10^4-10^5$ ufc $\cdot L^{-1}$	106 ufc
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Disenteria		102 ufc
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniosi		109 ufc

**Taula 1.1.** Microorganismes patògens que poden trobar-se en l'ambient aquàtic.  
(Continuació)

	<b>Microorganisme</b>	<b>Malaltia</b>	<b>Concentració mitjana en aigua residual</b>	<b>Dosi infecciosa</b>
<b>Protozous</b>	<i>Giardia intestinalis</i>	Giardiasi	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> quists ·L <sup>-1</sup>	10-100 quists
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiosi	0-10 <sup>4</sup> ooquists ·L <sup>-1</sup>	10-100 ooquists
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Amibiasi		10-100
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosi		
	<i>Cyclospora</i>	Ciclosporiasi		
<b>Helminths</b>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariidiosi	0-30 ·L <sup>-1</sup>	1-10 ous
	<i>Ancylostoma sp</i>	Anquilostomiosi		1-10 ous
	<i>Trichuris trichiura</i>	Tricocefalosi	0-3 ·L <sup>-1</sup>	6-60 ous
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Anguilolosi		1-10 ous

Les eines administratives de les que es disposa per combatre la contaminació del medi aquàtic són diverses. D'una banda, a Catalunya, es segueix el Pla de Sanejament de juny de 1996, el qual marca les directrius per al sanejament d'aigües residuals orientades a:

- Preveure la contaminació d'aigües superficials, subterrànies i marines posant especial èmfasi a la prevenció en origen.
- Restituir el caràcter potable i natural de les aigües subterrànies i superficials.

L'objectiu principal és aconseguir un nivell de qualitat de l'aigua que assegurí els usos definits al Pla, abans del 31 de desembre de 2005.

El Pla de Sanejament defineix els objectius de qualitat als rius de Catalunya i la seva classificació com a zones menys sensibles, normals i sensibles (segons l'exigència de qualitat creixent). Per assolir aquests objectius el Pla de Sanejament incloïa el desenvolupament de cinc programes: el Pla de sanejament d'aigües residuals urbanes (PSARU I), el Programa de tractament dels fangs de les depuradores d'aigües residuals urbanes, el Programa de sanejament d'aigües residuals industrials (PSARI) i el Programa de sanejament d'aigües residuals d'origen ramader i el d'origen agrícola i de contaminació d'origen difús. Tots cinc determinen les actuacions dutes a terme per assolir complementàriament els nivells de

qualitat establerts en el Pla de sanejament. El PSARU I tenia per objecte, bàsicament, la realització dels sistemes de sanejament als nuclis de més de 2000 habitants equivalents, així com aquells que tenien una afecció en el medi notòria.

El Pla de Sanejament d'Aigües Residuals Urbanes (PSARU) 2002 té com a objecte global la millora de l'estat ecològic dels cursos d'aigua en el nostre país, mitjançant la definició de solucions de tractament de les aigües residuals a les aglomeracions de Catalunya de menys de 2000 habitants.

El desenvolupament integral del PSARU 2002 comportarà passar d'unes 300 estacions depuradores d'aigües residuals a més d'un miler. Aquest programa està implantat des del 2002 i fins al 2015 i estableix que al 2005 els nuclis amb 200 habitants també tindran resolt el seu sanejament. Al 2015 estarà sanejat el 100% del territori de Catalunya.

A més, la revisió del PSARU I inclosa en el PSARU 2002 comportarà, en alguns casos, la incorporació de tractaments addicionals en les depuradores existents.

El PSARU 2002 té com a objecte la definició de totes les actuacions destinades a la reducció de la contaminació a l'aigua originada per l'ús domèstic. Analitza com està el medi receptor i com es vol que estigui des del punt de vista qualitatiu; per

tant, fixa l'estat ecològic desitjat per als rius de Catalunya. A partir d'aquest objectiu, s'ha redactat el Programa per al conjunt de les conques i s'han definit les solucions adequades.

Aquests plans s'inclouen en el marc legal de les Directives europees. La Directiva 2000/60/CE de 23 d'octubre estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües a tots els països de la Unió Europea, va adreçada a la protecció de les aigües i persegueix com un dels seus objectius que, com a màxim l'any 2015 s'aconsegueixi un bon estat de les masses d'aigua superficials mitjançant el desenvolupament de mesures de protecció, millora i regeneració. La Directiva 91/271/CEE sobre el tractament d'aigües residuals urbanes té per objecte la recollida i abocament de les aigües residuals urbanes, així com el tractament i abocament de les aigües residuals procedents de determinades activitats industrials i disposa que per a la seva aplicació els Estats membres adoptaran el programa corresponent. Aquesta Directiva defineix els nivells de tractament de les aigües residuals urbanes, i calendaris per a la seva implantació, per a les aglomeracions de més de 2000 habitants equivalents [Habitant equivalent: paràmetre que permet quantificar la càrrega contaminant real per habitant] i, en canvi, no imposa un determinat nivell de tractament per a les de menys de 2000 habitants

equivalents, recomanant solament que sigui adequat, és a dir que permeti assolir els nivells de qualitat establerts pel medi receptor i fixa la data límit de la seva instal·lació el 31 de desembre de 2005.

Altres Directives disponibles per al control del medi són la Directiva per Aigües de Bany (1976), la Directiva per Aigua de Beguda (2003) i la Directiva per Cultiu de Marisc (1991), les quals són instruments de la Unió Europea per garantir que l'aigua és segura per al seu propòsit. La Directiva per a Aigua de Beguda es recull a la Legislació Espanyola al Real Decreto 140/2003 el qual és la transposició de la Directriu de la Unió Europea (98/83/CE) i substitueix al Real Decreto 1138/1990 vigent fins al

moment. El compliment amb els paràmetres de les Directives implica que a l'aigua s'ha d'aplicar un seguiment regular i que els organismes indicadors s'han de trobar per sota dels límits marcats.

Val a dir que des del punt de vista microbiològic, totes les directives o normatives estan fonamentades en la detecció i control de bacteris. Només dues d'aquestes eines inclouen els virus com a paràmetre de qualitat a considerar, malgrat l'interès d'aquests microorganismes. Aquestes són, la Directiva per a Aigües de bany (1976) i els estàndards per a l'eliminació i la reutilització de fangs de depuradores dels Estats Units (EPA, 1993; EPA, 1994).

## **2. QUALITAT VIROLÒGICA DE L'AIGUA**

### **2.a. Presència de virus**

Molts grups de virus poden habitar el tracte intestinal dels humans i replicar a les cèl·lules epitelials d'aquest. Els virus animals no formen part, però, de la flora normal del tracte intestinal d'individus sans; només n'excreten els individus infectats, principalment nens i joves. Les taxes d'infecció varien considerablement en diferents àrees geogràfiques depenent de les condicions sanitàries i socioeconòmiques. Només alguns

causen suficient mal per tal que es produeixi gastroenteritis o altres malalties. El terme "virus entèrics" inclou tots aquells grups de virus que poden trobar-se presents al tracte gastrointestinal i que poden causar malaltia o presentar una infecció asimptomàtica. Aquests virus són transmesos de persona a persona majoritàriament per la via fecal oral. Al sortir del cos amb les femtes poden trobar-se presents a l'aigua residual domèstica, la qual, com s'ha comentat anteriorment, després de diferents graus de tractament, o de tractament

nul en alguns casos, s'aboca a les aigües superficials o al sòl. Pel fet de ser paràsits intracel·lulars obligats, els virus no poden replicar a l'ambient, però sí mantenir-se infecciosos durant períodes més o menys llargs de temps. Els virus entèrics (Taula 2.1), els quals s'excreten en nombres relativament alts, poden dividir-se en dos grups atenent al seu creixement en cultiu cel·lular. La majoria dels enterovirus, els quals formen un grup taxonòmic diferenciat (incloent-hi poliovirus, coxsackievirus i echovirus) creixen bé en els cultius cel·lulars disponibles originats a partir de cèl·lules de primats i humanes i estan ben caracteritzats. Altres grups poden créixer en cultiu, com alguns serotips d'adenovirus i els reovirus. Els darrers no causen malalties reconegudes.

Els virus entèrics que manquen formen un grup heterogeni que inclou rotavirus, astrovirus, adenovirus 40/41, norovirus i sapovirus (virus Norwalk-like i Sapporo-like) i virus de l'hepatitis A i E entre d'altres. Aquests no poden créixer fàcilment en cultiu. La seva importància recau en que causen diferents malalties gastrointestinals agudes o hepatitis. Els

virus tipus Norwalk no poden cultivar-se en cap línia cel·lular, tot i que s'han desenvolupat mètodes d'assaig immunoquímics i genètics per detectar-los. Els rotavirus humans i HAV poden cultivar-se en cultiu cel·lular, però les tècniques són difícils i requereixen l'ús addicional d'immunoassaigs, com la immunofluorescència, per detectar el creixement dels virus o la utilització de sondes d'àcid nucleic (Sobsey et al, 1984; Sato et al, 1981; Hejkal et al, 1984; Jiang et al, 1987). A més, aquests i alguns enterovirus si creixen en cultiu cel·lular, poden fer-ho sense produir efectes citopàtics visibles sobre les cèl·lules (Grabow et al, 1999).

Amb la possible excepció de l'HAV, cada grup o subgrup conté un nombre determinat de serotips fet pel qual, es reconeixen més de 100 virus entèrics humans diferents (Melnick, 1984; Knipe i Howley, 2001). D'altra banda, són abundants en aigües ambientals virus de fonts no humanes, entre d'altres alguns reovirus, que poden infectar els humans. La significació d'aquests i altres virus de fonts no humanes està encara per determinar.



**Taula 2.1.** Principals virus entèrics que poden trobar-se al medi aquàtic.

Família	Gènere	Virus	Serotips	Diàmetre del virió (nm)	Embolcall	Genoma
<b>Reoviridae</b>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	6	70-75	No	ARN dc segmentat (11 segments) 31 kb
	<i>Orthoreovirus</i>	Reovirus	3	70-75	No	ARN dc segmentat (10 segments) 46 kb
<b>Picornaviridae</b>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	3	22-30	No	ARN mc (+) 7,7 kb
		Coxsackie A	23			
		Coxsackie B	6			
		Echovirus	28			
	<i>Enterovirus 68 a 71</i>	4				
	<i>Hepatovirus</i>	Virus de l'hepatitis A	1			
<b>Caliciviridae</b>	<i>Norovirus</i>	Virus de Norwalk	1	27-32	No	ARN mc (+) 7,5 kb
	<i>Sapovirus</i>	Virus de Sapporo	1			
<b>Astroviridae</b>	<i>Astrovirus</i>	Astrovirus humans	7	28-30	No	ARN mc (+) 7,2-7,9 kb
<b>Coronaviridae</b>	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus humans	2	80-150	Lipídic	ARN mc (+) 33 kb
	<i>Torovirus</i>	Torovirus	?	120-140	Lipídic	ARN mc (+) 20 kb
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus	49	80-110	No	ADN dc 20kb
<b>Hepeviridae</b>	<i>Hepevirus</i>	Virus de l'hepatitis E	1	27-34	No	ARN mc (+) 7,5 kb

mc: monocatenari; dc: doble cadena; (+): polaritat positiva

Els nombres de virus infecciosos detectats per litre d'aigua residual van des de menys de 100 unitats infeccioses a més de 100.000 unitats infeccioses en funció de diferents paràmetres. Les informacions existents sobre prevalences i distribució temporal dels diferents virus poden semblar, en ocasions, contradictòries. Aquest fet, possiblement degut a condicions geogràfiques i climàtiques, pot provocar que la informació que es presenti sigui esbiaixada ja que gran part dels estudis es concentren en àrees geogràfiques determinades. En climes temperats, els nombres de virus en aigua residual generalment incrementen durant els mesos càlids i disminueixen en els mesos freds, reflexant patrons d'infecció i excreció en la comunitat. Però es troben importants excepcions a aquest fet. Són els casos de HAV, norovirus i rotavirus. La incidència de les malalties causades per aquests virus incrementa en els mesos freds.

## **2.b. Cicle de contaminació vírica**

L'origen de la contaminació vírica d'un medi aquàtic es troba en l'home o animals infectats per virus entèrics, els quals excreten quantitats importants de partícules virals. El període i la durada de l'excreció viral, així com la quantitat de virus excretats, varien

considerablement en funció del tipus de virus. Per als enterovirus, la durada mitjana d'excreció viral és d'un mes, però sovint persisteix durant més temps (Melnick, 1996).

L'aigua residual constitueix el primer pas d'un cicle de l'aigua al centre del qual es troba l'home en tant que és el contaminador i el receptor dels agents patògens transmesos per l'aigua. Com s'ha comentat anteriorment, fora de les cèl·lules vives, el virus és inert però manté la infecciositat. D'aquesta manera, virus excretats a l'aigua residual per persones infectades, sotmesos a tractaments de depuració, descarregats als rius, pantans i llacs, molt sovint sobreviuen fins arribar a recursos d'aigua i àrees recreacionals de comunitats situades lluny en el curs de l'aigua. Durant els últims anys s'han documentat casos d'aquest tipus de contaminació repetida fins i tot en absència aparent d'indicadors bacterians (Schvoerer et al, 2001). Com passa amb la resta de patògens de transmissió hídrica, a més de la utilització directa d'aigua contaminada, la població pot quedar exposada als virus entèrics a través d'altres vies: marisc que creix en aigua de mar i d'estuari contaminada, cultius que creixen en sòls regats amb aigua residual o adobats i condicionats amb fangs de depuradora, aigües recreacionals, i fins i tot, aigua de beguda contaminada amb virus.

Tot i que poden donar-se brots de malalties virals de transmissió hídrica quan es produeix contaminació massiva d'un abastament d'aigua a partir d'aigua residual, la transmissió hídrica d'una infecció viral i el desenvolupament de la malaltia que produeix l'agent infeccios transmissiu, depèn de si la quantitat de virus que arriba a l'hoste és suficient per produir la infecció. S'ha demostrat que pot produir-se infecció experimentalment amb nombres molt baixos d'unitats víriques (Ward et al, 1986), amb el ben entès que el risc d'infecció incrementa amb l'increment de les dosis ingerides (Akin, 1981). No s'ha determinat el risc que un individu en una comunitat amb un abastament d'aigua que contingui molt poques unitats víriques, pugui contraure una infecció causada pel consum d'aigua però s'han realitzat algunes estimacions (Regli et al, 1991). L'anàlisi de risc suggereix que hi ha un risc significatiu d'infecció resultat de la presència de nombres baixos de virus entèrics o altres microorganismes patògens en abastaments d'aigua, segurament pel fet que l'aigua de beguda es consumeix en gran quantitat i per tant poden produir-se infeccions fins i tot si aquesta conté petits nombres de microorganismes patògens (Melnick, 1996). D'altra banda, el percentatge d'individus que desenvolupen les malalties amb símptomes clínics a partir de la infecció pot ser molt variable; baix,

d'aproximadament l'1% per poliovirus i alt, del 97% per hepatitis A.

Pel que fa a la detecció de virus entèrics en mostres ambientals, seria raonable suposar que els nombres de virus que es detecten actualment en aigües són probablement, un o més ordres de magnitud inferiors a les quantitats d'aquests realment presents en elles si es consideren els següents punts:

- les baixes eficiències de recuperació dels mètodes disponibles per concentrar-los,
- que els sistemes de cultiu cel·lular emprats habitualment en la detecció són sensibles a menys de la meitat dels tipus virals excretats pels humans,
- que el procediment d'infecció en medi sòlid utilitzat habitualment per detectar i quantificar els virus és relativament poc eficient per ell mateix i
- que, molt possiblement, hi ha virus a l'aigua residual que no han estat encara detectats ni identificats.

## **2.c. El control de la contaminació vírica del medi aquàtic**

Els esforços per obtenir més informació dels virus que es troben a

l'ambient aquàtic és una necessitat per tal d'incrementar el coneixement que contribueixi a una millora de la salut pública. Més coneixement sobre el comportament d'aquests agents a l'aigua facilitarà la provisió d'informació a les autoritats públiques i responsables pel que fa a l'ús i al tractament de l'aigua.

Els avenços tecnològics permeten actualment la detecció directa d'alguns patògens entèrics. L'acumulació d'informació permet a més, millors estratègies de mostreig i l'obtenció de dades més reals. Això, al seu torn, permet valoracions de risc més acurades i el desenvolupament de models per predir els riscos associats amb la utilització dels diferents tipus d'aigua.

Actualment a Europa no s'obliga a la realització d'anàlisi rutinàries per a la detecció d'enterovirus en mostres d'aigua amb l'excepció comentada de les Aigües de Bany (Directiva 76/160/CEE). Tot i això, en circumstàncies especials com una necessitat d'aigua residual tractada, brots de malalties o estudis de recerca especials, seria aconsellable realitzar tests per a la detecció de la presència de virus. Els organismes oficials involucrats en els temes de detecció de virus a l'ambient incideixen en que les anàlisi han de ser realitzades només per viròlegs entrenats especialment i competents que disposin de les

instal·lacions adients (EPA, 1984; APHA, 1998).

Els laboratoris que es plantegin concentrar virus a partir de mostres d'aigua han d'entendre que la metodologia disponible té limitacions importants. Fins i tot els mètodes més usuals per concentrar virus a partir d'aigua encara es troben en període de desenvolupament i són analitzats, modificats i millorats contínuament. L'eficiència d'un mètode de concentració de virus pot variar àmpliament depenent de la qualitat de l'aigua analitzada. A més, cap dels mètodes de detecció de virus disponibles ha estat provat de manera adient amb els representants de tots els grups de virus amb importància en salut pública. La majoria dels mètodes de concentració de virus permeten recuperacions virals acceptables en mostres d'aigua o aigua residual prèviament contaminades experimentalment amb quantitats conegudes d'alguns pocs virus entèrics específics. Tot i que l'efectivitat del mètode en el camp és difícil d'avaluar, alguns mètodes de concentració virals s'han emprat amb èxit en recuperacions de virus entèrics naturalment presents en aigua. Sovint però, els mètodes descrits per a la detecció de virus en aigua necessiten grans equipaments per processar les mostres i, d'altra banda, els assaigs virals i els procediments d'identificació de virus requereixen, en molts casos, cultius cel·lulars i

instal·lacions pròpies de laboratoris de virologia.

Els procediments per detectar virus en mostres d'aigua a través de la recuperació de virus infecciosos han d'incloure generalment, tres passos:

- i) recollida d'una mostra representativa
- ii) concentració dels virus presents a la mostra i,
- iii) estimació de la quantitat i identificació dels virus concentrats.

Els problemes particulars associats amb la detecció en l'ambient aquàtic de virus d'interès en salut pública són:

- i) la petita mida de les partícules víriques (20 a 100 nm de diàmetre aproximadament),
- ii) les baixes concentracions de virus a l'aigua i la variabilitat en la

quantitat i el tipus que es poden trobar presents en ella,

- iii) la inherent inestabilitat dels virus com a entitats biològiques,
- iv) els diversos materials dissolts i en suspensió presents en aigua i aigua residual que interfereixen amb els procediments de detecció de virus i,
- v) les limitacions pròpies dels mètodes actuals d'estimació i identificació de virus.

El present treball es centra en mètodes per a la determinació d'enterovirus en mostres ambientals.

### 3. ELS ENTEROVIRUS

---

Els enterovirus són un grup de virus que pertany a la família *Picornaviridae* i reben el seu nom pel fet que la replicació d'aquests es produeix, entre d'altres zones, com es descriu més en davant, al tracte entèric de l'hoste afectat per la infecció.

#### La família *Picornaviridae*

Els components d'aquesta família són els virus animals coneguts amb menor contingut d'àcid ribonucleic. Aquest grup de virus formen una de les famílies més grans i més important de patògens d'humans i d'animals, aquests amb una important incidència en ramaderia. La família *Picornaviridae* consta de nou

gèneres, algun dels quals afecten exclusivament a animals i d'altres, comprenen importants patògens humans. Els enterovirus, objecte d'estudi, es descriuen més en davant amb major detall. Un altre grup important de picornavirus, els rinovirus humans, són l'agent etiològic més important causant de refredats comuns. Per la seva importància econòmica i sanitària no sorprèn que hagin estat virus molt involucrats en el desenvolupament de la virologia moderna. La taula 3.1 mostra la classificació de la família *Picornaviridae* (Knipe i Howley, 2001; ICTV, 2001).

Dins el grup dels enterovirus, els poliovirus s'identificaren per primera vegada l'any 1909 per inoculació d'aquests virus en simis. Els virus es feren créixer per primera vegada en cultius cel·lulars 40 anys més tard, fet que va esdevenir la base per a les vacunes. El 1948 s'identificà un nou grup d'agents virals, els coxsackievirus, per inoculació en ratolins nou nats amb extractes virals obtinguts a partir de dos nens amb paràlisi. La diferenciació entre coxsackievirus A i B s'establí pels canvis histopatològics produïts en els ratolins i la seva capacitat per créixer en cultius cel·lulars. Els echovirus s'identificaren més tard com agents que produïen efecte citopàtic en cultiu cel·lular i no presentaven patogenicitat en ratolins ni en primats. Més recentment es van identificar els enterovirus humans que

reberen la numeració seqüencial del 68 al 73.

Els enterovirus humans comparteixen un gran nombre de característiques clíniques, epidemiològiques i ecològiques i certes propietats físiques i químiques. Es diferencien pel seu comportament diferent en cultiu, l'antigenicitat i el cicle replicatiu, tot i que en tots els casos l'hàbitat comú i el lloc de replicació és el tracte intestinal. Són resistent als antivírics i quimioteràpics coneguts i a la inactivació (desinfecció) per solvents lipídics. Presenten una tendència natural a l'agregació espontània que els defensa de l'efecte dels agents externs. S'inactiven ràpidament a més de 50°C, per llum ultravioleta i en condicions de baixa humitat relativa. Els enterovirus, cardiovirus i el HAV són estables a pH àcid (3 o inferior), característica que els diferencia dels rinovirus i els aphotavirus els quals són làbils a pHs inferiors a 6. Aquesta diferència en l'estabilitat a pH àcids probablement representa una adaptació al tipus d'hàbitat. Mentre que els enterovirus han de travessar condicions àcides a l'estómac per tal d'accedir al seu hàbitat natiu, el tracte intestinal, els rinovirus o aphotavirus es localitzen a les regions naso i orofaríngees on no sembla necessària l'estabilitat a pHs àcids. Tot i això, l'estructura del virió que no dóna estabilitat a pH àcid en el cas d'aphotavirus deu conferir una mena

d'avantatge d'infecció ja que aquests són uns dels virus coneguts més contagiosos.

**Taula 3.1.** La Família Picornaviridae (adaptat de Knipe i Howley, 2001 i ICTV, 2001)

Gènere	Membres	Nombre de serotips
<b>Enterovirus</b>	Poliovirus humans 1-3	3
	Coxsackievirus humans A1-A22, 24	23
	Coxsackievirus humà B1-6	6
	Echovirus humans 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33	32
	Enterovirus humans 68-73	4
	Vilyuisk virus	1
	Enterovirus de simis 1-18	18
	Enterovirus bovins 1 i 2	2
Enterovirus porcins 1-13	13	
<b>Parechovirus</b>	Parechovirus humans	2
	Virus Ljungan	2 (?)
<b>Hepatovirus</b>	Virus de l'hepatitis A*	1
<b>Rhinovirus</b>	Rhinovirus humans	99
	Rhinovirus bovins 1-3	3
<b>Aphthovirus</b>	Virus de la malaltia peu-boca (FMDV)	7
	Virus de la rinitis equina A	1
<b>Cardiovirus</b>	Virus d'encefalomiocarditis	1
	Theilovirus	2
<b>Erbovirus</b>	Virus de la rinitis equina B	2
<b>Kobuvirus</b>	Virus Aichi	1
<b>Teschovirus</b>	Teschovirus porcí	10
<b>No designats</b>		>18
		<b>Total &gt;251</b>

\*Anys endarrera apareixien com a enterovirus 72 dins el gènere Enterovirus.

### 3.a. Classificació

Pel que fa a la classificació dels enterovirus humans, aquesta ha patit variacions respecte a la que es presenta a la taula 3.1 a partir de les anàlisi de les seqüències d'àcid nucleic, quedant actualment establerta com segueix. Els 65 serotips d'enterovirus humans es classifiquen en 5 grups, enumerats de l'1 al 5:

1. **poliovirus** tipus 1-3
2. **enterovirus humans A (HEV-A)**: 11 coxsackievirus A i enterovirus 71
3. **enterovirus humans B (HEV-B)**: tots els coxsackievirus B, coxsackievirus A9, tots els echovirus i enterovirus 69 i 73.
4. **enterovirus humans C (HEV-C)**: 11 coxsackievirus A
5. **enterovirus humans D (HEV-D)**: enterovirus 68 i enterovirus 70

Aquesta classificació fou establerta per Mayo i Pringle (1998) i Pringle (1999) i coincideix amb l'anàlisi filogenètic de les regions que codifiquen per proteïnes de la càpside o la regió que codifica per la polimerasa 3D realitzat per Hyypiä et al (1997) i Pöyry et al (1996). La seqüenciació de la regió codificant VP1 confirma la classificació dels

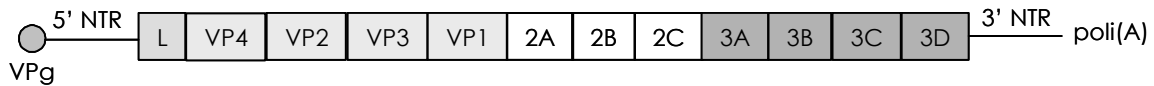
enterovirus en els 5 grups anteriorment definits (Caro et al, 2001). Aquesta és la classificació acceptada actualment pel Comitè Internacional de Taxonomia Vírica (ICTV) per als enterovirus humans (ICTV, 2001).

### 3.b. Genoma

El genoma dels picornavirus està format per una única molècula d'ARN de cadena simple i polaritat positiva poliadenilada a l'extrem 3'. Les comparacions de seqüències assenyalen variacions de mida en els ARN dels picornavirus amb rangs entre 7.209 i 8.450 bases.

La molècula d'ARN es divideix en regions que codifiquen proteïnes les quals es troben flanquejades per dues regions no traduïdes (5' i 3' NTR) no codificants, reguladores (Figura 3.1) les seqüències de les quals són altament conservades i en les que presumiblement es troben senyals per a la unió de la replicasa que inicia la síntesi de l'ARN a partir dels extrems 3' de les cadenes positives i negatives . Tots els ARN actuen com a ARN missatger i codifiquen per una gran poliproteïna (2.178 a 2.332 aminoàcids). La longitud del fragment poliadenilat també varia de mida.





**Figura 3.1.** Estructura de l'ARN genòmic dels picornavirus i organització de la seva poliproteïna.

La regió L (*leader protein*) només es localitza als genomes de *Cardiovirus* i *Aphthovirus*. La proteïna petita VPg (*virion protein, genome*) està unida a l'extrem 5' de l'ARN. La longitud d'aquesta proteïna varia molt poc entre els diferents virus. La regió 5'NTR és extremadament llarga (624 a 1.200 bases) en comparació amb les regions homòlogues dels mARN cel·lulars. La regió 3'NTR és relativament curta (47 a 126 bases). A partir de la regió codificant es sintetitza una poliproteïna que pateix una cascada de proteòlisi per tres proteïnases codificades pel virus, generant 11 productes finals (sense comptar la proteïna L). Les regions VP codifiquen per proteïnes estructurals de la càpside. Aquestes quatre proteïnes estructurals, VP1, VP2, VP3 i VP4 es sintetitzen com una única poliproteïna que pateix proteòlisi posterior durant el cicle de replicació viral. La regió 2 conté gens involucrats en la síntesi de l'ARN genòmic i codifica per la proteïna 2A involucrada en el fenomen de "shut off" de síntesi proteica de la cèl·lula hoste. La regió 3 codifica entre d'altres, per una proteasa.

Els enterovirus presenten una elevada heterogeneïtat de seqüències intratípus a les regions hipervariables, generada a partir d'errors durant la replicació del genoma viral, tant si aquesta es produeix *in vivo* com *in vitro* (Holland et al, 1982; Kinnunen et al, 1990; Nottay et al, 1981; Ward i Flanagan, 1992). La variació en la seqüència en un únic serotip, per moltes regions del genoma, sovint és més alta que l'observada entre serotips (Drebot et al, 1994; Kopecka et al, 1995; Pöyry et al, 1992; Zoll et al, 1994). Quan es comparen les seqüències de la regió codificant VP1 (regió considerada hipervariable) d'aïllaments epidemiològicament no relacionats d'un únic serotip, s'observa al voltant d'un 25% de divergència a nivell nucleotídic que correspon a un 17% de divergència a nivell de seqüència d'aminoàcids. La variació de seqüències intratípica també s'observa a les regions no traduïdes (NTR) i als gens no estructurals però amb menor extensió.

Un altre fenomen a considerar que indueix variabilitat en els genomes dels virus ARN, a més de la mutació, és la recombinació, fenomen relativament freqüent en l'evolució dels genomes

dels enterovirus (Santti et al, 1999). En el cas de poliovirus, la recombinació natural és freqüent i es confirma, per exemple, l'existència de soques de poliovirus recombinants derivades de serotips vacunals i salvatges (Dahourou et al, 2002). Alhora es suggereix que la recombinació es possible entre diferents serotips d'echovirus quan múltiples soques epidèmiques es troben circulant simultàniament a la població (Oprisan et al, 2002). Quan diferents genotips tenen l'oportunitat d'infectar el mateix individu, s'excreta una gran proporció de virus amb genomes recombinants.

### 3.c. Morfologia

Els enterovirus presenten una càpside de simetria icosaèdrica formada per 60 còpies de cadascuna de les quatre proteïnes anomenades VP1, VP2, VP3 i VP4. Són virus nus, sense embolcall, de mida petita (20-30 nm). Dins de cada grup existeixen un nombre de serotips determinat, definits pels epítops de la càpside, els quals es deuen a modificacions estructurals de la superfície del virió. Les proteïnes estructurals, especialment els llocs antigènics, mostren variació intertípica. Aquest fet es demostra per anàlisi de seqüències (Kinnunen et al, 1990) i per reactivitat diferencial d'aïllaments utilitzant jocs d'anticossos neutralitzants

monoclonals (Crainic et al, 1983; Kinnunen et al, 1990; Peigue-Lafeuille et al, 1990; Prabhakar et al, 1982; Webb et al, 1986).

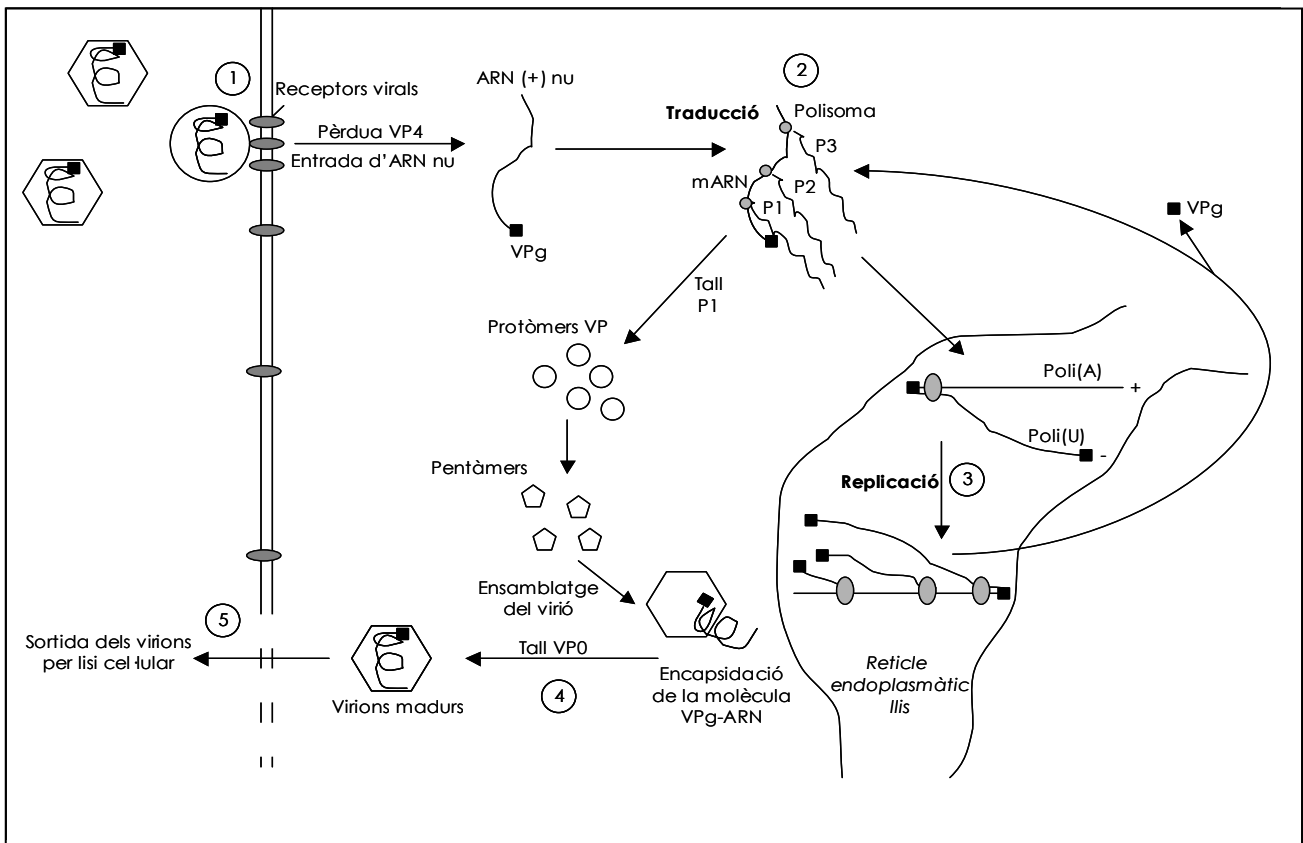
Els epítops antigènics que defineixen cada serotip, estimulen la producció d'anticossos específics que es comporten com a neutralitzants de la infecció. L'evolució dels serotips segueix un procés de deriva antigènica, en el que durant el procés de còpia del genoma es produeixen errors que introdueixen mutacions puntuals. Aquestes mutacions són acumulatives i modifiquen progressivament les proteïnes de la càpside.

### 3.d. Replicació

La replicació dels enterovirus, i dels picornavirus en general, es produeix al citoplasma de la cèl·lula hoste. El cicle replicatiu dels enterovirus és lític i s'esdevé completament en 5-10 hores (típicament 8 hores). L'esquema de la figura 3.2 mostra el cicle replicatiu dels enterovirus. En la primera fase de reconeixement virus-cèl·lula intervé un receptor cel·lular el qual és, per a la majoria dels picornavirus, una molècula que pertany a la superfamília de les immunoglobulines que es troba present en diferents òrgans diana, com el cor, el sistema nerviós central, el fetge o l'intestí. Després de la unió al receptor es pot donar un fenomen de

desadsorció però si aquest es produeix, la partícula vírica que ha patit canvis conformacionals que duen a la pèrdua de la proteïna VP4, perd la capacitat d'infecció. Aquests canvis corresponen al primer estat de pèrdua de càpside. La unió del virió als receptors cel·lulars provoca la pèrdua de la proteïna VP4 generant partícules no infeccioses i l'alliberament de l'ARN viral dins el citoplasma cel·lular a través de canals de membrana (1). L'ARN genòmic es tradueix directament mitjançant la formació de polisomes amb els ribosomes de la cèl·lula hoste (2). Al cap de 30 minuts aproximadament, la síntesi de proteïna cel·lular decau marcadament, gairebé fins a ésser nul·la, efecte conegut com a "shut off", la primera causa d'efecte citopàtic. Aquest efecte es desenvolupa pel trencament d'una proteïna (CBC- *Cap Binding Complex*) localitzada a l'extrem 5' dels ARNm de la cèl·lula hoste. El genoma dels picornavirus codifica a la regió 5'-NTR per una proteïna (IRES- *Internal Ribosome Entry Site*) que substitueix a la proteïna CBC per tal que es pugui procedir amb la traducció de l'ARN viral després de la degradació de CBC. El producte de la traducció de l'ARN viral és una poliproteïna que

pateix talls successius mitjançats per l'acció d'una proteasa viral. Tots els talls són altament específics. Un dels productes generats a partir d'aquests trencaments de la poliproteïna és una ARN polimerasa-ARN depenent la qual copia la cadena positiva corresponent a l'ARN viral produint una cadena negativa d'ARN, la qual serveix de motlle per a la síntesi de noves cadenes positives d'ARN que donaran lloc als nous genomes virals (3) o que es traduiran per a la formació de les proteïnes virals. S'han proposat diversos models per explicar el procediment de replicació del genoma viral. Un cop sintetitzat l'ARN genòmic i les proteïnes estructurals del virió, es creu que es produeix l'encapsidació de la molècula VPg-ARN per part de càpsides preformades tot i que el mecanisme d'interacció entre l'ARN i les proteïnes no està clar. Les càpsides buides són un producte que s'obté en totes les infeccions per picornavirus. Un cop es disposa del pro-virió (ARN i càpside) aquest pateix una maduració per trencament de la proteïna VP0 produint les proteïnes estructurals VP2 i VP4 (4). Finalment els virus surten de la cèl·lula hoste per lisi d'aquesta (5).



**Figura 3.2.** Esquema del cicle de replicació dels picornavirus.

### 3.e. Característiques dels enterovirus que apareixen en l'estudi

#### Poliovirus

Els tres serotips de poliovirus no presenten antígen comú per a tots ells i, tot i que tenen propietats físiques idèntiques, només presenten d'un 36 a un 52% d'homologia nucleofídica. Són els agents causants de la poliomièlitis, entre d'altres.

#### Coxsackievirus

Els coxsackievirus es diferencien d'altres enterovirus per la seva

patogenicitat en ratolins immunosuprimits. Es divideixen en dos grups depenent de les lesions provocades en aquest model animal:

- Coxsackievirus A – produeixen miòsitis difusa amb inflamació aguda i necrosi de les fibres de la musculatura voluntària.
- Coxsackievirus B – produeixen àrees focals de degeneració al cervell, necrosi dels músculs esquelètics i inflamació de les plaques grasses dorsals, el pàncreas i de vegades, el miocardi.

Existeixen antígens específics per a cadascun dels serotips corresponents

als dos grups, però tots els tipus del grup B i cox A9 formen un grup antigènic. A més, hi ha reactivitat creuada entre molts virus del grup A però no es troben antigens comuns.

### **Echovirus**

Els primers echovirus foren trobats accidentalment en femtes humanes sense cap associació amb una malaltia concreta, durant la realització d'estudis epidemiològics de poliovirus. Aquests reberen el nom d'echovirus com acrònim de "*Enteric Cytopathogenic Human Orphan viruses*". Aquests virus produïen efecte citopàtic en cultiu cel·lular però no induïen lesions patològiques detectables en ratolins immunosuprimits. No hi ha grups antigènics d'echovirus però es produeixen reaccions creuades entre algunes parelles.

### **3.f. Patogènia dels enterovirus**

Els enterovirus penetren dins l'organisme per via oral o nasofaríngea i s'estableix un període d'incubació que oscil·la entre 2 i 30-40 dies. Multipliquen localment al teixit limfoide de la faringe i les plaques de Peyer de l'intestí i després es disseminen per via sanguínia a altres teixits diana com la pell, el miocardi, les meninges, el pàncreas, el fetge, etc. on repliquen. Els símptomes poden ser el resultat

directe de la destrucció de cèl·lules diana als teixits (és el cas de la poliomièlitis) o poden deure's a la resposta immune contra els virus (model murí de miocarditis per coxsackie B) (Knipe i Howley, 2001).

La majoria de les infeccions són abortives per l'existència d'anticossos neutralitzants. Els anticossos IgG, IgM i IgA apareixen ràpidament durant el curs de la infecció. La immunitat és predominantment humoral, específica de serotip i de llarga durada (els anticossos persisteixen durant tota la vida). Les persones doncs, amb un dèficit d'immunitat humoral, tenen major risc de desenvolupar la malaltia paralítica quan s'utilitza la vacuna oral antipolio amb virus atenuats (Sabin, OPV), essent recomanable en aquests casos la utilització de la vacuna parenteral de virus inactivats (Salk, IPV).

Es coneixen més de 70 tipus d'enterovirus que causen infeccions, sovint asimptomàtiques o clínicament inaparents, però que, en un petit percentatge de casos originen malalties greus del sistema nerviós central, com meningitis asèptica, encefalomièlitis, ataxia cerebelar, síndrome de Guillain-Barré, mièlitis transversa i poliomièlitis, entre altres (Taula 3.2). Tot i que determinats enterovirus s'associen freqüentment amb brots epidèmics donant lloc a un síndrome específic, els mateixos serotips poden, en altres ocasions, ésser

responsables d'infeccions esporàdiques, amb diferents manifestacions clíniques. I a l'hora, diferents virus poden produir el mateix síndrome, fet pel qual, les manifestacions clíniques no són una bona base per al diagnòstic (Knipe i Howley, 2001).

Els poliovirus són els agents causants, entre d'altres, de la poliomièlitis. Aquesta malaltia es caracteritza per una infecció aguda que afecta de manera greu al sistema nerviós central, amb destrucció de les neurones motores de la medul·la espinal, produint paràlisi flàccida. El període d'incubació en el cas de la infecció per poliovirus és normalment de 7 a 14 dies. Després de la ingestió, el virus multiplica a les mucoses orofaríngea i intestinal. Finalment envaeixen el sistema limfàtic provocant virèmia. Les manifestacions clíniques de la infecció poden ser de tres tipus: en un 90-95% dels casos hi ha infecció subclínica asimptomàtica. En un 4-8% dels casos hi ha infecció abortiva amb símptomes de la malaltia lleus que poden anar acompanyats de meningitis asèptica. En un 1-2% dels casos es desenvolupa la malaltia. Normalment apareixen símptomes de meningitis asèptica que deriven en paràlisi flàccida. Quan hi ha infecció de la medul·la pot produir-se paràlisi respiratòria i mort.

La identificació de poliovirus es pot realitzar a partir de mostres de femtes, frotis de la faringe i frotis rectals.

Rarament s'aïlla de fluid cerebroespinal. Es pot cultivar i identificar la presència en cultiu cel·lular i calen, entre d'altres, tècniques moleculars per diferenciar entre tipus salvatges i vacunals. Pel que fa a la prevenció, no hi ha cap teràpia antiviral disponible per tant, la malaltia ha de prevenir-se a través de la vacunació. Hi ha dues vacunes disponibles:

- i. **La vacuna de poliovirus inactivats o vacuna Salk (IPV)** (Salk i Salk, 1977) consisteix en virus inactivats per tractament amb formalina corresponents als tres serotips que s'administren per via intramuscular. No indueix immunitat local ni prevenció de la infecció al tracte intestinal. Preveu la poliomièlitis paralítica ja que la virèmia és essencial per a la patogenicitat de la malaltia.
- ii. **La vacuna de poliovirus atenuats o vacuna Sabin (OPV)** (Sabin i Boulger, 1973) consisteix en virus atenuats corresponents als tres serotips. Aquesta produeix immunitat local a través de la inducció d'una resposta amb IgA i produeix a l'hora immunitat sistèmica. Al voltant d'una de cada 3 milions de dosis causa poliomièlitis paralítica. Molts països utilitzen aquesta vacuna pel fet que indueix immunitat local i és més barata de produir que la IPV. La taxa de resposta normal a la

vacunació amb OPV és del 100%. Aquesta és la vacuna utilitzada per la OMS en les campanyes de vacunació per a l'eradicació de la poliomielitis.

Els virus coxsackie del grup A produeixen una varietat de malalties que inclouen la meningitis asèptica, herpangina, mialgia epidèmica (pleurodinia o malaltia de Bornholm), síndrome de ma-peu-boca, miocarditis, pericarditis, neumonia, exantema cutani i refredat comú. S'han relacionat també amb malformacions congènites i alguns tipus de diabetis (Knipe i Howley, 2001).

D'altra banda, per als coxsackievirus del grup B, a més de les malalties enumerades per als del grup A, es presenten evidències que les infeccions per aquests tipus de virus juguen un paper important en l'etiologia de la diabetis mellitus dependent d'insulina (DM-I). Alguns estudis post-mortem de pacients amb cetoacidosis diabètica han relacionat determinats virus d'aquest grup amb aquesta patologia, particularment el virus coxsackie B4. Tot i que la seva implicació en el desenvolupament de la DM-I sembla possible, queda per determinar si els virus inicien els processos que donaran lloc a la diabetis o bé precipiten la malaltia en aquells pacients amb la funció endocrina ja malmesa. Pel que

fa a aquesta malaltia però, cada cop hi ha més evidències que diferents enterovirus jugarien un paper en l'etiologia de la DM-I, no només coxsackievirus B (Haverkos et al, 2003). També s'han relacionat els virus coxsackie B4, B5 i el grup A amb la pancreatitis als adults.

La meningitis asèptica, certes malalties febrils amb o sense exantema cutani i el refredat comú també es relacionen amb els echovirus (Knipe i Howley, 2001). A més, en teixit del sistema nerviós central de pacients amb esclerosi lateral amiotròfica es detecten seqüències genòmiques d'echovirus 6 i echovirus 7 (Knipe i Howley, 2001).

Hi ha una gran miscel·lània de quadres clínics en els que es troben implicats els enterovirus. El síndrome de fatiga crònica, caracteritzat per una debilitat del múscul esquelètic, acompanyada de miàlgies, cefalees, dificultat de concentració, parestèsies, etc. s'ha associat amb múltiples agents etiològics vírics, essent els enterovirus un d'ells (Lane et al, 2003).

Les tècniques emprades per al diagnòstic de les infeccions enterovirals són diverses i inclouen, tècniques de cultiu cel·lular, de detecció d'antígens, de detecció d'àcid nucleic, serologia i tècniques de test de susceptibilitat a antivírics.

**Taula 3.2.** Malalties causades pels diferents grups d'enterovirus.

Grup d'Enterovirus	Manifestació clínica
Poliovirus	Poliomielitis paralítica* Meningitis asèptica Síndrome febril
Coxsackievirus A	Meningitis asèptica Herpangina Síndrome febril Conjuntivitis Síndrome ma-peu-boca
Coxsackievirus B	Meningitis asèptica Síndrome neonatal greu Miopericarditis Encefalitis Pleurodinia epidèmica o malaltia de Bornholm Síndrome febril
Echovirus	Meningitis asèptica Conjuntivitis Exantema cutani Síndrome neonatal greu Síndrome febril
Enterovirus 68-71	Meningitis asèptica Síndrome de pseudo-polio Síndrome ma-peu-boca (Ent 71) Conjuntivitis epidèmica (Ent 70)

\*El símptoma clínic de poliomielitis paralítica emprat per al seguiment de l'eradicació d'aquesta malaltia és la paràlisi flàccida aguda.

### 3.g. Epidemiologia

L'home és l'únic reservori conegut per als enterovirus que l'afecten. La transmissió d'aquests enterovirus humans és, fonamentalment, per via fecal-oral i respiratòria. La via més freqüent és la directa persona a persona, trobant-se un gran nombre de

portadors sans. A més, es donen casos de transmissió per fomites (superfícies inanimades) i la presència d'aquests virus a l'aigua, pot fer que aquest medi esdevingui un vehicle de transmissió d'aquests microorganismes.

Els enterovirus poden trobar-se en forma endèmica o presentar-se en



brots epidèmics que es descriuen més freqüents a l'estiu i la tardor, en societats que presenten un nivell socioeconòmic baix i en la fracció de població corresponent a lactants i nens.

La poliomièlitis es produïa arreu del món abans de la introducció dels programes de vacunació. Aquesta malaltia i poliovirus es troben actualment en procés d'eradicació a nivell mundial. L'objectiu 5 de l'estratègia de "Salut per a tots l'any 2000" de la OMS plantejava l'eradicació de poliovirus per a finals de l'any 2000; actualment s'espera per al 2005. S'entén per eradicació la reducció a zero permanent a nivell mundial de la incidència d'una infecció causada per un agent específic. Aquesta reducció és el resultat d'esforços deliberats i per al seu manteniment no calen mesures d'intervenció durant períodes llargs de temps (Hinman, 1999).

Per a l'eradicació de la poliomièlitis, la OMS ha elaborat un "Pla d'actuacions per a l'obtenció del Certificat d'Eradicació de la

Poliomièlitis" en el que Espanya participa dins del grup europeu. Les actuacions que aquest grup considera necessàries per a la consecució del certificat són:

- i) implantar un sistema de vigilància eficaç de la paràlisi flàccida aguda,
- ii) aconseguir i mantenir altes cobertures de vacunació,
- iii) organitzar un sistema de vigilància ambiental i,
- iv) realitzar un estudi sero-epidemiològic que valori l'estat immunitari de la població front el virus de la poliomièlitis.

Aquestes quatre actuacions s'estan duent a terme a Espanya des de 1997. El tercer dels punts, es pot considerar una raó més que determina la importància de la correcta determinació de presència d'enterovirus en mostres ambientals.

Segons informes de la OMS, poliovirus ha estat eradicat de moltes regions del món amb les excepcions del subcontinent indi i regions de l'Àfrica sud-sahariana.

## 4. PERSPECTIVES EN VIROLOGIA AMBIENTAL

---

Durant els darrers 50 anys s'ha desenvolupat a la comunitat científica, una preocupació creixent pel problema dels virus de transmissió hídrica, tant en els aspectes metodològics com epidemiològics. Als inicis de la virologia ambiental els primers esforços per als temes que incloïen la salut pública i la recerca epidemiològica, es centraren en la detecció de poliovirus i la seva distribució en l'ambient. Les preguntes sobre la implicació que tenia a nivell de salut pública la presència dels virus entèrics a l'aigua, van sorgir en aquest moment, quan es va posar de manifest la presència de poliovirus a nivell del tracte entèric i van plantejar-se dues qüestions: si poliovirus és un patògen de tracte entèric, és un patògen de transmissió hídrica? Pot transmetre's directa o indirectament per contaminació a partir dels virus presents en aigua residual? Cal considerar els estudis realitzats per Melnick els anys 50s, els quals van determinar que, quan els casos de paràlisi són prevalents a la comunitat, poliovirus es troba present en aigua residual en grans nombres i es mantenen infecciosos en ella durant diverses setmanes. Estimant la quantitat de virus excretats diàriament per un portador típic, Melnick va determinar que la relació entre les infeccions

asimptomàtiques i els casos que desenvolupaven paràlisi havia de trobar-se sobre 100:1 (Metcalf et al, 1995). Des de llavors, l'interès s'ha estès a altres virus.

Tot i que es troben nombres elevats d'enterovirus en aigua residual i que aquests poden aïllar-se regularment a partir d'aigües contaminades, els brots atribuïts a l'aigua contaminada per enterovirus són pocs, i les evidències que connecten la presència d'enterovirus en l'aigua residual amb un possible paper d'aquesta en la transmissió de malalties virals són pobres. En canvi, hi ha evidència de transmissió de la malaltia per aigua contaminada per a diferents virus; HAV, calicivirus humans, virus de Norwalk, virus tipus Norwalk, HEV, rotavirus i astrovirus.

L'interès per la presència de virus entèrics patògens al medi aquàtic es seguí desenvolupant des dels inicis de la virologia ambiental i, el 1979, la OMS publicava un informe del "Grup científic de la OMS especialitzat en virus humans en aigua, aigua residual i sòl" (WHO, 1979) en el qual s'inclouïa la participació de la USEPA (*United States Environmental Protection Agency*). En aquest informe es recolliren una sèrie de conclusions i recomanacions

algunes de les quals es resumeixen a continuació.

- La contaminació de l'aigua i el sòl amb aigua residual i femtes humanes que continguin virus pot suposar problemes reals de salut pública, un fet aplicable també, a àrees del món en que la majoria de les malalties bacterianes de transmissió hídrica estan sota control.
- La constant exposició de grans grups de població a nombres relativament petits de virus entèrics en grans volums d'aigua poden conduir a un estat endèmic de disseminació de virus a la comunitat, el qual pot i ha de prevenir-se.
- Els mètodes per a la concentració i el recompte de virus en grans volums d'aigua no estan estandarditzats i caldria fer-ho.
- Haurien d'analitzar-se l'aigua de beguda, les fonts d'abastament, els

efluents de depuradora destinats a la reutilització per al consum domèstic i haurien d'establir-se recomanacions addicionals per als límits de concentració viral per a l'aigua per a usos recreacionals i cultiu de marisc i els efluents i fangs de depuradora utilitzats en agricultura.

- Cal recerca sobre els riscos de salut associats amb la presència de virus a l'aigua i al sòl. Els estudis han d'incloure el desenvolupament i l'avaluació de mètodes de detecció de virus i indicadors alternatius de contaminació viral (bacteriòfags) i l'establiment de mètodes per a la inactivació i l'eliminació d'aquests.

Val a dir que, les conclusions del grup especialitzat de la OMS podrien ésser encara vigents avui dia en molts dels casos i que, les recomanacions, tot i tractar-se del 1979, en molts punts estan encara per resoldre's.

## 5. MÈTODES DE DETECCIÓ DE VIRUS A L'AMBIENT AQUÀTIC

---

### 5.a. Antecedents

Des dels inicis de la virologia ambiental, els mètodes s'han desenvolupat en dos fronts, la detecció i la concentració de virus. Pel que fa als mètodes de detecció, aquests han seguit una evolució des dels inicials que

implicaven el desenvolupament d'una infecció detectable en animals de laboratori o ous embrionats, la detecció d'efecte citopàtic en cèl·lules en cultiu, d'altres basats en mètodes immunològics i finalment, els mètodes que detecten l'àcid nucleic o genoma viral. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i la transcripció

reversa seguida de PCR (RT-PCR) són tècniques ràpides, sensibles, específiques i quantitatives. Aquestes tècniques són les úniques disponibles per a la detecció en aigua de determinats virus (HAV, HEV, norovirus, rotavirus i astrovirus) que no es cultiven sobre cèl·lules o ho fan amb molta dificultat. Els inconvenients principals són la inhibició per substàncies presents en mostres ambientals i la incapacitat de diferenciar entre virus infecciosos i no infecciosos a partir dels resultats obtinguts. A més, es reconeixen altres inconvenients de la tècnica com l'anomenat "efecte màquina" i el fet conegut com *PCR bias* (Urban et al, 2003). Les qüestions que es plantegen al voltant de la utilització de les anàlisi basades en tècniques de PCR per als estudis relacionats amb temes de salut, es centren en saber quina és la significació per a la salut pública d'un resultat positiu i si les anàlisi directes per a determinats virus podrien substituir els programes de seguiment ambiental relacionats amb la salut pública actuals.

D'altra banda, s'han desenvolupat tècniques de concentració de virus a partir de diferents mostres ambientals. Aquestes tècniques inclouen, adsorció-elució a filtres, adsorció-elució a pols de vidre, adsorció-floculació amb polielectrolits, adsorció-floculació amb hidròxid d'alumini, floculació orgànica, precipitació amb protamina, ultrafiltració, hidroextracció i, separació

en dues fases. Alguns d'aquests mètodes són poc eficients en determinades circumstàncies i cap d'ells té una aplicació universal en l'actualitat. Hi ha molts canvis en la qualitat química dels residus i les aigües residuals i els efectes imprevisibles d'aquests canvis en les eficiències dels mètodes per concentrar quantitativament virus a partir de les aigües és un problema amb el que ens trobem constantment. Així, els mètodes sempre necessiten una selecció i una flexibilitat per a cadascuna de les situacions.

Malgrat doncs, els esforços realitzats, els mètodes per a la recuperació de virus no han avançat com fóra desitjable. El nombre de mètodes estandarditzats és mínim. Només la *American Public Health Association* (APHA), la *American Water Works Association* (AWWA) i la *Water Pollution Control Federation*, a través de la seva publicació "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", la *American Society for Testing Materials* (ASTM) i la *U. S. Environmental Protection Agency* (USEPA) recomanen mètodes per a la recuperació de virus a partir de l'ambient aquàtic. A Europa, la Comissió Europea de Normalització (CEN) està en la fase final d'acceptació d'un mètode per la determinació d'enterovirus en aigua. L'estat actual de la situació requereix fer les següents consideracions:

- Canvis en la qualitat de l'aigua a analitzar poden afectar marcadament l'eficiència de cada mètode descrit. En aquest sentit, val a dir que es disposa de pocs estudis que comparin l'eficiència de diferents mètodes en les mateixes condicions, amb les mateixes qualitats de mostra.
- Cap dels mètodes descrits ha estat estudiat amb més d'uns pocs virus. S'han realitzat molts estudis a nivell de laboratori però gairebé no hi ha estudis de camp.
- Cap dels mètodes és igualment eficient per a la recuperació de tots els tipus de virus trobats més freqüentment en matris aquoses ambientals.
- Algunes de les tècniques descrites són costoses de feina i d'altres requereixen equipament car.

### 5.b. Concentració de virus

Com s'ha assenyalat anteriorment, els virus sovint es troben a l'ambient en concentracions massa baixes que no permeten la detecció directa. En aquests casos la mostra ha d'ésser processada per tal concentrar els virus presents en ella en volums petits, normalment menys de 50 mL, que puguin avaluar-se directament. Els mètodes de concentració són necessaris amb la possible excepció de

les mostres corresponents a aigua residual bruta en certes àrees o períodes de l'any. S'han proposat nombrosos mètodes de concentració de virus entèrics els quals han estat assajats sota condicions de laboratori amb mostres contaminades experimentalment i en alguns casos, emprats per detectar virus en condicions de camp.

Per tal que un mètode sigui òptim per a la pràctica de la concentració de virus, hauria de seguir els següents criteris:

- ésser tècnicament fàcil
- poder realitzar-se en poc temps
- tenir altes taxes de recuperació de virus
- concentrar un ampli rang de virus
- produir un volum petit de concentrat
- ésser econòmic
- ésser capaç de processar grans volums d'aigua
- ésser repetible (dins el laboratori) i reproducible (a diferents laboratoris)
- ésser aplicable a aigües de diferent qualitat

No hi ha un mètode únic que aconsegueixi amb tots els requeriments. Hi ha quatre aproximacions principals atenent a les propietats de les partícules víriques, les quals s'han desenvolupat i aplicat durant els últims 50 anys i cada tècnica conté

nombroses variacions (Taula 5.1). D'aquesta manera es comptabilitzen més d'un centenar de mètodes diferents de concentració de virus.

La majoria dels procediments s'han utilitzat per concentrar virus a partir de volums de mostra d'1 a 100 litres, i alguns (principalment els basats en cartutxos) són adients per volums de 1000 L o més. Però els mètodes de concentració de virus sovint només són capaços de processar volums limitats d'aigua d'una determinada qualitat. Per seleccionar un mètode de concentració cal considerar la probable densitat viral a la mostra, les limitacions de volum del mètode per al tipus d'aigua a analitzar i, la presència de constituents que puguin interferir en el procés de concentració de virus. Així doncs, habitualment, els volums de concentració recomanats depenen del tipus de mostra. Tradicionalment, les guies que es podrien prendre serien les següents. L'aigua subterrània i de beguda conté molt pocs virus i cal processar volums de mostra de 100 L o més, mentre que les aigües recreacionals i de riu poden contenir més virus i llavors és suficient processar volums de 10 L. Els efluent de depuradora que provenen de tractaments secundaris contenen alts nivells de virus i és suficient l'anàlisi de volums d'1 L de mostra. Els virus en aigua residual bruta poden detectar-se directament (en pocs mil·lilitres) o, com

a molt, cal processar volums de 100 mL de mostra.

Els procediments de concentració de virus a partir de mostres aquoses poden classificar-se en sistemes de concentració primaris i secundaris (o reconcentració). S'entén com a mètode de concentració primari aquell que permet passar de grans volums de mostra (varis litres) a 1 litre i, com a mètode de concentració secundari aquell que permet recuperar els virus presents en aquest litre en pocs mil·lilitres. Dins els procediments emprats per a la concentració primària es troba el mètode de filtració-elució a través de filtres microporus. Val a dir que de vegades la classificació en mètode de concentració primari o secundari no pot definir-se clarament.

La descripció del mètode de determinació de virus adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa (*VIRus Adsorption Enumeration*) Viraden (Papageorgiou et al, 2000), permet l'aplicació d'aquest com a nou sistema de concentració de virus a partir de mostres ambientals. El mètode Viraden, com es veurà durant el decurs del treball, pot aplicar-se com a mètode de concentració primari (aplicat fins al moment per a volums de mostra de fins a 10 litres) i com a mètode de concentració secundari.

Els mètodes que es recullen a manera de resum a la taula 5.1 presenten

actualment multitud de modificacions per tal de fer-los més eficients i adaptar-los a les condicions dels diferents tipus d'aigua a concentrar.

La majoria de mètodes de concentració de virus es basen en procediments d'adsorció-elució. Els virus poden concentrar-se adsorbint-los de manera reversible a filtres microporus i després eluir-los d'aquests filtres en volums petits de líquid. Les mostres són filtrades, generalment a pressió, i els virus queden adsorbits sobre els suports, presumiblement per interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques. Hi ha dos tipus de filtres adsorbents disponibles: els filtres electronegatius (amb superfície carregada negativament) i els filtres electropositius (amb superfície carregada positivament). Els filtres electronegatius generalment estan compostos d'èsters de cel·lulosa o de fibres de vidre amb resines orgàniques. Aquests adsorbeixen virus molt eficientment en presència de cations polivalents com  $Al^{3+}$  i  $Mg^{2+}$  i/o a pH àcid, normalment pH 3,5. Quan s'afegeixen ions a la mostra es fa necessari un pas de rentat del filtre amb NaOH 0,14 M abans de l'elució dels virus. Els filtres electropositius estan compostos de fibra de vidre o cel·lulosa i resines polimèriques orgàniques carregades positivament. Aquests adsorbeixen els virus eficientment dins un ampli rang de pH sense necessitat d'afegir ions polivalents. Si la mostra és

neutre o àcida, pot processar-se amb aquest tipus de filtres sense condicionament químic. Quan s'utilitzen filtres electropositius només cal assegurar que el pH de la mostra no sigui superior a 8 ja que en aquest cas el filtre perd eficiència molt ràpidament. Els tipus de filtres més utilitzats i recomanats es descriuen a continuació.

Filtres electronegatius:

1. filtres de membrana de nitrats de cel·lulosa de 293 mm de diàmetre i 8 i 1,2  $\mu m$  de diàmetre de porus (Millipore Corp.) o equivalent.
2. filtres de cartutx de fibra de vidre epoxy de 17,8 cm de longitud i 8  $\mu m$  de diàmetre de porus (Balston, Inc.) o equivalent.
3. filtres de cartutx de fibra de vidre i resina acrílica plegada de 25,4 cm de longitud i 0,25 o 0,45  $\mu m$  de diàmetre de porus (Filterite Corp.) o equivalent.

Filtres electropositius:

1. filtres de membrana de cel·lulosa amb superfície modificada i filtres Virosorb 1MDS de 293 mm de diàmetre (CUNO).
2. filtres de cartutx de cel·lulosa modificada amb doble càrrega de medi filtrant plegat de 25 cm de longitud i 0,2  $\mu m$  de diàmetre de porus Virosorb 1MDS (CUNO) o equivalent.

3. filtres de cartutx de cel·lulosa i fibra de vidre combinats amb una resina de melamina Zeta Plus MK (CUNO) o equivalent.

Un estudi entre diferents laboratoris va permetre conèixer les recuperacions obtingudes utilitzant el mètode d'adsorció-elució trobant-se aquestes entre un 9 i un 63% quan es realitzaven els experiments amb nombre de virus baix afegits a l'aigua de beguda i entre un 3 i un 46% quan es realitzaven amb un nombre de virus alt afegits (Melnick et al, 1984).

Els virus adsorbits normalment s'elueixen de les superfícies dels filtres microporus generalment per filtració a pressió d'un petit volum d'eluent a través dels filtres *in situ*. L'eluent pot ser una solució proteínica (extracte de carn) lleugerament alcalina o un tampó més alcalí com el tampó glicina-NaOH a pH 10,5 - 11,5. Si s'utilitza el tampó glicina-NaOH com a eluent, es recomana utilitzar pH 10,5 per la gran probabilitat d'inactivació d'alguns virus a pH elevat. S'han assajat multitud de compostos per tal d'ésser utilitzats com a eluents (Farrah i Bitton, 1978).

Per tal de definir els filtres microporus que oferien millors recuperacions i més avantatges es van realitzar estudis amb diferents filtres i combinacions de filtres millorant la sensibilitat dels sistemes (William et al, 1976; Rose et al, 1984; Shields et al, 1985). Els diferents mètodes mostren una gran variabilitat pel que fa

a l'eficiència d'aquests, proporcionant recuperacions del 24% amb filtres de membrana electropositius 1MDS i del 34% amb filterite electronegatiu (Melnick et al, 1984; Sobsey i Jones, 1979; Sobsey i Glass, 1980). Els mètodes d'adsorció-elució es consideren molt bons quan s'aconsegueixen percentatges de recuperació al voltant del 50%. Modificacions dels filtres electronegatius per addició de polímers catiònics ofereixen recuperacions mitjanes d'enterovirus que van del 75% al 111% (Preston et al, 1988). Dins els filtres electropositius es detecten diferències quan a la recuperació d'enterovirus utilitzant tipus de filtres diferents, obtenint-se recuperacions superiors amb els filtres 1MDS respecte als MK (Ma et al, 1994b). Aquests han estat utilitzats en estudis de camp, i s'han avaluat amb diferents tipus de virus i d'aigües obtenint-se recuperacions variables (Chang et al, 1981). La conservació dels filtres abans del seu processat ha estat també tema d'investigació, observant-se que hi ha pèrdua considerable dels virus adsorbits en 2 dies quan es conserven a 4°C, mentre que la conservació a -70°C ofereix recuperacions estables durant 4 dies (Dahling i Wright, 1984).

Dins els mètodes de concentració primària basats en adsorció-elució, a més dels suports de filtres descrits fins ara, cap la possibilitat d'aplicar altres suports com pols o llana de vidre. Aquests mètodes ofereixen l'avantatge



de poder usar-se per grans volums de mostra (100-500 litres) quan aquesta presenta valors de terbolesa elevats ja que el sistema no es colmata pels sòlids en suspensió presents a la mostra pel fet d'ésser un sistema de filtració dinàmica (Schwartzbrod i Lucena, 1978; Vilagines et al, 1979).

Els mètodes de concentració secundària recomanats, quan aquesta es realitza a partir de solucions proteiques emprades com a eluents són, la floculació orgànica, el procediment d'adsorció-precipitació amb hidròxid d'alumini i la hidroextracció-diàlisi amb PEG (APHA, 1998). Existeixen però, altres mètodes de reconcentració com la liofilització (Villena, 2003). La floculació orgànica, àmpliament utilitzada, implica la precipitació dels virus per acidificació dels eluats a pH 3,5, la recuperació del precipitat per centrifugació i la resuspensió en un volum petit de tampó alcalí. Aquesta o la floculació amb extracte de carn i sulfat d'amoni (Katzenelson et al, 1976; Shields i Farrah, 1986; Bosch et al, 1988) permeten recuperacions que van del 40 al 75% i són òptims per a volums d'un litre. El procediment de floculació orgànica s'ha vist modificat amb l'addició de silicats per incrementar l'eficiència de recuperació de virus a partir de mostres d'aigua (Dahling i Wright, 1986b) o per l'addició de clorur fèrric 25 mM en aquelles solucions que no permeten la floculació a pH 3,5 (Payment et al,

1984). En aquest mateix treball es detecten diferències entre diferents lots d'extractes de carn i es recomana que cada lot s'assagi abans de la seva utilització pel que fa a la recuperació de virus. L'elució amb extracte de carn al 3% a pH 9,0 i la floculació orgànica posterior permet recuperacions que van del 68 al 100% amb una mitjana del 85% per a aigua residual tractada, mostrant-se més eficient la floculació orgànica que la inorgànica (Landry et al, 1978).

**Taula 5.1.** Tècniques de concentració de virus entèrics en aigua.

Tècnica	Mètode	Qualitat de l'aigua	Volum inicial (litres)	Contingut de virus relatiu	Recuperació	Necessita concentració secundària	Cost econòmic	Observacions	Referència
Adsorció-Elució	Gases	Aigua residual bruta o tractada	Gran	Alt	Baixa a mitjana	No	Cap	No quantitatiu	
	Membranes electronegatives	Totes	1-1000	Baix a mitjà	50-60% amb pràctica	Sí	Mitjà	Grans volums requereix bombes dosificadores	APHA, 1998
	Membranes electropositives	Totes	1-1000	Baix a mitjà	50-60% amb pràctica	Sí	Mitjà	No cal condicionament previ	Sobsey i Jones, 1979 APHA, 1998
	Cartutx electronegatiu	Qualsevol amb baixa terbolesa	1-50	Baix a mitjà	Variable: més alt amb aigües netes	Sí	Baix	Pot colmatar-se més ràpidament que les membranes	APHA, 1998
	Cartutx electropositiu	Totes	1-1000	Baix a mitjà	Variable	Sí	Mitjà	Ampli rang de virus	APHA, 1998
	Llana de vidre	Totes	1-1000	Baix a mitjà	Variable	Sí	Baix	No cal condicionament previ	Vilagines et al, 1993

**Taula 5.1.** Tècniques de concentració de virus entèrics en aigua. (Continuació).

Tècnica	Mètode	Qualitat de l'aigua	Volum inicial (litres)	Contingut de virus relatiu	Recuperació	Necessita concentració secundària	Cost econòmic	Observacions	Referència
Adsorció-Elució	Pols de vidre	Totes	<100	Qualsevol	20-60%	Si el volum és més de 100 L	Mitjà	Aparell especial	Schwartzbrod i Lucena, 1978
Atrapament	Membranes d'alginat	Només netes	Baix	Alt	Bona	No	Baix	Molt lent. Es colmata ràpidament si la mostra és tèrbola	
Ultrafiltració	Membranes simples	Netes	Baix	Qualsevol	Variable	No	Mitjà	Lent	
	Flux tangencial i fibres buides	Efluents tractats o millor	Alt	Baix	Variable	De vegades	Alt	Cal prefiltrar per aigües tèrboles	
	Filtració per flux vortejat	Efluents tractats o millor	Alt	Baix	No es coneix	No es coneix	Alt	Manca desenvolupament	Paul et al, 1991
Hidroextracció	PEG o sacarosa	Netes	Baix	Alt	Variable (toxicitat)	No	Negligible	Gran pèrdua de virus per a aigua residual bruta	APHA, 1998

**Taula 5.1.** Tècniques de concentració de virus entèrics en aigua. (Continuació).

Tècnica	Mètode	Qualitat de l'aigua	Volum inicial (litres)	Contingut de virus relatiu	Recuperació	Necessita concentració secundària	Cost econòmic	Observacions	Referència
Ultracentrifugació		Netes	Baix	Alt	Mitjana	No	Alt	Ampli rang, però normalment no pràctic	
Floculació orgànica		Qualsevol	1	Qualsevol	40-75%	No	Mitjà	Ampli rang	Katzenelson et al, 1976
Altres tècniques	Floculació amb clorur fèrric	Qualsevol	<10	Qualsevol	Bona	No	Baix	Quan no flocula bé amb extracte de carn a pH 3,5	Payment et al, 1984
	Adsorció-precipitació amb hidròxid d'alumini	Qualsevol	<10	Qualsevol	70%	No	Baix	Adsorbent no específic	Farrar et al, 1977
	Terra de diatomees	Qualsevol	<10	Qualsevol	80%	No		Modificació de la precipitació amb Al(OH) <sub>3</sub>	Farrar et al, 1991
	Partició bifàsica	Qualsevol	<7	Qualsevol	Variable	No	Baix	Tòxic per les cèl·lules	
	Òxid de ferro magnètic	Netes	<50	Qualsevol	60-80%	No	Baix	Fàcil i econòmic	Rao et al, 1981
	Viraden	Qualsevol	1mL a 10 L	Qualsevol	Alta	No	Baix	No cal elució	Papageorgiou et al, 2000

El procediment de concentració per adsorció-precipitació amb hidròxid d'alumini (Farrah et al, 1977) implica probablement, interaccions electrostàtiques entre la superfície del virus carregada negativament i les superfícies carregades positivament de l'hidròxid d'alumini i la coordinació de la superfície viral amb els complexos hidroxí-alumínics. Els virus s'adsorbeixen a un precipitat d'hidròxid d'alumini que s'afegeix a la mostra o que es forma en ella a partir de sal soluble d'alumini i una base com el carbonat de sodi o l'hidròxid de sodi. Un cop s'ha permès l'adsorció dels virus al precipitat, aquests es recullen per filtració o per centrifugació. El precipitat pot ser inoculat directament en hostes de laboratori per a l'assaig de virus o bé, poden eluir-se els virus del precipitat amb un tampó alcalí o una solució proteínica abans d'assajar-se. L'adsorció viral pot incrementar-se utilitzant grans quantitats d'hidròxid d'alumini, però en aquest cas els virus adsorbits esdevenen més difícils d'eluir. És per això que per aconseguir la màxima recuperació de virus s'utilitzen quantitats intermèdies d'hidròxid d'alumini. A més, l'hidròxid d'alumini és un adsorbent no específic que pot concentrar altres substàncies a més dels virus. La presència d'aquestes impureses pot fer que la mostra concentrada esdevingui tòxica per als cultius cel·lulars emprats habitualment en els assaigs virals.

Aquest procediment permet recuperacions mitjanes del 70% (Farrah et al, 1978b) i, modificacions d'aquest utilitzant terra de diatomees, permeten recuperacions del 80% i superiors en aigua de beguda per als enterovirus analitzats (Farrah et al, 1991).

La hidroextracció amb PEG és un procés d'ultrafiltració en que la mostra es situa dins una bossa de diàlisi de cel·lulosa i s'exposa al PEG, un material higroscòpic. L'aigua i els microsoluts abandonen la mostra passant a través de la membrana de diàlisi semipermeable mentre que els virus i altres macrosoluts no poden travessar-la. D'aquesta manera el volum de mostra dins la bossa de diàlisi es redueix per pèrdua d'aigua, concentrant així els virus i els macrosoluts. Les investigacions inicials d'aquest mètode comuniquen recuperacions de virus a partir d'aigua residual molt variables.

Quan els eluents són solucions no proteiques (tampó glicina + NaOH) els mètodes més adients són l'adsorció-elució en filtres microporus de diàmetre petit. Els filtres utilitzats en aquest pas de reconcentració poden ser de nou, filtres electronegatius de fibra de vidre i resina acrílica o filtres electropositius Virosorb 1MDS, ambdós de 47 mm de diàmetre. En aquest cas també cal tenir present la necessitat de condicionament previ de la mostra en el cas de la utilització dels filtres electronegatius (APHA, 1998).

Els procediments basats en l'adsorció-elució i la reconcentració posterior emprant diferents mètodes han estat àmpliament utilitzats (Berg et al, 1978; Simmonds et al, 1982; Bosch et al, 1986b; Scheuerman et al, 1987; Bosch et al, 1988; Asano et al, 1992), però s'obtenen eficiències de recuperació molt baixes, del 5 al 10% quan s'apliquen als efluents de depuradora (Bosch et al, 1988).

En els casos de l'elució amb eluents no proteics, pot aplicar-se el mètode Viraden com a mètode de reconcentració. Aquest podria incloure's en els mètodes de filtració a través de filtres electronegatius d'èsters de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre, però amb la característica pròpia del mètode del fet que no cal un segon procediment d'elució, sinó que es segueix amb la determinació directament sobre el cultiu cel·lular dels enterovirus adsorbits.

Els diferents mètodes de concentració presenten avantatges i limitacions per a cadascun d'ells. D'una banda, els mètodes d'adsorció-elució són els que mostren més aplicabilitat per a la concentració de virus a partir de grans volums d'aigua i poden utilitzar-se per a l'estudi d'un ampli rang de mostres amb grans variacions de qualitat i volum. Així, s'han estat utilitzant per concentrar virus a partir de grans volums d'aigua de l'aixeta, aigua residual, aigua de mar i aigua

superficial (Gerba et al, 1978b; Melnick et al, 1984). Aquests mètodes però, presenten diverses limitacions. Entre d'altres, i destacant com a més importants;

- i. el material suspès en la mostra tendeix a colmatar els filtres adsorbents, limitant d'aquesta manera el volum que pot ser analitzat i interferint possiblement en el procés d'elució (Sobsey i Cromeans, 1985).
- ii. La matèria orgànica dissolta i col·loidal present en algun tipus d'aigua pot interferir amb l'adsorció dels virus als filtres (Wallis i Melnick, 1967; Farrah et al, 1976), presumiblement per competència amb els virus pels llocs d'adsorció i a més, pot interferir de nou en l'elució dels virus (Guttman-Bass i Catalano-Sherman, 1986; Simmonds et al, 1982; Guttman-Bass i Nasser, 1984). Tot i això, l'efecte de reducció de l'adsorció de virus varia amb el tipus de virus i les condicions d'adsorció. Per als filtres electropositius la interferència de la matèria orgànica és igual per diferents tipus de virus (poliovirus, echovirus, reovirus i adenovirus) mentre que per als filtres electronegatius hi ha més interferència per als enterovirus que per a reovirus i adenovirus, tot i que aquest fet pot disminuir-se amb l'addició de  $MgCl_2$  (Sobsey i Glass, 1984).

iii. D'altra banda, els virus que es troben adsorbits als sòlids en suspensió poden ésser eliminats si s'aplica a la mostra algun procediment de clarificació previ a l'adsorció. Aquests virus associats a sòlids es perden de les mostres de no ser que es facin esforços especials per recuperar els sòlids i processar-los per a l'anàlisi de virus.

La presència de diferents sals influeix l'adsorció dels virus a filtres microporus. Els efectes d'aquestes poden considerar-se directes o indirectes (canvis de pH i formació de precipitats insolubles que adsorbeixen els virus eliminant-los amb la filtració). La presència de sals pot incrementar, disminuir o no tenir cap efecte en la recuperació de virus i aquest fet depèn del tipus de filtre, del virus i de la sal (Lukasik et al, 2000). A més, essent un fet que els virus s'adsorbeixen fortament als filtres de membrana en condicions favorables, el problema esdevé doncs, en que la desadsorció dels virus de les membranes sol ser difícil, especialment quan els virus queden adsorbits dins les cavitats dels filtres. L'elevat cost del material i l'equipament que es requereix per dur a terme les valoracions són un altre desavantatge d'aquest tipus de mètodes. Tot i les limitacions però, la concentració de virus per adsorció i elució amb filtres microporus és una tècnica prometedora per a la detecció de virus.

Els mètodes de concentració secundària presenten en general el desavantatge que només poden utilitzar-se per a la concentració de volums petits de mostra i per tant, calen mètodes de concentració primària que presenten eficiències molt variables. Els mètodes d'hidroextracció-diàlisi només poden utilitzar-se en el cas de mostres on pràcticament no hi hagi terbolesa ja que la sola presència de sòlids en suspensió pot interferir en el procediment per colmatació dels porus de la bossa de diàlisi. A més, l'elució dels virus a partir de les parets de la bossa de diàlisi pot ser incompleta i, altres macrosoluts de la mostra, poden concentrar-se juntament amb els virus interferint en els assaigs virals produint citotoxicitat.

En el cas del mètode d'adsorció-precipitació amb hidròxid d'alumini la matèria orgànica soluble competeix i interfereix de nou amb l'adsorció dels virus i a més, aquests queden fortament adsorbits al precipitat i la recuperació sol ser incompleta.

El mètode Viraden emprat com a mètode de concentració presenta limitacions pròpies dels mètodes de concentració primaris i secundaris com la interferència del material en suspensió i la matèria orgànica i la limitació del volum de mostra que pot ésser concentrat. Però compta amb importants avantatges com la facilitat d'aplicació, les bones eficiències de

recuperació, la no necessitat d'elució i el potencial per quantificar i identificar virus en solucions que continguin un baix nombre d'aquests.

### **5.c. El cas de l'aigua residual**

L'elevada concentració d'enterovirus en aigua residual fa que puguin detectar-se partícules infeccioses per inoculació de la mostra (prèviament descontaminada) en cultiu cel·lular directament, sense necessitat de concentrar. Els mètodes utilitzats per a l'enumeració d'enterovirus en aigua residual bruta i tractada tenen moltes limitacions que sovint venen donades principalment per les característiques de la mostra a analitzar.

Es considera que pel fet de no tenir mètodes eficaços per a l'enumeració d'enterovirus en aigua residual, les dades sobre eficiències de tractament pel que fa a l'eliminació de virus en estacions depuradores s'haurien de revisar ja que, els valors d'enterovirus s'obtenen bé, emprant mètodes diferents per a l'enumeració en aigua residual bruta i en aigua residual tractada o bé, utilitzant el mateix mètode, l'eficiència del qual pot ser molt diferent per als dos tipus de mostra (Rose et al, 1984; Gerba, 1987).

A continuació es comenten breument alguns dels mètodes descrits

específicament per a la detecció de virus en aigua residual.

#### **5.c.1. MÈTODE BURAS**

Aquest mètode s'aplica per a l'aïllament i enumeració d'enterovirus cultivables a partir de mostres d'aigua residual. La mostra es descontamina i detoxifica i els virus s'enumeren pel mètode de monocapa emprant la línia cel·lular BGM (Buras, 1974; Buras, 1976).

Breument, es transfereixen 40 mL d'aigua residual bruta a un tub de centrífuga i s'afegeix cloroform a la mostra mantenint una proporció d'aproximadament un 10% (v:v). El tub s'agita vigorosament durant 15 minuts i la mostra es centrifuga a 5000  $\times$ g durant 20 minuts. El sobrenedant es transfereix a un contenidor estèril i seguidament la mostra s'aireja amb aire esterilitzat per filtració durant 10-15 minuts per tal d'evaporar el cloroform residual. La suspensió obtinguda s'inocula directament utilitzant fraccions de volum d'1 mL sobre monocapes de cèl·lules BGM per tal d'obtenir el recompte d'enterovirus cultivables.

A més dels mètodes dedicats a l'aigua, també es descriuen mètodes per a la recuperació de virus a partir de sòlids en suspensió a l'aigua i a l'aigua residual, pel fet que els virus en els ambients aquàtics sovint es troben



associats a sòlids en suspensió, sediments o matèria particulada. Els virus poden trobar-se associats a la superfície o inclosos dins els sòlids (Gerba et al, 1978a). El mètode Hurst per a aigua residual i altres mètodes descrits a continuació, inclouen la detecció específica dels virus adsorbits als sòlids en suspensió.

### **5.c.2. MÈTODE HURST PER A L'AIGUA RESIDUAL**

Aquest mètode va ser descrit per Hurst et al (1988) per a la detecció de virus en volums de mostra de 8 litres d'aigua residual bruta. És un mètode molt complex que implica la detecció de virus adsorbits als sòlids en suspensió.

El mètode consisteix en afegir  $MgCl_2$  a la mostra a una concentració final de 0,05 M i mantenir-la durant tota la nit a 1°C per permetre que els sòlids sedimentin. La meitat superior del sobrenedant s'elimina i la resta de mostra es centrifuga en diferents fraccions a 9500  $\times g$  durant 20 minuts per tal de recollir-ne els sòlids. Es reuneixen de nou tots els sediments i es recuperen en 120 mL aproximadament de PBS pH 7,2 amb 2% de sèrum fetal boví. Aquests sòlids es tracten amb un volum equivalent de Freó (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetà) i es centrifuguen a 9500  $\times g$  durant 20 minuts per tal que es separin dues fases. La fase superior aquosa es reserva i a la resta s'afegeix l'extracte de carn necessari per obtenir

una concentració final del 3%. S'ajusta el pH a 3,5 i es procedeix amb la floculació orgànica tal com descriuen Katzenelson et al (1976). Finalment, el precipitat es dissol en 10 mL de  $Na_2HPO_4$  0,15 M.

A la fase superior que prové de l'extracció amb freó queda una petita quantitat de sòlids. Aquesta fase es centrifuga de nou a 9500  $\times g$  durant 20 minuts i el sediment resultant es recupera en 5 mL de tampó amb 10% d'extracte de carn (100g d'extracte de carn, 13,4 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  i 1,2 g d'àcid cítric, per litre) procedint a l'elució dels virus d'aquests sòlids. La solució es centrifuga de nou per eliminar les restes de sòlids i el sobrenedant es filtra a través de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus. Aquest filtrat s'uneix als 10 mL d'eluint que resulten de la floculació orgànica obtenint-se 14 mL aproximadament d'una solució, havent-se concentrat la mostra 6000 vegades.

### **5.c.3. ALTRES MÈTODES DE DETECCIÓ DE VIRUS EN AIGUA RESIDUAL**

El mètode descrit a continuació s'utilitza per a volums mitjans de mostra d'aigua i aigua residual, on els virus associats a sòlids es recuperen específicament.

El procediment a aplicar és el següent: volums de 250 a 1000 mL de mostra es transfereixen a tubs de

centrífuga estèrils i es centrifuguen a 1250  $\times$ g durant 20 minuts. El sobrenedant es decanta a contenidors estèrils i es processa per a l'anàlisi de virus. A partir del sediment, s'elueixen els virus afegint 40 mL d'eluent (10 g d'extracte de carn, 1,34 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 0,12 g d'àcid cítric per cada 100 mL de tampó, pH 7) per al sediment que prové de 250 mL de mostra inicial, es traspasa a contenidors estèrils i s'agita vigorosament amb un agitador magnètic durant 30 minuts. Es centrifuga de nou a 1250  $\times$ g durant 15 minuts i es recull el sobrenedant el qual pot analitzar-se directament o bé reconcentrar-se per floculació orgànica.

#### 5.d. Altres tipus de mostra

Els mètodes per a la detecció d'enterovirus s'han desenvolupat també per a matrius diferents de l'aigua residual per a les que es requereixen, en tots els casos, mètodes de concentració, donat el baix nombre de virus presents en aquests altres tipus d'aigua.

Per a les determinacions de virus en aigua de riu els principals mètodes utilitzats s'inclouen dins els mètodes d'adsorció-elució, centrant-se en la utilització de filtres electronegatius o electropositius i la concentració amb

pols de vidre (Schwartzbrod i Lucena, 1978).

Per a les determinacions de virus en aigua de mar s'han emprat procediments adaptats dels mètodes per a l'aïllament d'enterovirus a partir de grans volums de mostra, com aigua de beguda, efluents de depuradora, etc. Els filtres tèxtils i de fibra de vidre epoxy van ser emprats per Fields i Metcalf (1975) per a la concentració d'adenovirus a partir d'aigua de mar contaminada artificialment. Ajustaven el pH de l'aigua de mar a 3,5 i a més, facilitaven l'adsorció al filtre per addició de  $\text{MgCl}_2$  a concentració final de 0,05 M. Els adenovirus es recuperaven a partir del filtre per elució amb una solució amb 3% d'extracte de carn a pH 9. Es procedia amb la reconcentració per floculació orgànica. El residu sòlid es ressuspenia en PBS i es feia la infecció sobre cèl·lules HeLa.

Farrah et al (1976a) descriuen la concentració de poliovirus 1 a partir de grans volums (400 litres) d'aigua d'estuari amb eficiències de recuperació de fins el 70%.

Un altre mètode de concentració d'enterovirus a partir de grans volums d'aigua d'estuari amb terbolesa elevada el descriu Sobsey et al (1977). Els virus en aigua de mar acidificada (pH 3,5) amb la presència de clorur d'alumini (0,5 mM) s'adsorbien utilitzant

fibra de vidre amb una eficiència mitjana del 41%.

Al Regne Unit, s'analitza la presència d'enterovirus en aigua de mar pel mètode d'adsorció elució, emprant com a adsorbents filtres de nitrats de cel·lulosa de 293 mm (Anònim, 1995b). L'aigua de mar acidificada s'aplica a pressió i es filtra amb un cabdal de 1 litre per minut. Després de la filtració de la mostra, s'afegeixen directament al filtre 200 mL d'una solució estèril al 3% d'extracte de carn a pH 9,5 o 200 mL

d'una solució al 0,1% de llet desnatada i es deixen en contacte un mínim de 10 minuts. La solució proteica que passa a través del filtre per gravetat es recull en un tub de centrífuga de 500 mL de capacitat estèril. Després del temps de contacte s'aplica la pressió i es recull tot l'eluit. Aplicant flocculació orgànica es recupera finalment el precipitat en 10 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15 M. La suspensió resultant es pot analitzar directament damunt de cultiu cel·lular amb la línia BGM.

## **OBJECTIUS GENERALS**

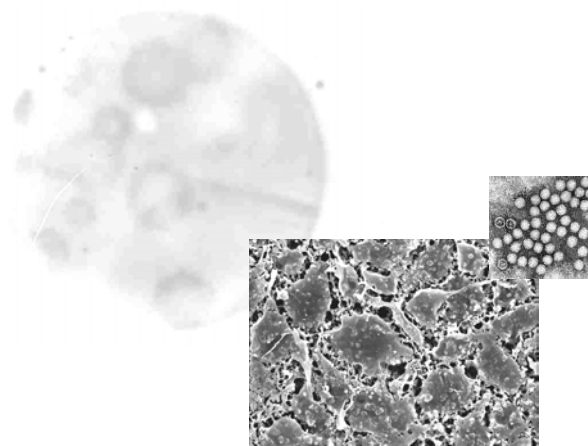
---

---

Desenvolupar metodologies adients per a la recuperació i determinació de virus a partir de diferents tipus de mostres ambientals.

Aplicar les metodologies desenvolupades per a l'avaluació de la contaminació viral en algunes matrius del medi aquàtic del nostre entorn i en experiències d'inactivació viral.





# CAPÍTOL 1. OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN

## 1.1 INTRODUCCIÓ

---

### 1.1.1 EL MÈTODE VIRADEN (Papageorgiou et al, 2000)

El mètode Viraden és un mètode de concentració i enumeració de virus que permet l'obtenció de clapes de lisi sobre una monocapa de cèl·lules a partir dels virus adsorbits a un filtre de membrana. Els virus estan adsorbits als filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa i les cèl·lules en suspensió que intenten aferrar-se a la membrana i proliferar damunt d'ella entren en contacte amb els virus i són infectades. Per aconseguir-ho, damunt la monocapa cel·lular formada en una placa de cultiu, s'afegeix una suspensió de cèl·lules i damunt d'aquesta es diposita el filtre de membrana on han estat adsorbits els virus cap per avall, atrapant les cèl·lules en suspensió entre la monocapa i el filtre. El filtre de membrana es fixa afegint medi *overlay* amb 1% d'agar. El mètode es pot utilitzar donada la capacitat de les cèl·lules BGM d'unir-se i multiplicar damunt les superfícies electronegatives. Així, les cèl·lules en ancorar-se i créixer damunt la membrana de cel·lulosa electronegativa, cobreixen la superfície rugosa del filtre gràcies a la flexibilitat de la membrana cel·lular, penetrant fins i tot, a través dels porus del filtre (Figura 1.1.1.1; Papageorgiou et al, 2000). Resultat d'aquest fet, les cèl·lules entren en contacte amb els virus, fins i tot si aquests no estan exactament a la zona més externa del filtre. Quan els virus entren en contacte amb les cèl·lules, s'inicia el cicle de replicació viral, i posteriorment la infecció s'estén a les cèl·lules adjacents arribant a la monocapa. Les clapes es formen doncs tant a la superfície del filtre com a la monocapa on són fàcilment detectables després de retirar l'agar i el filtre, i fixar i tenyir la monocapa de cèl·lules amb una solució de cristall violeta-formaldehid.

Aquest mètode presenta avantatges davant els mètodes estàndards tradicionals. És simple i fàcil d'aplicar, no necessita equipament o material cars, ofereix millors recuperacions i s'obtenen resultats més ràpidament. Pot utilitzar-se per adsorbir virus i per tant concentrar-los a partir de diferents tipus d'aigua o solucions aquoses. Per contra, té el desavantatge que la seva aplicació està limitada a determinats volums de mostra i que el seu rendiment es veu afectat per la qualitat de la solució a concentrar. Tot i això, l'aplicació desenvolupada en el present estudi augmentant la mida dels filtres de membrana i les plaques de cultiu permet també augmentar el volum de mostra, ampliant així, l'aplicabilitat del mètode.

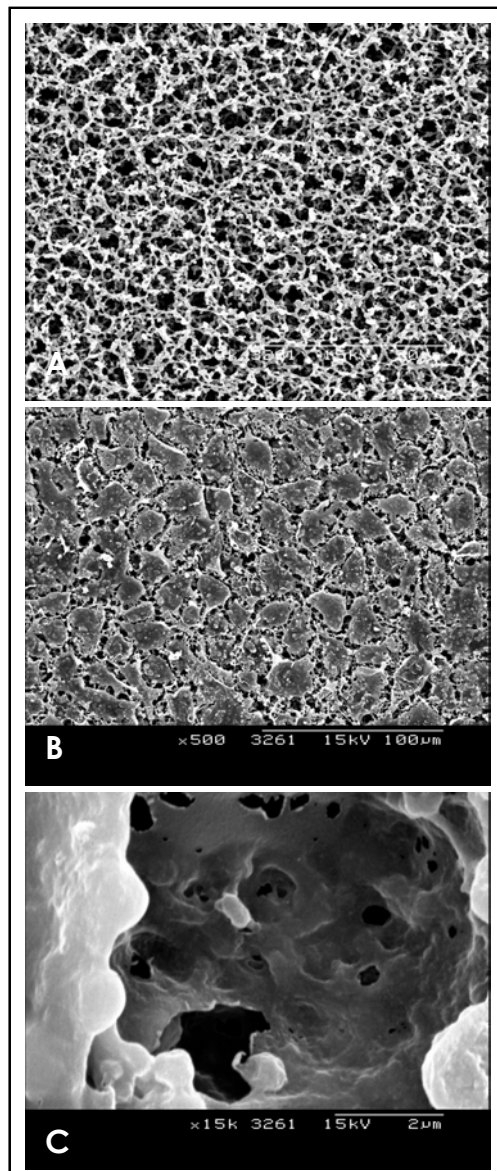


Figura 1.1.1.1. (A) Filtre de membrana d'èsters barrejats de cel·lulosa de 3  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus (500x). (B) Cèl·lules BGM en creixement damunt filtres de membrana d'èsters barrejats de cel·lulosa (500x). (C) Detall de cèl·lules BGM en creixement que mostra la capacitat de penetració dins els porus del filtre (x15000). (Adaptat de Papageorgiou et al, 2000).

### 1.1.2 ADSORCIÓ DELS VIRUS A LES MEMBRANES

Els virus s'adsorbeixen als filtres de membrana electronegatius com els d'èsters de cel·lulosa, propietat que ha estat explotada pels mètodes de concentració de virus a partir d'aigua (Wallis et al, 1972; Gerba, 1987). Els virus poden adsorbir-se a aquests filtres de membrana a pH àcids o amb presència d'ions polivalents. En el primer cas, la càrrega neta de la superfície viral es controla per variacions en el pH, succeint que a



pH inferior a 4,5 els enterovirus resten carregats positivament i a pH superior a 4,5 resten carregats negativament. A pH àcids, doncs, l'adsorció dels virus als filtres és alta, ja que la càrrega negativa del filtre es redueix mentre que els virus retenen càrrega neta positiva (Mix, 1974; Wallis et al, 1972).

En el segon cas, cal considerar que els virus són com partícules coloidals a les quals poden adsorbir-se cations i anions modificant així la càrrega neta d'aquests. El pont de sals generat a la superfície dels virus proporciona un mecanisme d'adsorció d'aquests als filtres electronegatius a pH neutre. Així doncs, la presència de sals afavoreix l'adsorció dels virus als filtres (Wallis et al, 1972).

### **1.1.3 FACTORS QUE AFECTEN EL RENDIMENT DEL MÈTODE VIRADEN**

Diversos factors com el cabdal, el condicionament de la mostra, el volum de mostra filtrat, les característiques de la mostra i altres factors, poden afectar el rendiment del mètode Viraden. L'efecte de tots aquests factors es produeix ja que influeixen directament en l'adsorció dels virus als filtres de membrana.

#### **1.1.3.1 Cabdal de filtració**

El cabdal és un factor important a considerar durant la filtració de la mostra ja que l'adsorció dels virus depèn d'aquest factor. Ha de regular-se de manera que s'aconsegueixi la màxima adsorció dels virus als filtres. L'adsorció dels virus disminueix quan augmenta el cabdal a través del filtre (Mix, 1974). Aquest cabdal es regula a través de la bomba d'aigua i l'obertura de pas de la rampa de filtració i mai ha de ser superior a 0,2 L·min<sup>-1</sup>. El cabdal òptim descrit per a l'aplicació del mètode Viraden és de 0,03 L·min<sup>-1</sup> quan s'utilitzen filtres de 47 mm de diàmetre i de 0,1 L·min<sup>-1</sup> quan s'utilitzen filtres de 90 mm de diàmetre.

#### **1.1.3.2 Condicionament de la mostra**

Pel fet que s'utilitzen filtres electronegatius cal condicionar la mostra per tal que els virus s'hi adsorbeixin. Com s'ha vist, acidificar la mostra o afegir-hi cations són processos que afavoreixen aquesta adsorció. El mètode Viraden pot aplicar-se acidificant les mostres a pH 3,5 o afegint MgCl<sub>2</sub> a una concentració final de 0,05M sense que es detectin diferències estadísticament significatives en les recuperacions de virus obtingudes en un o altre cas (Papageorgiou et al, 2000).

### **1.1.3.3 Les característiques de l'aigua**

Diferents solucions aquoses tenen diferents característiques físico-químiques que poden afectar en l'aplicació del mètode Viraden interferint tant en la adsorció dels virus als filtres com en la unió de les cèl·lules a aquests. Alguns d'aquests factors són la terbolesa de la mostra, la salinitat, la presència de matèria orgànica, etc. Aquests factors varien conjuntament depenent del tipus de mostra a analitzar (aigua de beguda, aigua de mar, aigua de riu, aigua residual bruta, aigua residual tractada, tampons d'elució, etc.).

#### **1.1.3.3.1 Materials en suspensió**

La terbolesa varia en els diferents tipus de mostra i pot afectar tant l'adsorció dels virus als filtres com la unió i el creixement de les cèl·lules. La matèria particulada orgànica i inorgànica en una mostra tèrbola pot colmar els porus del filtre i quedar-se retinguda sobre aquest. Aquest fet resta llocs d'adsorció per als virus i d'unió per a les cèl·lules, fent que l'adsorció sigui menor i la unió i proliferació cel·lular, pobre. A més, aquesta matèria particulada pot generar toxicitat que afectarà, a més, a la monocapa ja crescuda on han de detectar-se les clapes dificultant la visualització d'aquestes.

#### **1.1.3.3.2 Salinitat**

Quan l'aigua contingui sals (aigua de mar) cal tenir en compte la quantitat i el tipus d'aquestes per tal de definir el condicionament de la mostra.

#### **1.1.3.3.3 Contingut de matèria orgànica**

Les substàncies orgàniques competeixen amb els llocs d'adsorció dels virus a les membranes (Wallis i Melnick, 1967; Mix, 1974; Farrah et al, 1976b).

### **1.1.3.4 El volum de mostra**

El volum de mostra que es pot filtrar utilitzant el mètode Viraden sense que l'eficiència d'aquest disminueixi depèn de les característiques de la mostra i de la mida del filtre emprat (47 mm o 90 mm de diàmetre).

### 1.1.4 OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN.

A més dels intents per a la millora dels mètodes de concentració de virus a partir de mostres ambientals, també es dediquen esforços per tal de millorar les eficiències de detecció dels mètodes de quantificació de virus.

D'una banda, cal considerar els ions polivalents presents en solució, la presència dels quals pot tenir efectes directes i indirectes sobre la detecció de virus. Els efectes directes afecten a la interacció entre superfícies i a l'agregació viral (Floyd i Sharp, 1978) i, els efectes indirectes estan relacionats amb canvis en el pH de les solucions i amb la formació de precipitats insolubles que poden adsorbir els virus. Val a dir que, a més dels efectes que es manifesten en els procediments de concentració comentats anteriorment, la presència d'ions polivalents afecta en la recuperació i l'eficiència de quantificació viral.

D'altra banda, tradicionalment s'han avaluat diferents compostos emprats com a additius en els medis de cultiu per al creixement de les cèl·lules que han de servir per a la detecció de virus, per tal d'incrementar la seva susceptibilitat natural. Aquests additius inclouen, però no es troben pas limitats, als que s'anomenen a continuació; tripsina (Jolik, 1972; Spendlove i Schaffer, 1965), DEAE dextrà (Florino i Hannon, 1966), extractes d'eritròcits (Simon i Dömök, 1966), 5-iode-2'-deoxiuridina (Benton i Ward, 1982; Green i Baron, 1975; Hamper et al, 1974; Jerkofsky i Rapp, 1975; Selmaier i Wigand, 1983; St. Jeor i Rapp, 1973) i clorur de magnesi (Williams, 1970).

Un dels mètodes de quantificació de virus per recompte de clapes que permeten una major recuperació de virus és l'anomenat "assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió" descrit al Capítol 4 d'aquesta memòria. En el raonament dels motius que podrien influir en la major recuperació de virus es pensa en el fet que es manté una major quantitat de tripsina en contacte amb la mostra i les cèl·lules de la que quedaria emprant els mètodes de monocapa o el mètode Viraden.

La pirimidina halogenada 5-iode-2'-deoxiuridina (IDU) s'ha utilitzat de manera habitual i funciona molt bé per al propòsit que es busca, sobretot en el cas dels adenovirus. L'IDU a més d'incrementar la susceptibilitat de les cèl·lules i l'espectre de virus, disminueix el temps necessari per al desenvolupament dels efectes citopàtics (Benton i Ward, 1982). L'IDU és una molècula que pot administrar-se al cultiu cel·lular a les 24 hores d'haver subcultivat les cèl·lules, mentre la monocapa cel·lular és encara incompleta, a concentracions finals de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Benton i Ward, 1982). L'IDU s'afegeix en aquest punt al cultiu per afavorir la incorporació del compost a l'ADN cel·lular (Selmaier i Wigand, 1983). S'observa un augment en el títol de virus entèrics

que es poden detectar damunt diferents línies cel·lulars quan s'afegeix IDU al cultiu cel·lular en creixement (Benton i Hurst, 1986) desconeixent-se però, els motius que duen a aquest increment en els recomptes i al fet que les clapes es desenvolupin més ràpidament.

### **1.1.5 APLICACIONS DEL MÈTODE VIRADEN PER A LA IDENTIFICACIÓ DE CLAPES VÍRIQUES SOBRE FILTRES DE MEMBRANA**

Els mètodes de detecció i identificació *in situ* d'enterovirus cultivables inclouen la utilització d'anticossos i de sondes específiques d'ADN. El mètode clàssic per tipar i subtipar virus és el serotipatge. Molt abans que els mètodes moleculars estiguessin disponibles, les diferències entre virus s'identificaven utilitzant anticossos que podien definir diferències antigèniques. En aquest sentit, val a dir que hi ha grups de virus que no poden dividir-se en tipus o subtipus pel fet que no presenten diferències antigèniques suficients. Els mètodes serològics s'han utilitzat per definir grups de virus (serotips) i només en alguns casos s'han pogut realitzar distincions a nivells inferiors amb la utilització d'anticossos monoclonals. En general, el serotipatge ha estat i és útil per a la identificació d'enterovirus a grans trets però no té la capacitat de diferenciar aïllaments individuals ja que els epítops que defineixen els diferents serotips d'enterovirus són molt conservats.

Els mètodes de detecció i identificació *in situ* d'enterovirus cultivables podrien adaptar-se a la detecció de clapes víriques produïdes sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa en l'aplicació del mètode Viraden. Les dues aproximacions possibles serien la hibridació ARN-ADN emprant sondes específiques (oligonucleòtids) i la immunodetecció amb anticossos monoclonals per a enterovirus.

La hibridació molecular d'ARN de poliovirus en clapes formades sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa ha estat provada amb anterioritat (Papageorgiou et al, 2000). Utilitzant sondes marcades radioactivament es detectaven clapes de poliovirus 1 (Sabin) formades sobre filtres aplicant el mètode Viraden. En el present estudi es presenta l'adaptació del procediment d'hibridació descrit per Papageorgiou et al (2000) a un sistema de detecció no radioactiu, comptant que es descriuen correlacions del 100% entre el sistema radioactiu i el marcatge amb digoxigenina per a la detecció de poliovirus en mostres d'aigua (Moore i Margolin, 1993).

Els **objectius** que es plantejaren en el present capítol foren els que es detallen a continuació.

- Modificar el mètode Viraden per tal de comprovar si es podia millorar la detecció d'enterovirus.
- Intentar la identificació directa dels virus que formen clapes sobre els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa per hibridació amb sondes específiques o immunodetecció amb anticossos comercials específics.

---

## 1.2 MATERIAL I MÈTODES

---

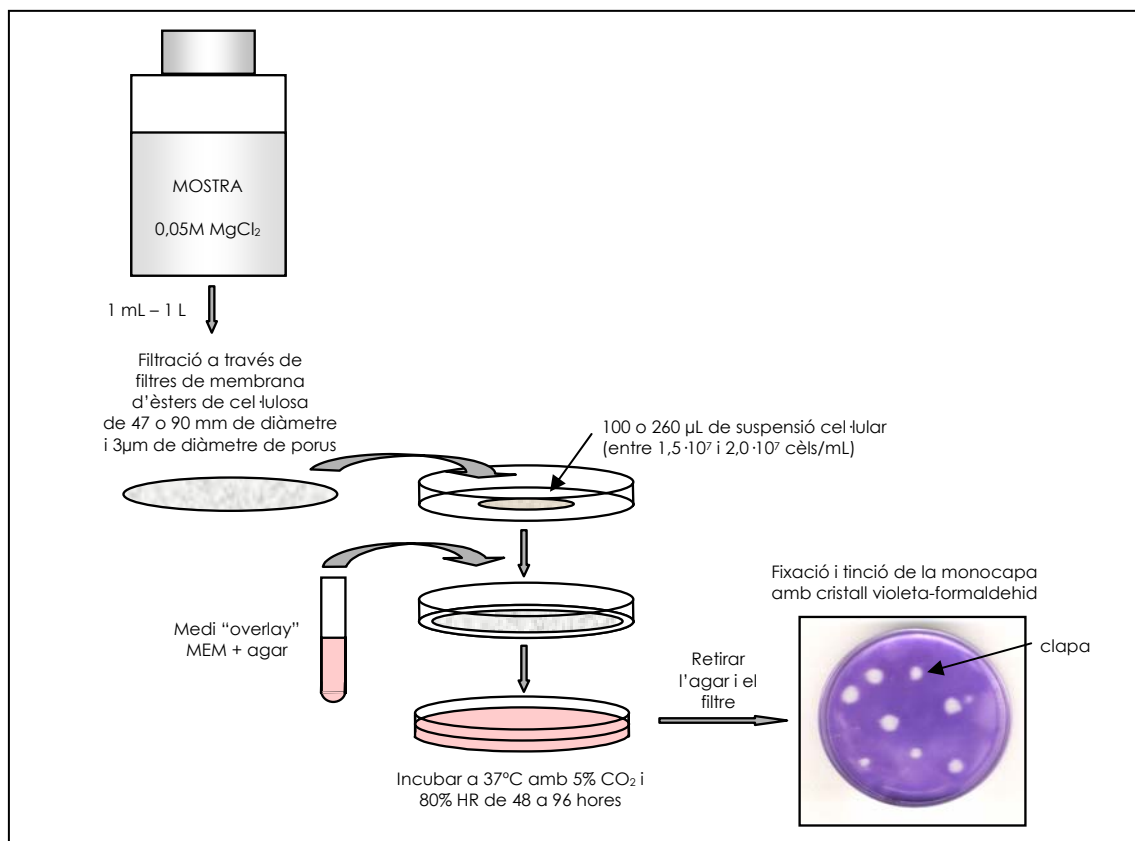
### 1.2.1 EL MÈTODE VIRADEN

El mètode Viraden s'aplicà com es descriu a continuació seguint el protocol descrit per Papageorgiou et al (2000).

- La mostra es condicionà per addició de  $MgCl_2$  fins obtenir una concentració final de 0,05 M.
- La filtració es pot realitzar a partir de volums variables; depenent del tipus de mostra els volums poden anar des d'1 mL fins a 1 litre. A més del volum de mostra a filtrar ha de considerar-se el tipus de mostra a analitzar (principalment pel que fa referència al contingut en matèria orgànica) per tal de combinar-se la utilització de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de diferent mida, de 47 o de 90 mm de diàmetre.
- El cabdal de filtració ha de regular-se amb molta cura i no pot excedir els cabdals indicats en la taula 1.2.1.1 depenent del filtre emprat.
- En plaques de cultiu cel·lular en les que prèviament es sembraren cèl·lules per tal que formessin una monocapa confluent i, un cop aquesta formada, es descartà el medi de creixement.
- Es diposità la suspensió cel·lular necessària depenent de la mida de la placa i del filtre emprats (taula 1.2.1.1).
- Seguidament es diposità el filtre amb la cara superior (on majoritàriament s'havien adsorbit els virus) sobre la suspensió cel·lular i es mantingueren en contacte durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Passat aquest període s'afegí el medi *overlay* (MEM + antibiòtics extra + agar) preparat com es detalla a l'Annex II, temperat a 45°C aprox. i es mantingueren les plaques a temperatura ambient sobre una superfície recta per permetre que l'agar solidifiqués.
- Les plaques s'incubaren en posició invertida a  $(36 \pm 2)^\circ C$  en un incubador amb 5%  $CO_2$  i més del 80% d'humitat relativa. El període d'incubació necessari per a l'aparició de les clapes depèn del tipus de virus o del tipus de mostra.
- Passat el període d'incubació es procedí a retirar l'agar i el filtre de les plaques i es fixà i es tenyí la monocapa amb una solució de cristall violeta i formaldehid (Annex II). Es mantingué la solució en contacte amb les cèl·lules durant 5 minuts com a mínim, seguidament es recuperà aquesta solució per tal de reutilitzar-la i finalment es rentà l'excés de colorant de la placa amb aigua de l'aixeta. Un cop netes les plaques es procedí amb el recompte de les clapes.

**Taula 1.2.1.1.** Cabdal, suspensió cel·lular i volum de medi overlay recomanats per a l'aplicació del mètode Viraden en funció del filtre utilitzat.

	Filtre de 47 mm Ø	Filtre de 90 mm Ø
<b>Cabdal (L min<sup>-1</sup>)</b>	0,03	0,1
<b>Suspensió cel·lular (µL)</b> <i>(1,5 – 2,0 · 10<sup>7</sup> cèl·lules mL<sup>-1</sup>)</i>	100	260
<b>Medi overlay (mL)</b>	5	15



**Figura 1.2.1.1.** Esquema del mètode Viraden

## 1.2.2 MODIFICACIÓ DEL MEDI OVERLAY

En el seguit d'experiments que es detallen a continuació d'addició de diferents components al medi *overlay* per tal d'incrementar els recomptes quan s'utilitza el mètode Viraden, es procedí preparant els tubs de medi *overlay* de la mateixa manera; descomptant del volum de MEM 2x necessari (2,5 mL per placa de 50 mm de diàmetre) el volum que calia afegir d'additiu o additius en cada cas i preparant un tub independent per cada placa de cultiu cel·lular. En primer lloc es preparava el MEM 2x amb els additius corresponents i finalment s'afegia l'agar 2%.

### 1.2.2.1 Addició d'ions polivalents al medi *overlay*

Per tal de provar si les sals utilitzades en els procediments de concentració de virus també presentaven algun efecte quan a la recuperació de virus per cultiu cel·lular s'afegí  $MgCl_2$  a una concentració final de 0,05 M i  $AlCl_3$  a una concentració final de 0,02 M al medi *overlay*. El tercer ió provat, el calci, s'afegí també al medi *overlay* en forma de  $CaCl_2$  obtenint-se una concentració final de 8 mM, que és la concentració emprada per afavorir l'adsorció de bacteriòfags a bacteris hoste.

Descomptant de cadascuna d'aquestes concentracions la concentració d'ions que ja conté el medi MEM, es suplementà amb el restant per aconseguir les concentracions finals indicades anteriorment. Així, es provà l'addició d'alumini, magnesi i calci al medi *overlay* per tal de valorar l'efecte en el recompte de la soca vacunal de poliovirus 1 (Sabin) Lsc-2ab mitjançant Viraden. D'ara en davant ens referirem a aquesta soca com a poliovirus 1 (Sabin). Els ions s'afegiren per separat o en combinacions de dos i de tres per tal de valorar-ne totes les possibilitats.

Les diferents solucions es prepararen 100 vegades concentrades de manera que només calia afegir 50  $\mu$ L de cadascuna d'elles al volum final de 5 mL de medi *overlay* quan correspongués. Per a cadascuna de les sals utilitzades es preparà la solució que s'esterilitzà a 121°C durant 15 minuts. Seguidament;

- S'aplicà el mètode Viraden titulant suspensions de poliovirus 1 (Sabin) amb títol conegut.
- S'afegiren en paral·lel el medi *overlay* control (sense additius) i els medis *overlay* amb les diferents composicions en ions.



- S'incubaren les plaques i passades 48 hores es procedí a la lectura d'aquestes i al recompte de les ufp. Amb els valors dels recomptes es realitzà l'anàlisi estadístic (ANOVA) i el càlcul del percentatge de recuperació. Es prengué com a control el valor d'ufp de les plaques que es prepararen amb el medi *overlay* sense additius.

### 1.2.2.2 Addició de tripsina al medi *overlay*

Com s'ha esmentat anteriorment, la quantitat de tripsina que roman a la suspensió cel·lular quan es prepara aquesta per aplicar el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió (Annex I) és superior a la quantitat que roman a la suspensió cel·lular quan s'aplica el mètode Viraden. Per aquest motiu es decidí suplementar el medi *overlay* del mètode Viraden amb la quantitat de tripsina equivalent al de les cèl·lules en suspensió i valorar l'efecte d'aquesta addició en els recomptes de poliovirus 1 (Sabin). Quan s'utilitza el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió per a l'enumeració d'enterovirus hi ha 133 µL més de solució de tripsina-EDTA al medi *overlay* per placa, que quan s'utilitza el mètode Viraden.

Es realitzaren dos tipus de valoracions, la de l'efecte de l'addició al medi *overlay* únicament de tripsina i la de l'efecte de l'addició de tripsina i EDTA. Per al primer tipus d'assaig es procedí amb l'addició al medi *overlay* d'una solució de tripsina 0,25% en PBS estèril (Annex II) i per al segon tipus d'assaig, amb l'addició de la solució que conté 0,25% tripsina i 0,02% EDTA (Annex II) utilitzada per al subcultiu de les monocapes cel·lulars.

Les concentracions finals de tripsina i EDTA al medi *overlay* foren:

- 0,006% tripsina i 0,014 mM EDTA (133 µL de solució de tripsina o tripsina-EDTA en 5 mL de medi *overlay*)
- 0,012% tripsina i 0,028 mM EDTA (266 µL de solució de tripsina o tripsina-EDTA en 5 mL de medi *overlay*) i
- 0,018% tripsina i 0,042 mM EDTA (399 µL de solució de tripsina o tripsina-EDTA en 5 mL de medi *overlay*).

D'aquesta manera es pogué valorar si l'efecte de l'increment en els recomptes era degut només a la tripsina o si l'EDTA utilitzat en la preparació de la solució utilitzada per a la disgregació cel·lular hi tenia també algun efecte.

Per a la realització dels assaigs, es procedí de la mateixa manera que en la modificació del medi per addició d'ions però afegint, en aquest cas, al medi *overlay* la solució de tripsina o tripsina-EDTA corresponent.

### **1.2.2.3 Combinació d'ions polivalents i tripsina al medi *overlay***

Es provà una tercera aproximació per tal de valorar si podia haver un possible efecte acumulatiu (sinèrgic) per a l'increment en la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) quan s'afegissin a l'hora tripsina-EDTA i els ions polivalents. S'utilitzaren les mateixes concentracions d'ions utilitzades en els experiments descrits anteriorment i la solució de tripsina-EDTA que permetia l'obtenció de la concentració final de tripsina de 0,006% i 0,014 mM EDTA.

## **1.2.3 EFECTE DE L'ADDICIÓ D'IDU AL CULTIU CEL·LULAR EN CREIXEMENT**

La solució mare d'IDU es preparà dissolent la quantitat corresponent d'IDU en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) estèril i s'emmagatzemà congelada (Annex II). L'IDU s'afegí al cultiu de cèl·lules a les 24 hores de creixement obtenint una concentració final al medi de 50 µg·mL<sup>-1</sup>. Els cultius cel·lulars emprats com a control en els experiments realitzats amb IDU es suplementaren a l'hora amb el mateix volum de HBSS sense IDU. Les cèl·lules s'incubaren 48 hores més o fins que es formés la monocapa cel·lular confluent i, abans de procedir amb la infecció, es retirà el medi de creixement i es feren dos rentats amb PBS 1x estèril per tal d'eliminar qualsevol resta d'IDU.

Es realitzaren experiments de valoració de l'efecte de l'addició d'IDU al cultiu amb soques virals purificades de laboratori i amb mostres d'aigua residual bruta, valorant-ne els enterovirus cultivables naturalment presents en les mostres (resultats que es mostren al Capítol 4 d'aquesta memòria).

Primerament, es valorà l'efecte de l'addició d'IDU al cultiu de cèl·lules BGM pel que feia a l'increment en el recompte de poliovirus 1 (Sabin) emprant els mètodes monocapa i Viraden. Posteriorment, es valorà l'efecte de l'addició d'IDU al cultiu de cèl·lules BGM pel que feia al recompte de poliovirus1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5 a l'aplicar el mètode Viraden.

### 1.2.4 ADAPTACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN A FILTRES DE 90 mm DE DIÀMETRE

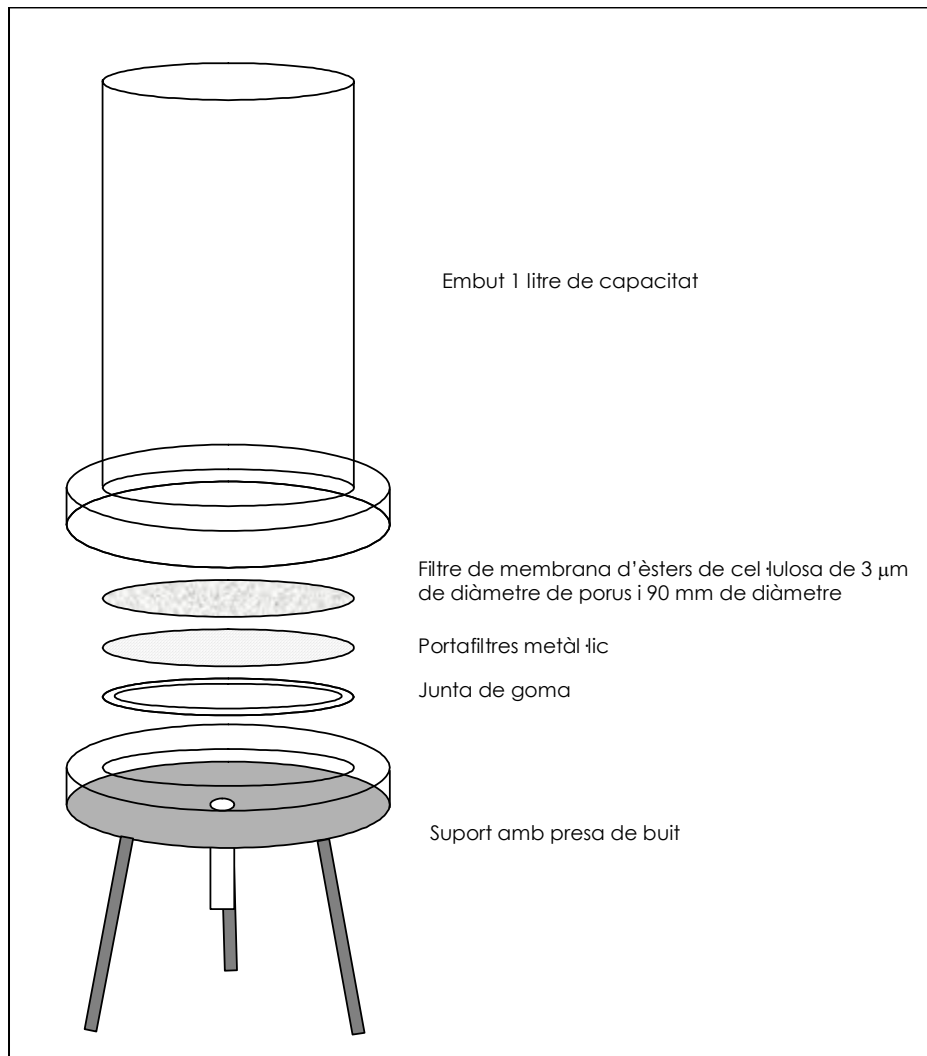
Per tal de poder incrementar el volum de mostra concentrat pel mètode Viraden, es provà d'adaptar el mètode dissenyat per a filtres de membrana de 47 mm de diàmetre, a filtres de membrana de 90 mm de diàmetre.

Va caldre recalcular la quantitat de suspensió cel·lular que calia afegir per mantenir la concentració de cèl·lules necessària i desenvolupar un sistema de filtració per buit que disposés d'un portafiltres per a les membranes de 90 mm. Aquest sistema es desenvolupà adaptant un portafiltres de 90 mm de diàmetre aplicable a filtració per pressió (YY30 090 00, Millipore), modificant-ne lleugerament l'estructura per tal de poder aplicar filtració per buit i, construint un embut d'un litre de capacitat adaptat a aquest portafiltres modificat. Les figures 1.2.4.1 i 1.2.4.2 mostren un esquema i una fotografia del muntatge.

La superfície de filtració s'incrementà en 2,7 vegades aproximadament al passar de les membranes de 47 mm a les de 90 mm de diàmetre. El volum de suspensió cel·lular que calia afegir es modificà passant dels 100  $\mu\text{L}$  als 260  $\mu\text{L}$ . S'ajustà a 260  $\mu\text{L}$  per tal que a partir d'un flascó de 175  $\text{cm}^2$  es pogués obtenir suspensió cel·lular per a 4 plaques de 90 mm de diàmetre. El cabdal també es modificà, dels 0,03  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  als 0,1  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Es realitzaren proves amb suspensions virals controlades de cultius purs de virus per tal de comprovar que la recuperació es mantenia quan es realitzava la filtració amb filtres de 90 mm de diàmetre respecte a quan es feia amb filtres de 47 mm de diàmetre. Es realitzaren titulacions en paral·lel emprant suspensions virals de títol baix de poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5 afegint 1 mL de cadascuna de les suspensions virals a volums de 100 mL o d'1 litre de solució de  $\text{MgCl}_2$  0,05M estèril per a la filtració a través de filtres de 47 mm i 90 mm de diàmetre respectivament. Els experiments es realitzaren per tal de disposar de 10 titulacions en paral·lel de cadascun dels virus.

D'altra banda, es realitzaren controls negatius corresponents a la filtració de volums d'1 litre de  $\text{MgCl}_2$  0,05M estèril emprant el sistema amb el portafiltres de 90 mm aplicant el cabdal adient, per tal de comprovar que no hi havia contaminació externa del sistema. Aquests controls foren imprescindibles per assegurar els resultats quan es treballà amb mostres en les que s'esperava un valor baix pel que fa al contingut de virus (aigua de riu i aigua de mar) i en les que la detecció d'una ufp influïa fortament en els resultats.



**Figura 1.2.4.1.** Esquema del portafiltes per a l'aplicació del mètode Viraden emprant filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 90 mm de diàmetre.



**Figura 1.2.4.2.** Portafiltres i embut de 90 mm de diàmetre per a l'aplicació del mètode Viraden.

### **1.2.5 APLICACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN AMB LA LÍNIA CEL·LULAR PLC/PRF/5**

Amb la línia cel·lular PLC/PRF/5 (ATCC CRL 8024) es procedí a comparar la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) amb aquesta línia respecte a la utilització de la línia BGM utilitzada fins llavors. Es compararen els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) obtinguts amb les dues línies cel·lulars mitjançant el mètode Viraden i, d'altra banda, es comparà aquest mètode amb l'enumeració de clapes per monocapa utilitzant la línia PLC/PRF/5.

## **1.2.6 COMBINACIÓ DE DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS EN EL MÈTODE VIRADEN**

El mètode Viraden permet la combinació de diferents cèl·lules durant el procediment de determinació de virus. Es pot emprar una línia cel·lular per a la preparació de la monocapa i una segona diferent per a la preparació de la suspensió cel·lular que quedarà en contacte amb el filtre de membrana. Així doncs, s'assajà una modificació del mètode Viraden combinant diferents línies cel·lulars. Els Material i Mètodes detallats i els resultats d'aquestes proves s'integren al Capítol 4 d'aquesta memòria.

## **1.2.7 EFECTE DEL VOLUM DE MOSTRA FILTRAT EN EL RENDIMENT DEL MÈTODE VIRADEN**

Per a la valoració de l'efecte del volum concentrat pel mètode Viraden sobre la recuperació de virus, es procedí amb l'enumeració de virus cultivables presents en dos tipus de mostres ambientals amb elevat contingut en matèria orgànica i sòlids en suspensió. Les mostres d'aigua residual bruta i tractada es recolliren en una estació de depuració d'aigües residuals (EDAR) biològica. Es realitzaren dos tipus de valoracions, una amb els virus naturalment presents a ambdós tipus de mostra i una segona, sobre la recuperació, en funció del volum de mostra concentrat per Viraden, de poliovirus 1 (Sabin) afegit experimentalment a mostres d'efluent secundari.

### **1.2.7.1. Efecte del volum de mostra filtrat en el rendiment del mètode Viraden per a la recuperació de virus cultivables presents en aigua residual**

El procediment que es seguí es detalla a continuació:

- es descontaminaren les mostres d'aigua residual bruta i tractada per filtració a través de filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus de baixa adsorció proteica (veure Capítol 2),
- es condicionaren per addició de MgCl<sub>2</sub> a una concentració final de 0,05 M i,

- es concentraren i enumeraren per Viraden assajant diferents volums de mostra en paral·lel. Volums de 1, 5, 10 i 20 mL per a l'aigua residual bruta i volums de 20 i 100 mL per a l'aigua residual tractada.

### **1.2.7.2 Efecte del volum de mostra d'efluent secundari filtrat per Viraden en la recuperació de poliovirus 1 (Sabin)**

- S'afegí una quantitat coneguda d'ufp de poliovirus 1 (Sabin) a 4 litres de mostra de diferents efluents secundaris d'EDAR biològica.
- S'homogeneïtzà la mostra per agitació durant 10 minuts.
- Es realitzà un recompte de poliovirus 1 per duplicat pel mètode Viraden per tenir el control del nombre de virus abans del tractament.
- La mostra seguí dos tractaments (veure Capítol 2):
  - filtració a través de filtres de membrana de 0,65 µm de diàmetre de porus i 47 mm de diàmetre de PVDF o,
  - tractament amb 10 mg·L<sup>-1</sup> de fenol durant 30 minuts i filtració a través de 0,65 µm PVDF.
- Es condicionà el filtrat amb MgCl<sub>2</sub> i es procedí a l'enumeració de virus pel mètode Viraden, filtrant per un sol filtre volums de 100, 300 o 500 mL. Les enumeracions de cada volum es realitzaren per quadruplicat en cada experiment independent.

## **1.2.8 IDENTIFICACIÓ DE CLAPES VÍRIQUES SOBRE FILTRES DE MEMBRANA OBTINGUDES EN L'APLICACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN**

### **1.2.8.1 Hibridació molecular d'enterovirus**

En estudis previs s'havia desenvolupat una metodologia d'hibridació molecular emprant sondes marcades amb radioactivitat per a la detecció de clapes de poliovirus 1 (Sabin) sobre suports de membrana (Papageorgiou et al, 2000). En el treball de tesi doctoral que es presenta, es provà d'adaptar la metodologia a la hibridació amb sondes marcades amb digoxigenina per estalviar la manipulació de material radioactiu.

Per a la hibridació amb sonda marcada amb digoxigenina s'utilitzà un oligonucleòtid complementari a una regió del genoma de poliovirus 1 anomenat E2, la seqüència del qual és 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3' (Pina et al, 1998). El nucleòtid marcat amb digoxigenina s'obtingué de manera comercial (TIB MOLBIOL Syntheselabor). Aquest oligonucleòtid fou el mateix que s'emprà anteriorment amb marcatge radioactiu (Papageorgiou et al, 2000).

Com a control negatiu s'utilitzà un oligonucleòtid complementari al genoma de bacteriòfags F-específics d'ARN (Schaper i Jofre, 2001) la seqüència del qual és 5'-CGA ACC ATC AAT GCT GCC AA-3'.

Emprant el mètode de detecció quimioluminiscent de la molècula de digoxigenina utilitzant el substrat CSPD (Annex I) s'assajaren les modificacions del procediment d'hibridació necessàries per a l'establiment del protocol idoni per a la detecció d'enterovirus cultivables.

#### **1.2.8.1.1 Hibridació de clapes localitzades sobre suports sòlids.**

- i. Obtenció de clapes de poliovirus 1 (Sabin) pel mètode Viraden emprant la línia cel·lular BGM.
  - a. Es realitzà la titulació d'1 mL de diferents suspensions virals de títol baix (màxim 20 ufp · mL<sup>-1</sup>) pel mètode Viraden.
  - b. S'incubaren les plaques durant 48 a 72 hores.
  - c. Es retirà l'agar i es reservà el filtre dipositant-lo damunt de paper 3MM Chr (3030 917, Whatman) humitejat amb PBS estèril de manera que quedés la part de les clapes cap a munt.

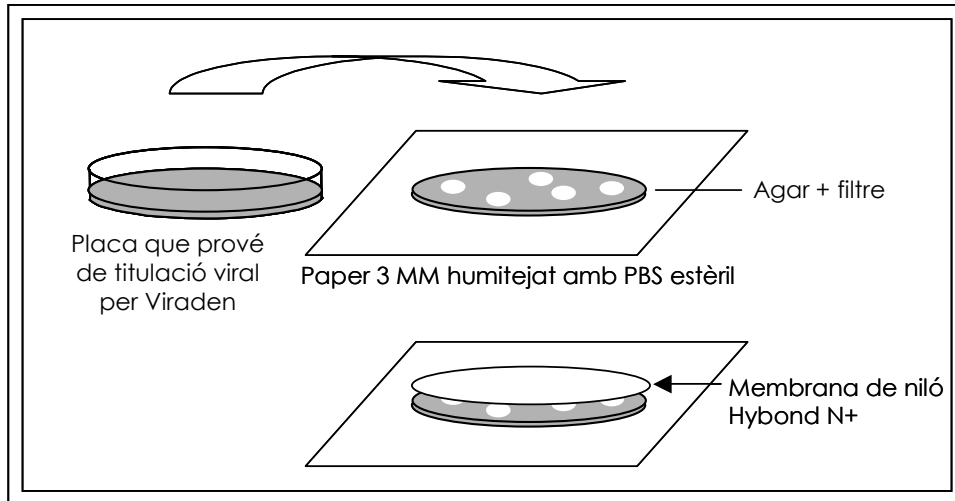
Un cop s'obtingué el filtre de membrana d'èsters de cel·lulosa es procedí de dues maneres diferents:

- Identificació per hibridació de clapes directament sobre els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa
- Transferència (Figura 1.2.8.1.1.1) de partícules víriques i/o àcid nucleic a membranes de niló Hybond-N+ (RPN82B, Amersham Pharmacia Biotech). Per a la transferència es procedí com es detalla a continuació:

- a. Es retallà la membrana de niló fins obtenir la mida del filtre (47 mm de diàmetre).



- b. Es diposità la membrana damunt el filtre de membrana d'èsters de cel·lulosa i es mantingueren en contacte durant 5 minuts.



**Figura 1.2.8.1.1.1.** Transferència d'ARN viral a filtres de membrana de niló Hybond N+.

ii. Desnaturalització

Es diposità la membrana (d'èsters de cel·lulosa o de niló) damunt paper 3MM Chr humitejat amb NaOH 0,1 M i es mantingué així, amb la zona de les clapes cap amunt, durant 1 minut.

iii. Neutralització

Es traspasà la membrana (d'èsters de cel·lulosa o de niló) a paper 3MM Chr humitejat amb acetat sòdic 0,1 M pH 6 i es mantingué així durant 5 minuts.

iv. Assecat

Es deixà assecar la membrana (d'èsters de cel·lulosa o de niló) a l'aire damunt de paper 3MM Chr sec, al costat de la flama del bec bunsen.

#### v. Fixació

Un cop seca, es fixaren les membranes (d'èsters de cel·lulosa o de niló) exposant-les a la llum ultravioleta dos minuts per cada costat.

Per a les membranes de cel·lulosa, el mètode recomanat de fixació d'àcid nucleic és el de fixació per calor a 80°C durant 30 a 120 minuts però, el fet d'escalfar els filtres fa que aquests quedin massa ressecs i que es trenquin en el moment de manipular-los quan es procedeix amb la hibridació, invalidant així el protocol. Es provà de fixar l'ARN viral un cop desnaturalitzat i neutralitzat exposant la membrana a la llum ultravioleta durant 2 minuts per cada costat de la mateixa manera que per a les membranes de niló. Fent-ho així el filtre quedava intacte i no hi havia problemes posteriors per seguir el protocol. Aquest fou doncs, el procediment de fixació escollit i aplicat en tots els casos.

#### vi. Conservació de les membranes

En aquest punt es plantejaren dues possibilitats; procedir immediatament amb la hibridació o reservar la membrana embolcallada amb plàstic i completament plana a  $(5 \pm 3)$  °C un màxim de 15 dies.

#### vii. Hibridació

La hibridació de clapes de poliovirus 1 (Sabin) amb sonda marcada amb digoxigenina es desenvolupà hibridant l'ARN transferit i fixat a les membranes de niló Hybond-N+ tal com es feia pel mètode de detecció radioactiu i hibridant directament l'ARN fixat damunt les membranes de cel·lulosa.

En ambdós casos es seguí inicialment el protocol establert per a la hibridació amb sondes marcades radioactivament el qual consistí en:

- Prehibridació durant 1 hora mínim a 55°C.
- Hibridació de 18 a 24 hores a 55°C.
- 2 rentats de la sonda amb tampó de rentat (6x SSC + 0,6% SDS) a temperatura ambient durant 15 minuts.
- 2 rentats de la sonda amb tampó de rentat (6x SSC + 0,6% SDS) a 55°C durant 15 minuts.

### **1.2.8.1.2 Modificacions del procediment de detecció per hibridació molecular per evitar el background i millorar el senyal.**

Partint del protocol d'hibridació establert prèviament amb la sonda marcada amb radioactivitat, sovint es presentaven problemes de manca de senyal o de *background* (senyals interferents, senyals de fons) quan s'utilitzava la sonda marcada amb digoxigenina. Així doncs, es provà de modificar el protocol establert afegint passos previs a la hibridació i modificant-ne d'altres per tal de millorar la detecció de les clapes virals hibridades. Es provaren diferents aproximacions les quals es detallen a continuació.

#### i. Variació de la concentració d'agar al medi overlay.

L'agar del medi *overlay* que resta damunt els filtres de membrana de cel·lulosa quan aquests es retiren de les plaques de cultiu sovint interferia en la detecció de les clapes de virus quedant taques negres corresponents a les zones de l'agar (les quals podien ser bastant grans) quan es realitzava la hibridació, dificultant la visió dels senyals corresponents a les clapes.

La concentració d'agar al medi *overlay* influeix en la mida de les clapes i si aquesta concentració és molt elevada pot fins i tot, deixar de produir-se la infecció o la formació de les clapes.

Per a l'estudi s'assajaren concentracions creixents d'agar al medi *overlay*. Es preparava agar a concentracions de 2%, 3% i 4% per tal que a l'aplicar el mètode Viraden quedessin concentracions finals d'agar al medi *overlay* de 1%, 1,5% i 2% respectivament i es comprovà si a major concentració d'agar disminuïa el fenomen de la interferència. Per tal de saber si la concentració d'agar podria modificar-se sense variacions en la recuperació de virus es compararen els resultats obtinguts en 14 titulacions de poliovirus 1 (Sabin) fetes amb cadascuna de les concentracions d'agar assajades.

#### ii. Descens de la temperatura d'hibridació.

La temperatura d'hibridació fixada inicialment a 55°C es reduí a 50°C per tal de valorar si s'obtenia millor senyal en el procediment d'hibridació molecular de clapes d'enterovirus. D'aquesta manera es reduí l'astringència i s'esperà un augment del senyal d'hibridació.

iii. Augment de l'astringència dels rentats.

- a. **Concentració de sals.** Inicialment (sonda radioactiva) tots els rentats es realitzaren amb un tampó de rentat que contenia 6xSSC i 0,6% SDS. S'assajà reduir la concentració de sals passant de 6x SSC a 2x SSC amb 0,6% SDS i, a l'hora, combinacions dels dos tampons de rentat.
- b. **Temperatura.** Els rentats es realitzaren primer a temperatura ambient i seguidament a temperatura d'hibridació. Aquest ordre s'invertí realitzant primer els rentats a temperatura d'hibridació amb el tampó menys astringent (6x SSC + 0,6% SDS) i seguidament a temperatura ambient amb el tampó més astringent (2x SSC + 0,6% SDS).
- c. **Temps.** Es canviaren els rentats originals de dues vegades durant 15 minuts per tres rentats de 10 minuts renovant cada vegada les solucions de rentat.

iv. Avançament del temps de lectura de les plaques per evitar la degradació de l'ARN.

La lectura de les plaques es feu a les 48 hores en comptes de a les 72 hores per tal de veure si així s'evitava la degradació de l'ARN viral.

v. Refredament del filtre abans de transferir.

Per als casos en que s'havia de procedir amb la transferència de les clapes a membranes de niló, es provà de refredar el filtre abans de la transferència per tal d'evitar que l'agar quedés adherit a la superfície de la membrana de niló sobre la que es realitzava la hibridació posterior.

Es retirà l'agar i el filtre de les plaques després del període d'incubació. Es separà el filtre de l'agar i es passà a paper 3 MM Chr humitejat amb PBS estèril dins una safata. Es tancà la safata i es mantingué a  $(5 \pm 3)$  °C durant 1 hora. Passat aquest temps, es procedí immediatament a la transferència a membranes de niló per contacte com es descriu anteriorment.

vi. Rentat de les restes cel·lulars.

Part del *background* l'originen les restes cel·lulars que queden damunt el filtre de cel·lulosa. Així, es provà de rentar les restes cel·lulars un cop fixat l'àcid nucleic submergint les membranes en 3x SSC + 0,1% SDS i incubant-les a 68°C durant 1 hora. La

membrana es situà seguidament entre dos fragments de paper 3MM Chr i s'aplicà una lleugera pressió per tal d'acabar d'eliminar les restes. Seguidament es procedí immediatament amb la prehibridació.

vii. Addició d'un pas previ d'extracció d'àcids nucleics amb tampó de lisi que conté isotiocianat de guanidina.

Es provà el tractament dels filtres de cel·lulosa abans de la transferència amb tampó de lisi utilitzat en procediments d'extracció d'àcids nucleics (Boom et al, 1990) per valorar si es produïa un augment en la quantitat d'ARN lliure a les clapes i aquest fet feia augmentar el senyal d'hibridació. El tampó de lisi es preparà com es descriu a l'Annex II.

Es procedí com es detalla a continuació:

- El filtre extret de les plaques es situà sobre paper 3MM humitejat amb tampó de lisi amb la zona de les clapes de lisi cap amunt i es mantingué així durant 10 minuts a temperatura ambient.
- En els casos en que calgué, es realitzà la transferència a membranes de niló en aquest punt.
- Es procedí amb la desnaturalització, neutralització i fixació dels àcids nucleics com s'ha descrit anteriorment.
- Un cop fixat l'ARN, es rentaren les restes d'isotiocianat de guanidina submergint els filtres en plaques que contenien una solució de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 i es mantingueren en agitació orbital durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Seguidament es procedí amb el protocol de prehibridació i hibridació establert.

Considerats els resultats que s'obtingueren i tenint en compte els canvis en la detecció de l'ARN viral observats per a cadascuna de les diferents modificacions del procés, el procediment d'hibridació molecular per a la detecció d'enterovirus sobre suports de membrana escollit fou el que es detalla a continuació;

- Concentració final d'agar al medi *overlay* de l'1%.
- Refredament de les membranes durant 1 h abans de transferir.
- Transferència a membranes de niló Hybond N+ per contacte durant 5 minuts, opcional.
- Desnatura lització; NaOH 0,1 M durant 1 minut.

- Neutralització; acetat sòdic 0,1 M pH 6 durant 5 minuts
- Fixació per exposició a llum U. V. durant 2 minuts per cada costat.
- Prehibridació durant 1 hora a 50°C.
- Hibridació de 18 a 24 hores a 50°C.
- Realització de 2 rentats amb 6x SSC + 0,6% SDS durant 10 minuts a 50°C renovant la solució de rentat cada vegada.
- Realització d'1 rentat amb 2x SSC + 0,6% SDS durant 10 minuts a temperatura ambient canviant el recipient on es realitza el rentat per un de nou.
- Detecció de la digoxigenina. El temps d'exposició necessari per a la visualització dels senyals d'hibridació és de dues hores aproximadament.

### **1.2.8.2 Immunodetecció de partícules víriques sobre suports de membrana d'èsters de cel·lulosa**

#### **1.2.8.2.1 Procediment d'immunodetecció de partícules víriques sobre suports de membrana**

Per a l'obtenció de les clapes sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa s'aplicà el mètode Viraden procedint com es descriu a continuació.

- Es realitzà la titulació d'1 mL de diferents suspensions virals de títol baix (màxim 20 ufp ·mL<sup>-1</sup>) pel mètode Viraden.
- S'incubaren les plaques durant 48 hores.
- Es retirà l'agar i es reservà el filtre dipositant-lo damunt de paper 3MM Chr (3030 917, Whatman) humitejat amb PBS de manera que quedés la zona de les clapes cap a munt.

Es realitzaren diferents proves d'immunodetecció emprant diferents anticossos primaris i diferents concentracions d'aquests. Els anticossos primaris utilitzats es descriuen a continuació.

1. **NCL-ENTERO**, mouse monoclonal antibody IgG2a (Novocastra Laboratories Ltd.) — NCL-ENTERO reacciona amb un epítop del pèptid VP1 altament conservat dins el grup dels enterovirus. Reacciona amb la majoria de soques aïllades per cultiu cel·lular d'echovirus, poliovirus i coxsackievirus, però no reacciona amb algunes soques d'echovirus 22, echovirus 23 o HAV. No hi ha reacció creuada amb aïllaments per cultiu cel·lular de virus respiratori sincitial, virus d'influença A i B, parainfluença tipus 1, 2, 3 i 4b, adenovirus, HSV1 i 2, VZV, citomegalovirus, virus de les paperes i del xarampió o amb cultius cel·lulars no infectats. L'antigen emprat per a la immunització és coxsackievirus B5.

La concentració de la solució mare es preparà a  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Les concentracions finals d'anticòs assajades foren:

- $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2. **Enterovirus Screening Set** (3365, Chemicon International, Inc.) — Les solucions d'anticossos vénen ja preparades per a la seva utilització en procediments d'immunofluorescència. Les diferents solucions es descriuen a continuació:

- Pan Enterovirus blend
- Enterovirus blend (Entero 70, 71)
- Poliovirus blend (Polio 1, 2 i 3)
- Echovirus blend (Echo 4, 6, 9 11, 30 i 34)
- Coxsackievirus B blend (Cox B1, B2, B3, B4, B5 i B6)

Les dilucions de treball dels anticossos es prepararen immediatament abans de la seva utilització. La temperatura de conservació dels anticossos liofilitzats i dissolts fou de  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Un cop dissolt l'anticòs, la solució mare d' $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  és estable durant 2 mesos. No es recomana congelar i descongelar.

Els assaigs per tal d'establir el protocol es van realitzar emprant l'anticòs NCL-ENTERO a concentracions de  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  i es realitzaren provant de detectar poliovirus 1 (Sabin).

A més de la immunodetecció de partícules virals procedents de clapes, s'afegiren controls per tal d'evitar les possibles interferències de les cèl·lules presents sobre els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. Aquests controls es realitzaren a partir de partícules víriques adsorbides directament als filtres, treballant amb diferents concentracions de virus. L'obtenció dels filtres de membrana per ambdós casos es descriu a continuació.

- Obtenció de filtres de membrana amb virus adsorbits a partir de volums de 5  $\mu\text{L}$  de suspensió viral de títol alt
  - Es disposaren tants filtres de membrana com anticossos es volguessin testar damunt de paper 3MM Chr sec.
  - S'afegiren 5  $\mu\text{L}$  de suspensió viral de títol alt ( $10^8$  ufp  $\cdot\text{mL}^{-1}$  aprox.) de cadascun dels virus a detectar sobre els filtres.
  - Es deixaren assecar durant 5 a 10 minuts a temperatura ambient (20-25°C) i es procedí amb el protocol d'immunodetecció (Annex I).
- Obtenció de filtres de membrana amb virus adsorbits a partir de volums de 500  $\mu\text{L}$  de suspensió viral de títol alt
  - Utilització del Minifold I (447 930, Schleicher & Schuell) segons indicacions del fabricant.
  - S'assecaren els filtres a l'aire i es procedí amb el protocol d'immunodetecció (Annex I).

El protocol bàsic d'immunodetecció que es descriu a l'Annex I, fou modificat per tal de provar diferents condicions. Les modificacions assajades s'aplicaren afegint un pretractament de les membranes i modificacions en la fase de bloqueig.

#### **1.2.8.2.2 Pretractament dels filtres d'èsters de cel·lulosa per eliminar les restes cel·lulars**

De nou, les restes cel·lulars interferien en la detecció dels senyals corresponents a les clapes així que s'assajà la introducció d'un pretractament de les membranes abans de la fase de bloqueig. Els pretractaments assajats foren els que es descriuen a continuació:



- pretractament amb SDS 10%
  - es mantingueren els filtres sobre paper Whatman 3 MM Chr humitejat amb SDS 10% durant 5 minuts a temperatura ambient.
  - es rentaren en 10-20 mL de TBS-Tween 1x durant 15 o 30 minuts a temperatura ambient.
- pretractament amb tripsina-EDTA
  - es mantingueren els filtres sobre paper Whatman 3 MM Chr humitejat amb tripsina-EDTA durant 4 minuts a temperatura ambient.
  - es rentaren en 10-20 mL de TBS-Tween 1x durant 30 minuts a temperatura ambient.

#### **1.2.8.2.3 Modificació de la solució de bloqueig**

El tampó de bloqueig compost per TBS- Tween 1x + 3% BSA es substituïí per un tampó a base de TBS-Tween 1x + 1% "*blocking reagent*" (1 096 176, Roche) per tal de valorar si el canvi en el component bloquejant produïa un menor *background*. El bloqueig en aquest segon cas es realitzà de la mateixa manera, només substituint el tampó.

#### **1.2.8.2.4 Conservació de les membranes abans de la immunodetecció.**

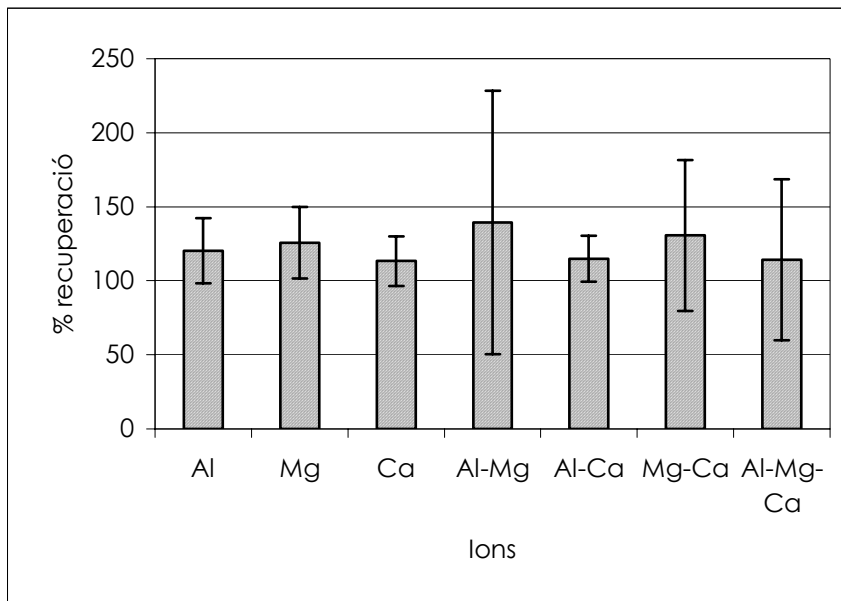
Els filtres un cop retirada la capa d'agar, es segellaren dins una bossa de plàstic i es conservaren a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  i a  $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$ . Es mantingueren en aquestes condicions durant 5 dies per tal de saber si es podien conservar els filtres i en quines condicions fer-ho, cas que no es pogués procedir immediatament amb la immunodetecció.

## 1.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 1.3.1 MODIFICACIÓ DEL MEDI OVERLAY

#### 1.3.1.1 Addició d'ions polivalents al medi overlay

Els resultats obtinguts mostren que la major recuperació s'obté amb la combinació d'alumini i magnesi afegits al medi overlay (Figura 1.3.1.1.1) tot i que en cap dels casos es detecten diferències estadísticament significatives (ANOVA,  $P > 0,05$ ) respecte a la utilització del medi sense modificar. Tot i això, l'addició de magnesi és el que permet obtenir valors de recuperació de virus més homogenis i en tots els casos superiors al 100% en els diferents tests realitzats. Així, s'escollí el magnesi per tal de testar concentracions creixents del catió al medi. En aquest cas però tampoc es detectaren diferències significatives en l'increment del títol viral amb les concentracions creixents de magnesi. Els resultats corresponen a 5 experiments independents obtenint-se els recomptes a partir de 4 rèpliques en tots els casos.



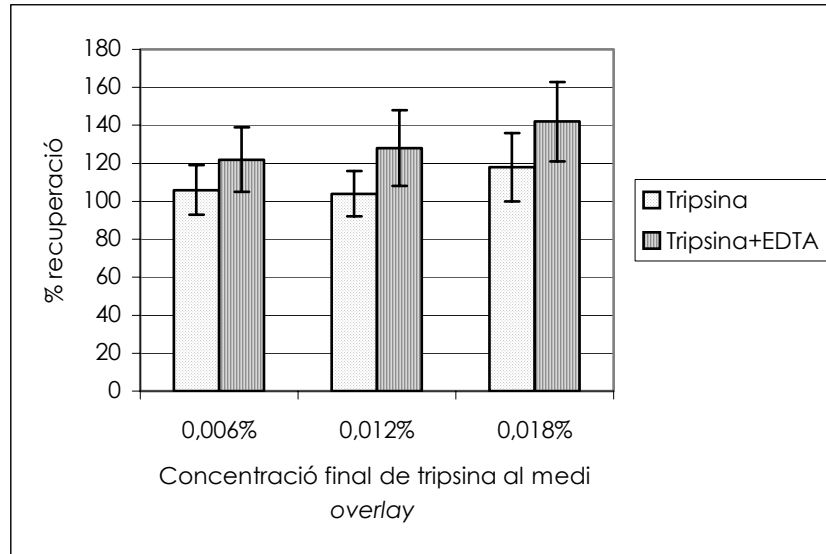
**Figura 1.3.1.1.1.** Efecte dels ions polivalents afegits al medi overlay en la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) sobre la línia cel·lular BGM emprant el mètode Viraden. Les concentracions finals al medi overlay dels diferents ions són 0,05 M  $MgCl_2$ , 0,02 M  $AlCl_3$  i 8 mM  $CaCl_2$ . El valor de 100% de recuperació correspon a l'enumeració del control en el medi overlay base sense modificar descrit per al mètode Viraden.

### 1.3.1.2 Addició de tripsina al medi overlay

Quan s'afegeix la solució de tripsina-EDTA al medi *overlay* sempre s'obtenen valors de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) superiors al 100% i sempre superiors als percentatges de recuperació que s'obtenen en els casos en que només s'afegeix la solució de tripsina (Figura 1.3.1.2.1). Així doncs, s'observa un efecte de la solució de tripsina-EDTA creixent amb l'augment de la concentració d'aquesta, sobre el recompte de poliovirus 1 (Sabin) per cultiu cel·lular emprant la línia BGM i el mètode Viraden.

Tot i les recuperacions superiors afegint la solució de tripsina al medi *overlay* no hi ha diferències estadísticament significatives (ANOVA,  $P > 0,05$ ) pel que fa als recomptes de virus emprant el medi *overlay* sense modificar. Només hi ha diferències estadísticament significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ) pel que fa a l'increment en el recompte de poliovirus 1 (Sabin) quan el que s'afegeix al medi *overlay* es la màxima concentració de la solució de tripsina-EDTA. Els resultats corresponen a 5 experiments independents obtenint-se els recomptes a partir de 4 rèpliques en tots els casos.

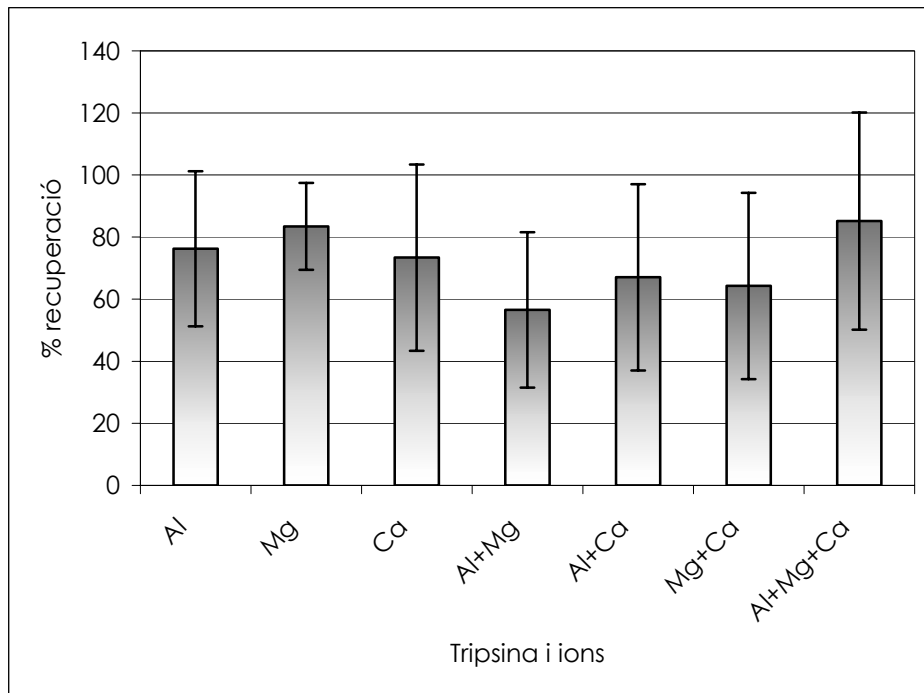
Tot i les diferències estadísticament significatives amb les concentracions màximes de tripsina i EDTA, no s'optà per aquesta modificació del medi *overlay* pel fet que de vegades (en un 5% de les plaques aproximadament) la visió de les clapes es feia més difícil per alteracions de la monocapa. Si a aquest fet s'hagués d'afegir el treball amb mostres ambientals que, de vegades contenen ja per elles mateixes substàncies que proporcionen citotoxicitat, no creiem recomanable la utilització del medi *overlay* modificat per addició de tripsina.



**Figura 1.3.1.2.1.** Efecte de la tripsina amb i sense EDTA afegida al medi overlay en la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) sobre la línia cel·lular BGM emprant el mètode Viraden. Les concentracions finals d'EDTA al medi overlay són 0,014 mM, 0,028 mM i 0,042 mM respectivament. El valor del 100% de recuperació correspon a l'enumeració control emprant medi overlay base sense modificar descrit per al mètode Viraden.

### 1.3.1.3 Combinació d'ions polivalents i tripsina al medi overlay

Quan es modifica el medi overlay afegint tripsina 0,006% i EDTA 0,014 mM i a l'hora els diferents ions, els resultats no mostren cap increment significatiu (ANOVA,  $P > 0,05$ ) respecte als resultats anteriors en que només hi ha addició de tripsina-EDTA (Figura 1.3.1.3.1). Si es comparen amb els resultats quan només s'afegeixen ions, hi ha fins i tot, en alguns casos, menor recuperació a l'afegir-hi tripsina sense detectar-se però, com ja s'ha dit, diferències estadísticament significatives. El control és de nou, com en els casos anteriors, el valor del recompte de poliovirus 1 (Sabin) en el medi overlay sense modificar. Els resultats corresponen a 5 experiments independents obtenint-se els recomptes a partir de 4 rèpliques en tots els casos.



**Figura 1.3.1.3.1.** Efecte de la tripsina-EDTA (0,006% tripsina i 0,014 mM EDTA) i dels ions afegits a l'hora al medi overlay en el recompte de poliovirus 1 (Sabin) sobre la línia cel·lular BGM emprant el mètode Viraden. Les concentracions finals dels ions al medi overlay són 0,05 M  $MgCl_2$ , 0,02 M  $AlCl_3$  i 8 mM  $CaCl_2$ . El valor del 100% de recuperació correspon a l'enumeració control emprant medi overlay base sense modificar descrit per al mètode Viraden.

### 1.3.2 EFECTE DE L'ADDICIÓ D'IDU AL CULTIU CEL·LULAR EN CREIXEMENT.

En aquest cas l'expressió dels resultats es realitza amb el càlcul dels coeficients entre el nombre de clapes (Taula 1.3.2.1) i no amb percentatges de recuperació, donat el major efecte en l'increment de la recuperació de virus afegint IDU al medi de cultiu respecte als casos anteriors de modificació del medi overlay.

El càlcul dels coeficients que s'obtenen en l'enumeració d'enterovirus utilitzant cèl·lules de la línia cel·lular BGM que creixen amb i sense IDU al cultiu es realitza dividint el recompte de clapes a les plaques de les cèl·lules que han crescut amb presència d'IDU entre el recompte de clapes a les plaques de les cèl·lules que han crescut sense IDU. D'aquesta manera els resultats mostren que quan es valora l'increment en els recomptes de poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5 pel mètode Viraden, en tots els casos es detecten diferències estadísticament significatives (*Student's T test*,  $P < 0,05$ ) observant-se un increment en els recomptes de tots els virus assajats amb l'addició d'IDU al cultiu (Taula 1.3.2.1).

**Taula 1.3.2.1.** Efecte de l'addició d'IDU al cultiu en l'enumeració d'enterovirus emprant els mètodes monocapa i Viraden. Els valors representen l'increment en el recompte de virus experimentat amb l'addició d'IDU a concentració final de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  a un cultiu de cèl·lules BGM en creixement.

	Monocapa		Viraden	
	Polio 1 (Sabin)	Polio 1 (Sabin)	Coxsackie B4	Coxsackie B5
Nombre de rèpliques	7	17	10	10
Increment de recuperació (mitjana de coeficients)	1,52	1,67	1,54	3,07
Desv. Est.	0,29	0,45	0,59	1,42
% de coeficients superiors a la unitat en presència d'IDU	100	95	80	100

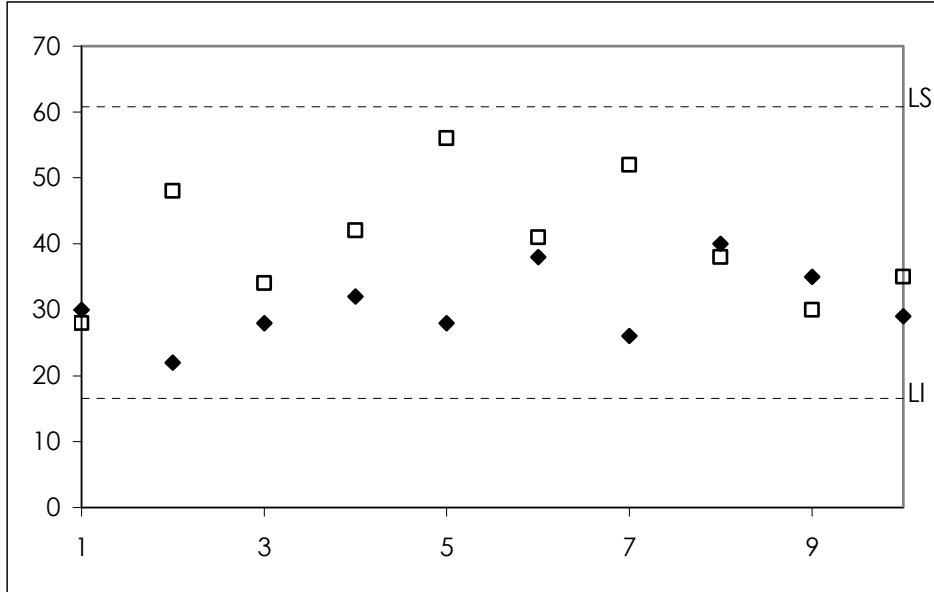
En la bibliografia revisada, Benton i Hurst (1986) obtenen increments mitjans per a poliovirus 1 amb l'addició d'IDU al cultiu emprant el mètode de titulació per monocapa de 1,9 ( $\pm 1,3$ ). Els resultats obtinguts en el nostre cas coincideixen doncs amb els d'aquests autors.

### 1.3.3 ADAPTACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN A FILTRES DE 90 mm DE DIÀMETRE

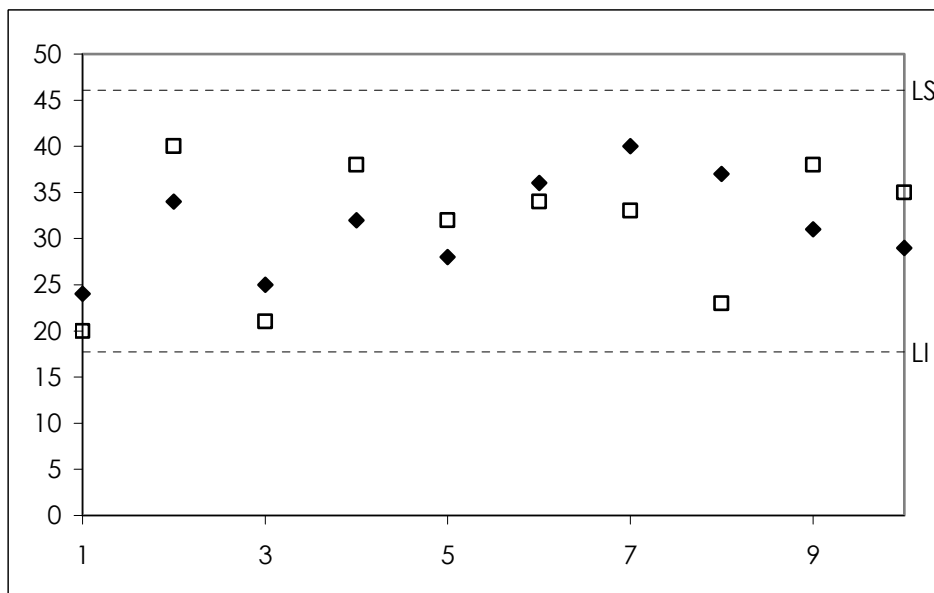
Els resultats a les figures 1.3.3.1, 1.3.3.2 i 1.3.3.3 mostren la comparació dels recomptes virals obtinguts emprant filtres de 47 mm i de 90 mm de diàmetre aplicant el mètode Viraden.

Els recomptes obtinguts emprant suspensions de poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5 no mostren diferències significatives (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ) emprant un o altre filtre i en tots els casos es troben dins els límits d'acció (límit superior i límit inferior d'acció assenyalats com a LS i LI als gràfics) de les cartes de control utilitzades per a les suspensions virals corresponents a cadascun dels tres virus assajats. S'escollí aquest tipus d'expressió dels resultats pel fet que les cartes de control permeten una valoració òptima d'aquests quan les variacions són petites, ja que el càlcul i utilització de les cartes de control pren en consideració la variabilitat (precisió) dels mètodes de quantificació. Així, es prepararen les diferents cartes de control per als

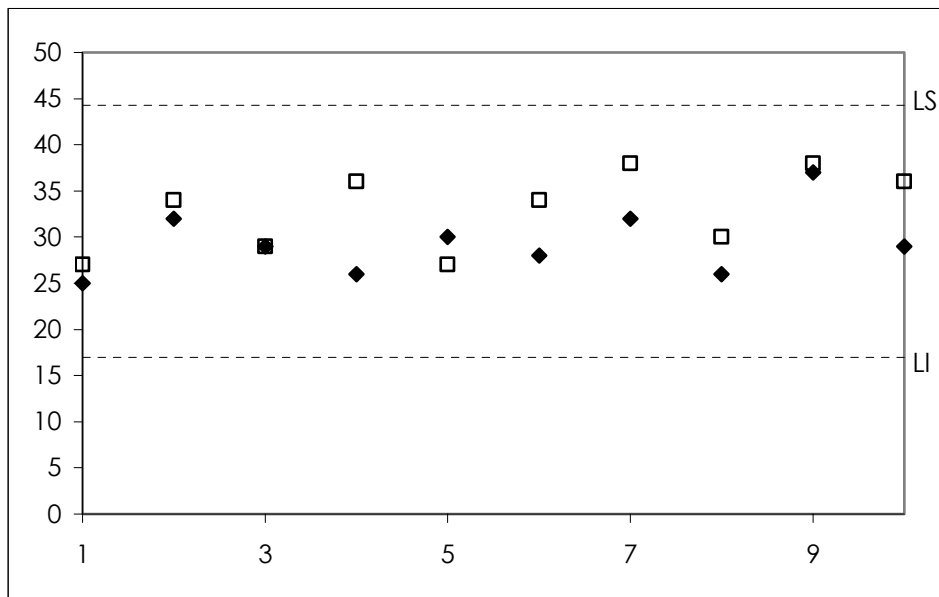
tres virus assajats aplicant el mètode Viraden amb filtres de 47 mm de diàmetre, descrit originàriament, filtrant volums de 100 mL i seguidament, s'incloueren els resultats dels recomptes obtinguts amb l'aplicació del mètode Viraden amb filtres de 90 mm de diàmetre i filtracions de volums d'un litre per a cada determinació.



**Figura 1.3.3.1.** Carta control del recompte (ufp per placa) de clapes de poliovirus 1 (Sabin) aplicant el mètode Viraden emprant filtres de membrana de 47 mm (◆) o de 90 mm (□) de diàmetre. LS: límit superior d'acció de la carta de control; LI: límit inferior d'acció de la carta de control.



**Figura 1.3.3.2.** Carta control del recompte (ufp per placa) de clapes de coxsackievirus B4 aplicant el mètode Viraden emprant filtres de membrana de 47 mm (◆) o de 90 mm (□) de diàmetre. LS: límit superior d'acció de la carta de control; LI: límit inferior d'acció de la carta de control.



**Figura 1.3.3.3.** Carta control del recompte (ufp per placa) de clapes de coxsackievirus B5 aplicant el mètode Viraden emprant filtres de membrana de 47 mm (◆) o de 90 mm (□) de diàmetre. LS: límit superior d'acció de la carta de control; LI: límit inferior d'acció de la carta de control.

### 1.3.4 APLICACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN AMB LA LÍNIA CEL·LULAR PLC/PRF/5.

Els resultats no mostraren recuperacions de virus superiors en el cas de la línia cel·lular PLC/PRF/5 quan es compararen amb les recuperacions de poliovirus 1 (Sabin) que s'obtingueren amb la línia cel·lular BGM (Taula 1.3.4.1). Fins i tot s'observà un descens en la recuperació de virus amb la línia PLC/PRF/5, tot i que les diferències no foren estadísticament significatives (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ). A aquest fet, s'hi afegí a més, una major dificultat en el cultiu de la línia PLC/PRF/5 que provocava una menor homogeneïtat de les monocapes i conseqüentment una major dificultat en la identificació i el recompte de les clapes.

Quan es compararen els mètodes de quantificació de virus de monocapa respecte Viraden emprant la línia PLC/PRF/5, s'obtingué una recuperació significativament major (*Student's T test*,  $P < 0,05$ ) quan s'aplicà el mètode Viraden. La recuperació superior fou del mateix ordre que la que s'obté en la comparació dels mètodes de monocapa i Viraden per a la quantificació de poliovirus 1 (Sabin) utilitzant la línia BGM (Papageorgiou et al, 2000).



**Taula 1.3.4.1.** Relació entre els valors de poliovirus 1 (Sabin) obtinguts aplicant els diferents mètodes de quantificació (monocapa i Viraden) emprant la línia cel·lular PLC/PRF/5. Comparació de l'enumeració de virus pel mètode Viraden pel que fa a línia cel·lular (BGM o PLC/PRF/5) i comparació del mètode de quantificació utilitzant la línia PLC/PRF/5.

	<b>Viraden (PLC/PRF/5) versus Viraden (BGM)</b>	<b>Viraden (PLC/PRF/5) versus monocapa (PLC/PRF/5)</b>
	0,74	1,25
	0,84	1,88
	0,89	2,07
	0,57	0,90
	0,92	3,04
	0,44	-
<b>Mitjana</b>	<b>0,73</b>	<b>1,83</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>

### 1.3.5 COMBINACIÓ DE DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS EN EL MÈTODE VIRADEN

Quan s'utilitzen dues línies cel·lulars diferents en l'aplicació del mètode Viraden, una per a la monocapa i una altra per a la suspensió de cèl·lules, s'obtenen resultats que depenen del tipus de mostra (suspensió viral assajada) i del tipus de línia cel·lular emprada en la capa superior. Els resultats i discussió detallats es recullen al Capítol 4 d'aquesta memòria.

### 1.3.6 EFECTE DEL VOLUM DE MOSTRA CONCENTRAT EN EL RENDIMENT DEL MÈTODE VIRADEN

#### 1.3.6.1 Efecte del volum de mostra concentrat en el rendiment del mètode Viraden per a la recuperació de virus cultivables presents en aigua residual.

Les taules 1.3.6.1.1 i 1.3.6.1.2 mostren els resultats dels experiments en que es valora l'efecte del volum de mostra concentrat per filtració emprant el mètode Viraden sobre el rendiment d'aquest mètode per a l'aigua residual bruta (Taula 1.3.6.1.1) i tractada (Taula 1.3.6.1.2). En ambdós casos, tot i aplicar descontaminació per filtració a través de filtres esterilitzants (0,22 µm), s'observa una clara pèrdua pel que fa a la recuperació de virus a mida que augmenta el volum de mostra concentrat.

Per a l'aigua residual bruta (Taula 1.3.6.1.1) la major pèrdua de recuperació de virus cultivables es produeix quan es passa de volums d'1 a 10 mL. Tot i que donada la poca homogeneïtat del tipus de matriu analitzada, les diferències només són estadísticament significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ) quan el volum de mostra que es concentra per Viraden són 5 o 10 mL.

**Taula 1.3.6.1.1.** Enumeració d'enterovirus cultivables en aigua residual bruta emprant el mètode Viraden. Coeficients entre els valors de virus cultivables ( $ufp \cdot L^{-1}$ ) obtinguts en funció del volum filtrat

	Volum filtrat		
	1 o 10 mL	5 o 10 mL	10 o 20 mL
<b>Nombre de mostres</b>	29	24	17
<b>Mitjana dels coeficients</b>	3,7	1,7	1,6
<b>Desv. Est.</b>	3,5	1,1	1,2
<b>Valor màxim</b>	12,8	3,5	4,8
<b>Valor mínim</b>	1	0,3	0,4

Pel que fa a l'aigua residual tractada (Taula 1.3.6.1.2), de nou, l'augment del volum filtrat produeix una pèrdua en la recuperació d'enterovirus. Es detecten diferències significatives (*Student's T test*,  $P < 0,05$ ) quan es compara la recuperació d'enterovirus en mostres d'efluent secundari utilitzant el mètode Viraden en funció del volum de mostra concentrat, essent significativament més alta quan es filtren 20 mL en comparació a quan es filtren 100 mL.

**Taula 1.3.6.1.2.** Enumeració d'enterovirus cultivables en aigua residual tractada emprant el mètode Viraden. Coeficients entre els valors de virus cultivables ( $ufp \cdot L^{-1}$ ) obtinguts en funció del volum filtrat.

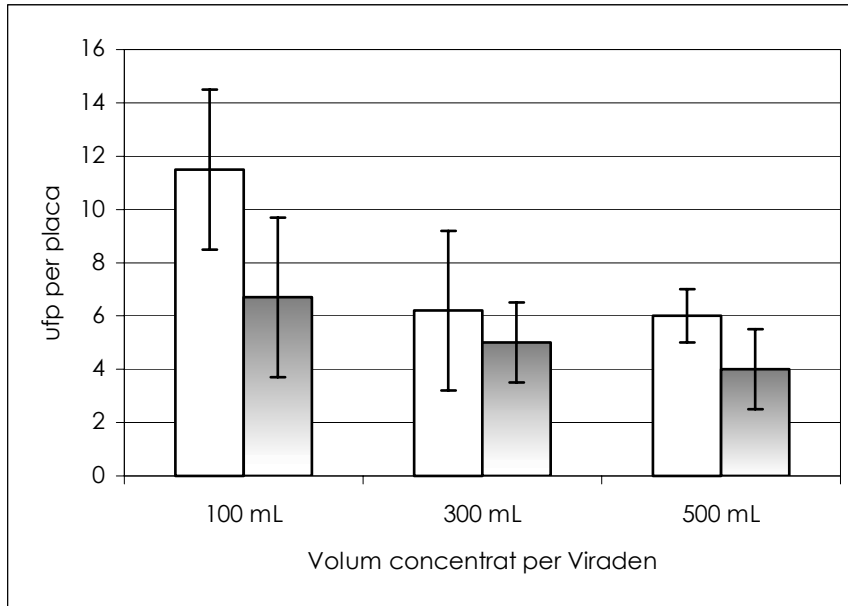
	Volum filtrat
	20 o 100 mL
<b>Nombre de mostres</b>	15
<b>Mitjana dels coeficients</b>	3,9
<b>Desv. Est.</b>	2,6
<b>Valor màxim</b>	8,1
<b>Valor mínim</b>	1

El fet de la pèrdua de rendiment dels mètodes de concentració per filtració-elució quan a la mostra hi ha molt material en suspensió i matèria orgànica és un fet conegut i un dels principals inconvenients dels mètodes de concentració que es basen en aquest tipus de procediments. A la bibliografia es troben diferents referències a aquest fet, per exemple, en mostres d'aigua residual sense concentrar (3 mL) es trobaven valors de  $4885 \text{ ufp} \cdot L^{-1}$  de mitjana (mín. 400 i màx. 14000) mentre que quan es concentraven 20 litres de mostra els valors d' $ufp \cdot L^{-1}$  es reduïen a  $267 \text{ ufp} \cdot L^{-1}$  (Bosch et al, 1986a).

En el cas del mètode Viraden aplicat a mostres d'aigua residual bruta i tractada, matrius amb una gran quantitat de matèria orgànica i sòlids en suspensió, cal tenir en compte que aquesta pèrdua de rendiment pot produir-se tot i que les mostres es concentrin després del procés de descontaminació per filtració a través de filtres de baixa adsorció proteica de  $0,22 \mu\text{m}$  de diàmetre de porus, tot i que aquests filtres ja eliminen gran part del material en suspensió.

### 1.3.6.2 Efecte del volum de mostra d'efluent secundari concentrat per Viraden en la recuperació de poliovirus 1 (Sabin)

La figura 1.3.6.2.1 mostra els valors de virus afegits a mostres d'efluent secundari que es recuperaren en funció del volum filtrat aplicant el mètode Viraden utilitzant un únic filtre de membrana d'èsters de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre.



**Figura 1.3.6.2.1.** Valors de poliovirus 1 (Sabin) (ufp per placa) depenent del volum filtrat pel mètode Viraden (100, 300 o 500 mL per un filtre de membrana). Les mostres es clarifiquen-descontaminen per filtració a través de 0,65 µm PVDF (□) o per tractament amb 10 mg·L<sup>-1</sup> de fenol durant 30 minuts i filtració a través de 0,65 µm PVDF (■). n=12 per a 100 i 300 mL i n=4 per a 500 mL.

Com en els dos casos anteriors la quantitat de poliovirus 1 (Sabin) recuperats per Viraden depèn del volum de mostra filtrat. Amb l'augment de tres i cinc vegades del volum de mostra filtrat, s'esperaria que també augmentessin tres i cinc vegades els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) però, en canvi, hi ha una reducció del nombre de clapes a mida que augmenta el volum filtrat per un únic filtre de membrana, quan s'aplica el mètode Viraden.

Per als efluent secundaris de depuradora analitzats, independentment del mètode de descontaminació, el volum òptim de concentració hauria d'ésser inferior a 100 mL. Així, doncs, quan calgui analitzar volums grans de mostra, pensem que és preferible fer

rèpliques de filtracions de volums petits (20 mL), a filtrar volums elevats de mostra per un sol filtre.

D'altra banda, cal considerar també, a més de la pèrdua de virus, que quan augmenta el volum de mostra d'efluent secundari que es filtra a través de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 3 µm de diàmetre de porus en l'aplicació del mètode Viraden, augmenta també la toxicitat sobre el cultiu cel·lular per als dos tipus de tractament de descontaminació considerats en aquest cas, fenol i prefiltració a través de 0,65 µm de PVDF. Tot i que seguien diferenciant-se bé les clapes, l'augment de la citotoxicitat dificultà el recompte.

### **1.3.7 IDENTIFICACIÓ DE CLAPES VÍRIQUES SOBRE FILTRES DE MEMBRANA OBTINGUES EN L'APLICACIÓ DEL MÈTODE VIRADEN**

#### **1.3.7.1 Hibridació molecular**

##### **1.3.7.1.1 Modificació del procediment per evitar el background i millorar el senyal.**

###### i. Variació de la concentració d'agar al medi overlay.

En primer lloc es comprovà si hi havia diferències o no pel que fa al recompte de poliovirus 1 (Sabin) emprant el mètode Viraden utilitzant les diferents concentracions d'agar descrites al medi *overlay*. No es detectaren diferències significatives (ANOVA,  $P > 0,05$ ) en 14 experiències de titulació per duplicat. Quan es procedí amb la hibridació de les membranes resultants d'aquestes titulacions, cap de les concentracions assajades de 1%, 1,5% i 2% d'agar disminuï el *background*. Així doncs, es continuà aplicant el mètode amb la concentració de l'1% fixada inicialment.

###### ii. Disminució de la temperatura d'hibridació.

Quan la temperatura d'hibridació es reduí de 55°C a 50°C augmentà el senyal obtingut en el film d'autoradiografia després de la hibridació molecular. Cal tenir en compte que si es volgués aplicar el mètode amb diferents sondes específiques per als diferents enterovirus cas que aquestes es poguessin dissenyar i obtenir, caldria ajustar de nou les temperatures d'hibridació per a cada cas.

iii. Augment de l'astringència dels rentats.

**a. Concentració de sals.**

Si es fan tots els rentats amb el tampó que conté 2x SSC per comptes de 6x SSC, s'obté massa astringència i aquest fet repercuteix en el fet que no es detecten senyals d'hibridació. Provant diferents combinacions d'aquestes dues solucions de rentat, la que disminuï suficientment el *background* sense pèrdua en el senyal d'hibridació fou la següent:

- 2 rentats amb 6x SSC + 0,6% SDS durant 10 minuts a 50°C.
- 1 rentat amb 2x SSC + 0,6% SDS durant 10 minuts a temperatura ambient.

**b. Temperatura.**

Invertint l'ordre en la temperatura dels rentats s'obtingueren millors resultats; així doncs, es realitzaren primer els rentats a temperatura d'hibridació i posteriorment els rentats a temperatura ambient com es detalla en l'apartat anterior.

**c. Temps**

Els rentats inicials de 15 minuts quatre vegades, es passaren a tres rentats de 10 minuts. El temps total de rentat es redueix. Es renova cada vegada la solució de rentat i es canvien les solucions de rentat que presenten astringències diferents.

iv. Avançament del temps de lectura de les plaques per evitar la degradació de l'ARN.

La lectura de les plaques s'avançà a les 48 hores després de la infecció; així les clapes eren més petites permetent un major nombre de clapes per placa i evitant la degradació de l'ARN viral. S'obtenia un senyal més intens en la hibridació passant d'obtenir senyal només a les vores de les clapes a obtenir-lo en pràcticament la totalitat de la clapa de lisi.

v. Refredament el filtre abans de transferir.

Al fer la transferència a partir del filtre fred, disminuï el *background* observant-se diferències respecte als filtres transferits a temperatura ambient.

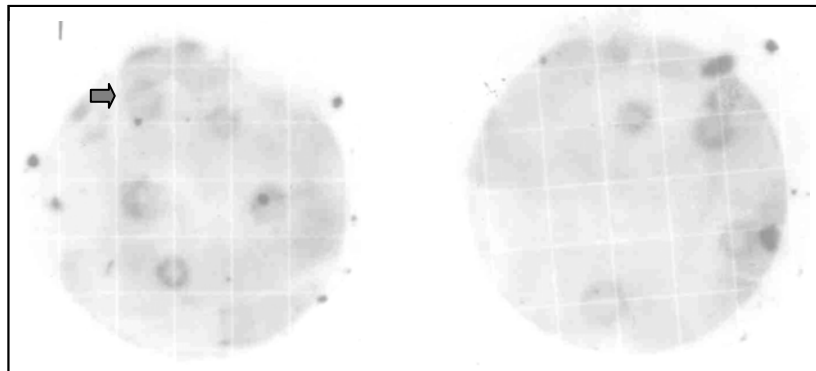
vi. Rentat de les restes cel·lulars.

El rentat de les restes cel·lulars un cop fixat l'àcid nucleic no feu que el *background* disminuís, si més no, en les cinc experiències realitzades. A més, s'observà una certa tendència a que disminuís el senyal d'hibridació.

vii. Addició d'un pas previ d'extracció d'àcids nucleics amb tampó de lisi que conté isotiocianat de guanidina.

Aquest procediment d'extracció no va permetre detectar un increment de senyal d'hibridació. Pel fet que, a més, calia treballar amb reactius altament tòxics, es descartà afegir aquest pas al procediment.

Escollit el millor protocol per a la hibridació d'ARN d'enterovirus amb sondes marcades amb digoxigenina els resultats obtinguts es mostren a la Figura 1.3.7.1.1.1.



**Figura 1.3.7.1.1.1.** Hibridació d'ARN de poliovirus 1 (Sabin) sobre membranes de niló emprant sonda marcada amb digoxigenina.

Quan la hibridació es realitzà sobre clapes obtingudes a partir de procediments de titulació d'aigua residual bruta emprant el mètode Viraden, s'obtingueren senyals d'hibridació que corresponien a les clapes de lisi identificades com a tal sobre la monocapa cel·lular.

### **1.3.7.1.2 Possibilitat d'identificació de clapes d'enterovirus per hibridació d'àcids nucleics**

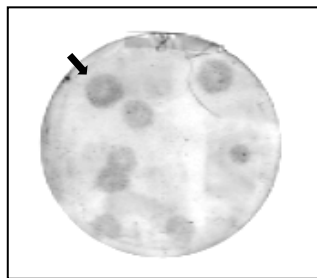
Pel que fa doncs a la possibilitat d'identificar enterovirus que formen clapes sobre els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa val dir que aquesta pot realitzar-se a nivell

de gènere donades les semblances a nivell genètic entre els diferents serotips d'enterovirus que permeten la utilització de sondes ADNc genèriques derivades d'un serotip per detectar els genomes d'un ampli rang d'enterovirus (Bowles et al, 1986; Hyypiä et al, 1984; Rotbart, 1991; Tracy, 1984). Igual que en el nostre cas, hi ha estudis que confirmen la dificultat d'obtenir sondes específiques per als diferents tipus d'enterovirus quan s'utilitzen mètodes d'hibridació molecular (Bruce et al, 1989).

La identificació d'enterovirus en mostres d'origen ambiental aplicant la tecnologia d'hibridació tal com s'ha descrit és possible i podria ésser útil per diferenciar els enterovirus d'altres virus que fan clapes, com els reovirus. Però, la impossibilitat d'obtenció de sondes específiques pels diferents grups d'enterovirus fa que es plantegi el mateix problema de manca d'identificació que es planteja per a les mostres clíniques (Bowles et al, 1986; Cova et al, 1988; Easton i Eglin, 1988; Rotbart, 1991). No s'obté el grau d'informació desitjat aplicant només aquesta tècnica.

### 1.3.7.2 Immunodetecció

El mètode d'immunodetecció assajat en la detecció d'enterovirus emprant l'anticòs NCL-ENTERO va permetre observar senyals produïdes per la presència de partícules víriques damunt filtres que provenien de titulacions de suspensions virals emprant el mètode Viraden (Figura 1.3.7.2.1). Els senyals es comprovaren, i en tots els casos de totes les experiències realitzades, corresponien a les zones de lisi cel·lular identificades com a clapes, localitzades a la placa de cultiu (100% eficiència).



**Figura 1.3.7.2.1.** Immunodetecció de poliovirus 1 (Sabin) en un filtre d'èsters de cel·lulosa emprant l'anticòs NCL-ENTERO. Les fletxes mostren els senyals obtinguts.



#### **1.3.7.2.1 Pretractament**

El pretractament amb SDS 10% i posteriors rentats de 15 i 30 minuts amb TBS-Tween 1x van permetre eliminar el *background* i per tant, l'obtenció de millor senyal. Aquest tractament funcionava millor que el pretractament amb tripsina-EDTA, el qual no millorava la detecció.

#### **1.3.7.2.2 Modificació del tampó de bloqueig**

La utilització del tampó de bloqueig TBS-Tween 1x + 1% blocking reagent va donar resultat equivalent al que s'obtenia amb la utilització del tampó de bloqueig que contenia 3% BSA en la immunodetecció de partícules víriques senceres de poliovirus 1 (Sabin).

#### **1.3.7.2.3 Conservació de les membranes abans de la immunodetecció**

La immunodetecció a partir de membranes conservades a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  i a  $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$  produí senyals molt dèbils. Així, doncs, no es recomana la conservació d'aquestes. Quan s'hagi de procedir amb la immunodetecció de partícules virals sobre suport de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa és preferible fer-ho immediatament.

#### **1.3.7.2.4 Possibilitat d'identificació de clapes d'enterovirus per immunodetecció**

Es va voler comprovar si amb anticossos comercials específics per als diferents tipus d'enterovirus, es podien diferenciar enterovirus procedents de cultius purs de laboratori identificats o d'aïllaments ambientals identificats per anàlisi de patró de fragments de restricció. Aquest assaig es desenvolupà amb els anticossos monoclonals del kit comercial "screening d'enterovirus" al que es fa referència a la secció de Material i Mètodes. Només els anticossos anti-poliovirus foren capaços de discriminar poliovirus d'entre els diferents enterovirus utilitzats en l'estudi (echovirus i coxsackievirus). La resta d'anticossos no es mostraren específics per als virus per als quals descriu el kit ja que reaccionaren i produïren senyal quan s'afegí poliovirus 1 (Sabin) a la detecció. A més de la detecció inespecífica de poliovirus 1 (Sabin) amb anticossos descrits per a echovirus i coxsackievirus, es produïren reaccions creuades entre aquests dos últims virus. Així doncs, els anticossos provats no permeten la identificació dels diferents grups d'enterovirus aplicant la immunodetecció de clapes víriques formades sobre suports de membrana aplicant el mètode Viraden. De la mateixa manera que amb les sondes d'àcid nucleic, aplicant aquesta modificació del mètode Viraden no s'obté el grau

d'informació desitjat per tal de realitzar una identificació ràpida dels diferents enterovirus presents en mostres ambientals.

## 1.4 CONCLUSIONS

---

L'addició d'ions polivalents al medi *overlay* no incrementa de manera significativa els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) emprant el mètode Viraden.

L'addició de tripsina-EDTA al medi *overlay* incrementa els recomptes. L'increment només és estadísticament significatiu per a la concentració màxima assajada 0,018% de tripsina i 0,042 mM EDTA.

L'addició d'ions polivalents i tripsina-EDTA al medi *overlay* no incrementa de manera significativa els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) emprant el mètode Viraden. No hi ha doncs sinèrgia.

L'addició d'IDU al cultiu cel·lular en creixement incrementa de manera significativa la recuperació d'enterovirus aplicant el mètode Viraden.

El mètode Viraden pot aplicar-se sense perdre rendiment emprant filtres de membrana de 90 mm de diàmetre, concentrant volums d'un litre.

Existeix un efecte del volum de mostra (aigua residual bruta i tractada) filtrat sobre el rendiment del mètode Viraden.

La hibridació molecular permet la identificació de clapes víriques d'enterovirus sobre filtres de membrana obtingudes en l'aplicació del mètode Viraden. Tot i que amb la tècnica desenvolupada i donades les característiques del genoma dels enterovirus no es pot aplicar la hibridació molecular amb sondes d'àcid nucleic per diferenciar tipus en poblacions naturals d'enterovirus.

La immunodetecció permet la identificació de clapes víriques d'enterovirus sobre filtres de membrana obtingudes en l'aplicació del mètode Viraden. Però, els anticossos monoclonats comercials provats no permeten la correcta identificació dels diferents tipus d'enterovirus.





## CAPÍTOL 2. MÈTODES DE CLARIFICACIÓ I DESCONTAMINACIÓ DE MOSTRES

## 2.1 INTRODUCCIÓ

Les mostres ambientals o concentrats virals de mostres ambientals contenen bacteris i fongs que poden créixer en els medis de cultiu i interferir amb la detecció de virus presents en aquest tipus de mostra. És per això que han de descontaminar-se abans de la determinació de virus. Per a moltes mostres, especialment les que provenen de concentrats d'aigua de beguda, la contaminació es controla de manera adient amb l'addició d'antibiòtics com penicil·lina-estreptomicina o gentamicina-kanamicina que s'afegeixen a la mostra immediatament després de finalitzar el procés de concentració. Per obtenir protecció addicional contra la contaminació per fongs poden afegir-se antifúngics com la amfotericina B o la nistatina a concentracions de 2,5 i 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivament. Si els antibiòtics citats fins ara són inadequats, poden utilitzar-se un o més antibiòtics com aureomicina, neomicina o polimixina B. Per incrementar l'efecte dels antibiòtics les mostres s'incuben d'1 a 3 hores de 25 a 37°C després d'afegir-los-hi. A més, la destrucció bacteriana és major quan les mostres es congelen a  $-70^{\circ}\text{C}$  després de la incubació amb els antibiòtics. Per saber si el tractament amb antibiòtic és efectiu cal sembrar plaques amb medi de cultiu ric amb una fracció de la mostra i incubar-les per tal de determinar el creixement de bacteris i/o fongs.

Si les mostres estan molt contaminades i aquesta contaminació persisteix després del tractament amb antibiòtics, cal aplicar cloroform. El tractament recomanat per l'*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998) consisteix en afegir cloroform a la mostra en proporció 1:10 (v:v) i agitar vigorosament durant 30 minuts a temperatura ambient o homogeneïtzar durant 1 o 2 minuts a 4°C. Per separar les fases, es centrifuga a 1000 xg o es manté la mostra tota la nit refrigerada. Es separa la mostra (fase superior) del cloroform (fase inferior) aspirant amb una pipeta i en un contenidor net i estèril s'aireja la mostra durant 15 minuts amb aire esterilitzat per filtració dins una cabina de flux que mantingui una atmosfera esterilitzada. No es permet descontaminar les mostres amb èter pel perill d'explosió o d'incendi. Un altre mètode de descontaminació amb cloroform el descriu Buras (1974).

Un mètode alternatiu al cloroform adient per a la descontaminació de volums petits de mostra directa o per als concentrats virals és la filtració (EPA, 1996) tot i que, l'*Standard Methods* (APHA, 1998) no recomana aquest tipus de descontaminació pel fet que poden produir-se pèrdues. L'assaig directe de les mostres aplicant els procediments de descontaminació per filtració, proporciona bones recuperacions però, presenta l'inconvenient que només és aplicable a petits volums de mostra. El

mètode Buras (Buras, 1974) permet la descontaminació d'efluents secundaris de depuradora però, la quantitat de cloroform necessària, fa que no sigui aplicable quan s'han d'analitzar volums de mostra superiors als 100 mL. Els mètodes per a la descontaminació de mostres ambientals emprats fins l'actualitat no resolen satisfactòriament la descontaminació de volums de mostra superiors als 100 mL.

Com s'ha dit anteriorment, el mètode Viraden presenta una alternativa vàlida com a mètode de concentració i enumeració d'enterovirus cultivables pels següents motius: és més econòmic que els altres mètodes tant en materials com en temps i, ofereix la possibilitat d'utilitzar el mateix mètode per a l'aigua residual bruta i per a la tractada de manera que es puguin tenir valors d'enterovirus equivalents per avaluar la reducció d'aquests paràmetres en plantes de tractament. Tot i això, l'aplicació del mètode Viraden a l'aigua residual (fortament contaminada) requereix processos de descontaminació i clarificació de la mostra previs a la concentració-enumeració. Aquests procediments hauran de servir per evitar la colmatació del filtre i la destrucció de la monocapa cel·lular per fongs i bacteris contaminants. Pel que fa a aquest procediment de clarificació-descontaminació previ de la mostra, l'aplicació del mètode Viraden permet una aproximació diferent a la de resta de mètodes; la mostra pot descontaminar-se abans de la concentració aplicant solucions desinfectants. Aquest procediment és vàlid ja que els virus que es troben en suspensions aquoses que contenen desinfectants que no s'uneixen a les membranes, poden adsorbir-se als filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa i enumerar-se aplicant el mètode Viraden sense efectes perjudicials dels desinfectants a les monocapes cel·lulars (Papageorgiou, 2000). Així doncs, els desinfectants que no afecten els virus poden utilitzar-se per descontaminar mostres abans de concentrar i enumerar els virus per Viraden.

De manera addicional poden aplicar-se prefiltres que clarifiquin les mostres abans de procedir a la concentració pel mètode Viraden. Aquests procediments de prefiltració són ben coneguts per a moltes tècniques de concentració de virus descrites ja que permeten, en determinats casos, augmentar l'eficiència dels mètodes de concentració. A més, faciliten el procediment de descontaminació posterior quan aquest sigui necessari. Els prefiltres emprats són de diferent naturalesa, com paper Whatman i fibra de vidre, entre d'altres.

## 2.1.1 CANDIDATS PER ALS PROCEDIMENTS DE DESCONTAMINACIÓ QUÍMICA DE MOSTRES AMBIENTALS

Estudis previs al laboratori en que es provà de valorar la capacitat desinfectant de diferents compostos sobre poliovirus 1 (Sabin), mostraren resistència d'aquests virus front determinades substàncies. L'avaluació d'aquests resultats preliminars i l'observació que aquests productes no presentaven efecte citotòxic sobre les cèl·lules BGM emprades en la detecció dels virus, va fer pensar en la possibilitat d'establir procediments de descontaminació química de mostres ambientals amb compostos com el digluconat de clorhexidina i el fenol, compostos amb manca d'activitat virucida sobre virus no embolcallats i sense efecte citotòxic quan s'aplica el mètode Viraden com es descriu més en davant.

### 2.1.1.1 Digluconat de clorhexidina

El digluconat de clorhexidina (DGC) té com a molècula activa la clorhexidina. La clorhexidina és una polibiguanida catiònica amb propietats bactericides. En un medi a pH neutre les sals de clorhexidina es dissocien alliberant un component carregat positivament. L'activitat bactericida de la clorhexidina és el resultat de la unió d'aquesta molècula catiònica amb les superfícies carregades negativament de les cobertes bacterianes. A concentracions baixes, es produeix una alteració de l'equilibri osmòtic bacterià amb fuga de potassi i fòsfor, amb un efecte bacteriostàtic final. A concentracions més altes, es produeix trencament de les cobertes; precipitació dels continguts citoplasmàtics i mort cel·lular. La clorhexidina té un ampli espectre d'acció. És més activa contra microorganismes gram-positius que contra gram-negatius. L'acció contra els fongs és lleu. Ha mostrat activitat *in vitro* contra virus embolcallats com VIH, herpes, citomegalovirus i influença.

### 2.1.1.2 Fenol

El fenol i derivats s'utilitzen àmpliament com a desinfectants generals i com a preservatius per a diversos productes manufacturats. La principal limitació és que no poden utilitzar-se quan la seva aplicació pugui contaminar aliments. L'activitat biològica del fenol resideix a la molècula no dissociada i és efectiu contra formes



vegetatives de bacteris gram negatius i gram positius, però és poc eficient contra espores.

### **2.1.2. PROCEDIMENTS DE CLARIFICACIÓ**

La clarificació entesa com a procediment que permet la separació de les partícules suspeses per filtració o centrifugació en una solució determinada, pot aplicar-se com a pas previ als mètodes de concentració de virus (Sobsey i Glass, 1984). Si les mostres presenten un elevat grau de contaminació microbiològica aquests procediments han de seguir-se amb procediments de descontaminació que assegurin l'eliminació dels microorganismes interferents en la determinació de virus. Però hi ha mostres en les que donat el grau de contaminació, un procediment de clarificació pot ser suficient per tal que pugui aplicar-se el mètode de concentració-enumeració Viraden. Serien els casos de l'aigua de riu i l'aigua de mar.

Per a la clarificació cal que s'emprin prefiltres que no retinguin els virus. Per al treball s'escolliren paper Whatman i/o filtres de membrana de baixa adsorció proteica.

### **2.1.3 PROCEDIMENTS DE FILTRACIÓ PER A LA DESCONTAMINACIÓ DE MOSTRES AMBIENTALS**

La filtració s'utilitza àmpliament en els laboratoris i la indústria per a la clarificació i/o descontaminació de solucions líquides. En virologia, els filtres de membrana separen els virus suspesos en diverses solucions aquoses d'altres microorganismes, com els bacteris, els protozous i els fongs. Per exemple, les suspensions virals es purifiquen per filtració a partir d'un cultiu cel·lular després de la replicació viral (Goodherat, 1969; Freshey, 1987) i a partir d'una mostra abans de l'enumeració per cultiu cel·lular (Brock, 1983; EPA, 1996).

Per descontaminar suspensions de virus, la filtració ha d'excloure la majoria de les partícules no virals. La utilització de filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus va ser proposada per Freshey, 1987 i per la EPA (1996, 2000a, 2000b). Els virus passen a través dels filtres amb aquest diàmetre de porus (Brock, 1983) si bé, segons la naturalesa de les membranes, els virus poden quedar-hi adsorbits. Aquesta adsorció dels virus no embolcallats a la major part dels filtres de membrana utilitzats en microbiologia es redueix saturant el filtre amb extracte de carn abans de la filtració (Mix, 1987) o

utilitzant filtres fabricats amb materials que no adsorbeixin proteïnes (Mocé-Llivina et al, 2003). Pel que fa als bacteriòfags, les membranes de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) proporcionen millors recuperacions que les membranes d'èsters de cel·lulosa saturades amb extracte de carn (Tartera et al, 1992).

Les membranes anomenades de baixa adsorció proteica poden diferenciar-se pel tipus de material emprat en la seva fabricació, trobant-se membranes de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) i de *polyethersulfone* (PES). Les membranes de PVDF hidrofíliques s'apliquen per a la filtració esterilitzant de solucions proteiques, medis de cultiu cel·lular, additius, antibiòtics i alcohols. Les membranes de PES permeten la filtració de grans volums de medis de cultiu cel·lular, additius i altres solucions aquoses sense adsorció de proteïnes i són més econòmiques que les de PVDF.

Els filtres de membrana emprats en la realització de les proves de clarificació-descontaminació per filtració poden agrupar-se en dues categories; prefiltrats, de diàmetre de porus més gran i de composició diversa i, filtres (esterilitzants o no) de diàmetre de porus igual o inferior a 0,45 µm i en el cas que ens ocupa, sempre de baixa adsorció proteica.

Com a **objectius** d'aquest capítol es plantejà trobar diferents sistemes de clarificació-descontaminació de volums de mostra petits o mitjans, utilitzant desinfectants químics, filtres de membrana i combinacions d'aquests, aplicables a diferents tipus de mostres ambientals que posteriorment fossin analitzades aplicant el mètode Viraden entre d'altres.

## 2.2 MATERIAL I MÈTODES

---

### 2.2.1 MOSTRES

Els experiments de descontaminació es realitzaren amb mostres d'aigua residual bruta i tractada (efluent secundari) procedents de dues estacions de depuració d'aigua residual (EDARs). L'EDAR Gavà-Viladecans forma part del Sistema i del Pla de Sanejament Metropolità de l'àrea de Barcelona, essent-ne la depuradora biològica principal fins el 2003, depurant aigües residuals domèstiques de diverses poblacions del Baix Llobregat, amb un cabdal de 72.000 m<sup>3</sup> per dia i 400.000 habitants equivalents. El tractament que s'hi porta a terme és de tipus biològic i suposa una reducció de sòlids en suspensió i de la matèria orgànica del 90%. Tant bon punt l'aigua residual arriba a la planta és bombada per, a continuació, ser sotmesa a les operacions de desbast, desarenatge i separació de greixos. Després d'una decantació primària de tipus físic, l'aigua és conduïda per al seu tractament biològic, mitjançant un procés d'aïreació. Segueix una decantació secundària per finalitzar amb la desinfecció de l'efluent amb clor. Aquest efluent és abocat al mar a través d'un emissari submarí que s'hi endinsa fins a una distància de 1400 m des de la línia de costa. En època d'estiu, la major part de l'aigua residual depurada s'envia a la capçalera de les corredores i canals deltaics dels municipis de Gavà i Viladecans. Així es manté el nivell freàtic necessari per als usos agrícoles de la zona i es redueix el procés de salinització dels terrenys, especialment dels propers a la costa. L'EDAR Sant Adrià de Besòs, actualment en remodelació, depura també aigües residuals domèstiques i compta amb una capacitat de 670.000 m<sup>3</sup> per dia i 3.100.000 habitants equivalents. El tractament que s'aplica és de tipus físico-químic i suposa una reducció de sòlids en suspensió del 90% i del 60% de la matèria orgànica. L'aigua residual que arriba pels col·lectors s'eleva de manera que segueixi per gravetat tota la resta del procediment. Seguidament es realitza el desbast, desarenatge i el tractament físico-químic pròpiament dit que consta de floculació (Ca(OH)<sub>2</sub> i/o FeCl<sub>3</sub>) i decantació. L'aigua de sortida dels decantadors és ja aigua tractada a la que es dona sortida per gravetat a través d'un emissari submarí de 5,75 m de diàmetre i 600 m de longitud.

Quan s'indica que les mostres d'efluent secundari havien estat contaminades experimentalment per poder determinar l'eficiència dels diferents procediments de descontaminació, vol dir que a mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica que no sobrepassaven les quantitats de  $10 \text{ ufp} \cdot \text{L}^{-1}$  d'enterovirus, se'ls afegí poliovirus 1 (Sabin) a raó de  $100 \pm 10 \text{ ufp} \cdot \text{L}^{-1}$ . D'aquesta manera, es considerarà igual o inferior al 10% la influència en els resultats dels virus naturalment presents a les mostres sobre els resultats de recuperació.

## **2.2.2 MÈTODES DE DESCONTAMINACIÓ QUÍMICA AMB CLARIFICACIÓ**

Es provaren dos desinfectants, el digluconat de clorhexidina (DGC) i el fenol, els quals afecten bacteris i fongs però no afecten els virus no embolcallats. Aquests desinfectants s'aplicaren en combinació amb procediments de filtració per clarificar i/o descontaminar mostres d'efluent secundari. Es realitzaren diferents assaigs emprant diferents concentracions d'ambdós desinfectants.

### **2.2.2.1 Descontaminació amb DGC**

#### **2.2.2.1.1 Efecte de diferents concentracions de DGC sobre poliovirus 1 (Sabin)**

Per als assaigs amb el DGC s'emprà com a solució mare una solució aquosa al 20% de DGC (Chlorhexidine 1,1'-hexamethylenebis[5-(p-chloro-phenyl)biguanide] Digluconate, C9394, Sigma).

- Es prepararen tubs estèrils amb suspensió viral de poliovirus 1 (Sabin) amb títol de  $6 \cdot 10^4 \text{ ufp} \cdot \text{mL}^{-1}$  aproximadament. Es preparà el volum adient per tal que a l'afegir el desinfectant quedés un volum final de 10 mL. Les suspensions es prepararen en aigua bidestil·lada estèril.
- A partir del tub prova es prepararen les dilucions decimals emprant PBS 1x estèril (Annex II) i es realitzà l'enumeració control de poliovirus 1 (Sabin) pel mateix mètode amb el que es realitzà el recompte passat el període d'incubació amb el desinfectant, el mètode de monocapa.

- S'afegí el volum de solució desinfectant necessari per obtenir la concentració final de desinfectant desitjada.
- S'agità suaument i es mantingué el tub estàtic a temperatura ambient (25°C aprox.) durant els temps d'incubació determinats.
- Passat el període d'incubació es retirà una fracció del tub prova (1 mL) i es procedí a la neutralització del desinfectant. Per al DGC el sistema de neutralització indicat és per dilució o per addició d'una solució de Tween i lecitina.

Per no afegir compostos que poguessin produir citotoxicitat al cultiu cel·lular emprat per a la determinació dels virus, s'escollí el procediment de dilució. Es procedí, doncs, diluint 1:100 en aigua bidestil·lada estèril freda.

- Es prepararen les dilucions decimals necessàries per a la determinació viral i es procedí amb aquesta emprant el mètode de monocapa.
- Passat el període d'incubació de les plaques, aquestes es fixaren i es tenyiren i es procedí al recompte del número de clapes i al càlcul de les reduccions logarítmiques ( $\log N_0 - \log N_t$ ).

Comprovat que el DGC no mostrava efecte damunt els enterovirus a estudi, es provà d'afegir DGC als efluents secundaris d'EDARs biològica i físico-química per tal de reduir la càrrega bacteriana sense afectar els virus i poder descontaminar així un volum més gran de mostra en el procés de filtració posterior.

#### **2.2.2.1.2 Efecte del DGC sobre els microorganismes aerobis totals presents en aigües residuals tractades d'EDARs biològica i físico-química**

A partir de mostres d'efluents secundaris d'EDARs biològica i físico-química es realitzaren les següents determinacions per valorar l'aplicabilitat de la descontaminació amb DGC.

- Es realitzà un recompte inicial (abans d'afegir el DGC) que serví de control de contaminació de l'efluent. Aquesta determinació es realitzà seguint el procediment de determinació de microorganismes aerobis per la tècnica de filtració en membrana com es detalla a l'Annex I.

- S'afegí DGC a fraccions diferents de la mostra, s'agitaren suaument i es mantingueren en estàtic a temperatura ambient durant 20 minuts. Les concentracions de DGC assajades foren: 0,5% i 0,05%.
- Es neutralitzà el DGC per dilució 1:100 en solució de Ringer ¼ freda. En aquest cas s'utilitzà una solució isotònica per als bacteris per tal que aquests no es veiessin afectats.
- Es realitzà la determinació mitjançant la tècnica de filtració en membrana com es descriu a l'Annex I.
- Es realitzà de nou el recompte de microorganismes aerobis i el càlcul de les reduccions logarítmiques per a les dues concentracions de DGC assajades.

#### **2.2.2.1.3 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica contaminades experimentalment i tractades amb DGC i prefiltració**

Per tal de saber quin era l'efecte del DGC o quina la retenció dels filtres emprats en la descontaminació dels diferents efluent, es contaminaren experimentalment les mostres amb poliovirus 1 (Sabin) i s'assajaren diferents concentracions de DGC per poder-ne avaluar la recuperació.

El procediment que es seguí es detalla a continuació:

- S'afegí una quantitat coneguda de poliovirus 1 (Sabin) a cadascuna de les mostres. Aquest era el valor emprat com a control i del qual es realitzaren enumeracions per duplicat amb cada experiment independent.
- S'afegí el volum necessari de la solució mare de DGC per obtenir la concentració final desitjada.
- S'agità i es mantingué estàtic a temperatura ambient (20-25°C) durant 20 minuts.
- Es filtrà a través dels diferents filtres assajats:
  - Filtres de membrana de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus
  - Filtres de membrana de PVDF de 5 µm de diàmetre de porus
  - Filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 5 µm de diàmetre de porus
- Es condicionà el filtrat obtingut amb MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05M.
- S'aplicà el mètode Viraden filtrant volums de 100 mL.

- Es realitzà el recompte de clapes i es calcularen els percentatges de recuperació de virus com a  $(N_t/N_0) \cdot 100$  on  $N_t$  és el nombre de virus després de descontaminar i  $N_0$  el nombre de virus afegits a la mostra.

#### **2.2.2.1.4 Enumeració d'enterovirus cultivables en efluent secundaris tractats amb DGC i prefiltració**

A partir de mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica s'assajà l'aplicació de concentracions 0,05% de DGC i filtres de membrana de baixa adsorció proteica. L'objectiu era descontaminar i/o clarificar suficientment les mostres per tal de poder aplicar el mètode Viraden per a l'enumeració d'enterovirus.

El procediment que es seguí fou el següent:

- S'afegí el volum de solució mare de DGC (20%) necessari al volum de mostra determinat per aconseguir la concentració final de DGC del 0,05%.
- S'agità suaument i es mantingué estàtic a temperatura ambient durant 20 minuts.
- Es filtrà la mostra a través de filtres de membrana de PVDF de 0,65  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus.
- Es condicionà la mostra resultant amb  $\text{MgCl}_2$  a concentració final de 0,05M.
- S'aplicà el mètode Viraden filtrant volums de 50 i/o 100 mL a través dels filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 3  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus i 47 mm de diàmetre.
- S'incubaren les plaques i es realitzà el recompte de les clapes passat el període d'incubació.

#### **2.2.2.1.5 Efecte del DGC per a possible aplicació a mostres d'efluent terciari clorat**

Es procedí a la descontaminació d'efluents terciaris que corresponien a efluent secundaris clorats *in situ* a l'estació depuradora o al laboratori, afegint DGC a concentració de 0,05%. Passat el temps de contacte de 20 minuts a temperatura ambient es procedí filtrant la mostra per filtres de 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF i s'assajaren volums de mostra de 200 mL aplicant el mètode Viraden en filtres d'èsters de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre.

## **2.2.2.2 Descontaminació amb fenol**

### **2.2.2.2.1 Efecte de diferents concentracions de fenol sobre poliovirus 1 (Sabin)**

El fenol és un desinfectant amb un coeficient de solubilitat en aigua de 6,6%. La solució mare que es preparà per a la realització dels experiments de descontaminació amb fenol era de concentració 5% (Annex II).

Es seguí el mateix procediment que per al tractament amb DGC. Les concentracions de fenol assajades per tal de valorar el seu efecte sobre poliovirus 1 (Sabin) foren 50 mg ·L<sup>-1</sup> i 100 mg ·L<sup>-1</sup>.

El fenol es pot neutralitzar per dilució o per addició de polisorbats (Tween). En el nostre cas, es neutralitzà per dilució 1:100 de la solució problema en aigua bidestil·lada estèril.

Els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) es realitzaren pels mètodes de monocapa i Viraden.

### **2.2.2.2.2 Reducció de microorganismes aerobis totals per efecte del fenol i la prefiltració en aigües residuals tractades d'EDAR biològica**

Es realitzà el recompte de microorganismes aerobis totals en mostres que provenien d'efluent secundari d'EDAR biològica. Les mostres es repartiren en volums iguals en contenidors de polipropilè estèrils i es procedí com es detalla a continuació.

- S'analitzà una mostra control sense fenol per cada rèplica, que es mantenia durant el temps d'incubació a la mateixa temperatura que les mostres problema.
- S'aplicaren concentracions de fenol de 10 mg ·L<sup>-1</sup>, 50 mg ·L<sup>-1</sup>, 100 mg ·L<sup>-1</sup> i 500 mg ·L<sup>-1</sup> durant 30 minuts.
- Passat el temps d'incubació es realitzà el recompte d'aerobis a 22°C i a 37°C (Annex I).

Com a control del procediment de descontaminació complet que inclou el tractament amb fenol i la filtració a través de filtres de membrana de 0,65 µm PVDF, es va voler valorar l'efecte de la filtració a través d'aquests filtres en la recuperació d'aerobis totals presents en aigües residuals tractades d'EDAR biològica.



Per tal de veure aquest efecte es mantenia una fracció de la mostra sense fenol durant el període d'incubació en que les mostres problema estaven en contacte amb el fenol, a la mateixa temperatura que aquestes. Passat aquest temps es filtrava la mostra a través de filtres de membrana de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus i 47 mm de diàmetre i es realitzava de nou el recompte de microorganismes en el filtrat.

#### **2.2.2.2.3 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en efluent secundari contaminat experimentalment i tractat amb fenol i prefiltració**

La legislació permet abocaments de fenol a l'aigua residual de concentracions de fins a 10 mg·L<sup>-1</sup>. Per tal d'ajustar-nos a la normativa es provaren concentracions de fenol que anaven des de 500 mg·L<sup>-1</sup> fins a 1 mg·L<sup>-1</sup>. A l'aplicar un sistema de filtració que consistia en connectar la rampa de filtració a una trompa de buit en una aixeta d'aigua corrent, quan s'apliquen concentracions de fenol de 500 mg·L<sup>-1</sup> cal garantir el factor de dilució 50. Es calculà el percentatge de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en mostres d'efluent secundari contaminades experimentalment i tractades amb diferents concentracions de fenol seguides de filtració a través de 0,65 µm PVDF com es detalla a continuació.

- S'afegí una quantitat coneguda d'ufp de poliovirus 1 (Sabin) a mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica. Aquest era el valor emprat com a control i del qual es realitzaven enumeracions per duplicat amb cada experiment independent.
- S'afegí fenol (a partir de la solució mare al 5%) per obtenir concentracions finals a la mostra de 1 mg·L<sup>-1</sup>, 2 mg·L<sup>-1</sup>, 5 mg·L<sup>-1</sup>, 10 mg·L<sup>-1</sup>, 20 mg·L<sup>-1</sup>, 50 mg·L<sup>-1</sup>, 100 mg·L<sup>-1</sup> i 500 mg·L<sup>-1</sup>.
- S'agità suaument i es va mantenir a temperatura ambient durant 30 minuts.
- Es filtrà la mostra a través de diferents filtres de membrana:
  - Filtres de membrana de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus per totes les concentracions assajades.
  - Filtres de membrana de PVDF de 5 µm de diàmetre de porus per a la concentració més alta de 500 mg·L<sup>-1</sup>.
- Es condicionà la mostra amb MgCl<sub>2</sub> per obtenir una concentració final de 0,05 M.
- S'aplicà el mètode Viraden filtrant volums de 100 mL de mostra i fent un mínim de dues rèpliques.

- Es realitzà el recompte de clapes de poliovirus 1 (Sabin) i el càlcul dels percentatges de recuperació.

En paral·lel es processaren les mateixes mostres contaminades experimentalment, emprant el mètode de concentració per floculació orgànica. Aquest procediment s'afegí com a control per a la valoració de la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) emprant un mètode conegut i per al que es disposava d'experiència al laboratori. A més, aquest és un dels mètodes de concentració de virus recomanats per diferents organitzacions (APHA, 1998; EPA, 1996) i un dels més utilitzats, fet que permetia disposar d'un punt de referència.

Per a la concentració per floculació orgànica, es partí de volums de mostra d'un litre per a cada experiència i es procedí com es detalla a l'Annex I. L'eluit es descontaminà amb cloroform com es descriu a l'Annex I. Les enumeracions de poliovirus 1 (Sabin) en aquest cas es realitzaren pel mètode de monocapa tant al control, abans de concentrar, com a la mostra final. Finalment, es compararen els percentatges de recuperació obtinguts en aquest cas, amb els dels mètodes de descontaminació amb fenol i concentració per Viraden desenvolupats.

#### **2.2.2.2.4 Enumeració d'enterovirus cultivables en efluents d'EDAR biològica tractats amb fenol i prefiltració**

Per a la determinació d'enterovirus en efluents d'EDAR biològica descontaminats per tractament amb fenol i prefiltració, es procedí com es detalla a continuació.

- Volums de mostra de mig litre de diferents decantadors (A i B) d'una EDAR biològica es tractaren amb fenol a concentració final de 500 mg·L<sup>-1</sup> durant 30 minuts.
- Passat el temps d'incubació es filtraren les mostres a través de 0,65 µm PVDF.
- Es condicionaren amb MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05 M.
- Es procedí a l'enumeració dels virus cultivables pel mètode Viraden filtrant volums de 100 mL de mostra per membrana.

## 2.2.3 MÈTODES DE CLARIFICACIÓ

Per realitzar les proves s'empraren filtres de membrana de 47 mm de diàmetre i portafiltres Swinnex® de polipropilè (SX00 047 00, Millipore). La mostra s'aplicava als portafiltres amb l'ajuda de xeringues estèrils o bé amb la bomba peristàltica quan es tractava de grans volums de mostra. Les mostres escollides per a l'avaluació de l'aplicabilitat dels sistemes de clarificació al mètode Viraden, foren de dos tipus. Mostres d'efluent secundari i mostres d'aigua de riu. S'escolliren aquest tipus de mostra pel fet que presentaven un menor grau de descontaminació microbiològica. Les mostres d'efluent secundari es recolliren en l'EDAR biològica i les mostres d'aigua de riu procediren del curs baix del riu Llobregat.

Els prefiltres emprats per clarificar les mostres d'aigua foren els següents:

- Paper de filtre Whatman 1 (1001 055, Whatman International Ltd.)
- Filtres de membrana de baixa adsorció proteica de PVDF de 0,65 µm (Durapore Membrane Filters, DVPP 047 00, Millipore) i 5 µm (SVLP 047 00, Millipore) de diàmetre de porus.

El procediment que es seguí amb les mostres d'aigua residual tractada es detalla a l'apartat següent de mètodes de descontaminació per filtració ja que es combinaren diferents tipus de prefiltres i filtres.

El procediment que es seguí per a les mostres d'aigua de riu es detalla a continuació.

### 2.2.3.1 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) a partir d'aigua de riu clarificada per prefiltració i concentrada per Viraden

Per tal de realitzar els experiments d'aplicabilitat de la clarificació d'aigua de riu i la concentració d'aquesta pel mètode Viraden es procedí com es descriu a continuació.

- Es partí de dos litres d'aigua de riu i es realitzaren mesures de turbidesa i pH.
- S'afegí poliovirus 1 (Sabin) a raó de  $50 \pm 10$  ufp per 100 mL. El control es realitzà titulant per Viraden la mateixa dilució final equivalent a la dilució en la mostra, per duplicat.
- S'agità i es prefiltrà la mostra per filtres de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus.

- Es condicionà la mostra filtrada amb  $MgCl_2$  4,14 M per obtenir una concentració final de 0,05 M.
- S'aplicà el mètode Viraden filtrant volums de 50 i 100 mL de mostra per filtres d'èsters de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre.

## 2.2.4 MÈTODES DE DESCONTAMINACIÓ PER FILTRACIÓ

Com en el cas de la clarificació s'empraren filtres de membrana de 47 mm de diàmetre i portafiltres Swinnex® de polipropilè (SX00 047 00, Millipore). Per als filtres de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus es disposà d'unitats de filtració individuals esterilitzades. La mostra s'aplicava als portafiltres o a les unitats de filtració individuals amb l'ajuda de xeringues estèrils.

Els filtres emprats per descontaminar les mostres d'aigua foren els següents:

- Filtres de membrana de PVDF de 0,45  $\mu m$  de diàmetre de porus (HVLP 047 00, Millipore).
- Filtres de PVDF de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus (Millex-GV, SLGV 025 LS i Sterivex™-GV amb campana, SVGV B10 10, Millipore).
- Filtres de polyethersulfone (PES) de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus (Millex-GP, SLGP R25 CS i Sterivex™-GP SVGP B10 10, Millipore).

### 2.2.4.1 Descontaminació per filtració d'efluent secundari d'EDAR biològica contaminat experimentalment amb poliovirus 1 (Sabin)

Per a la clarificació-descontaminació de mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica contaminades artificialment amb poliovirus 1 (Sabin) s'assajaren diferents combinacions de prefiltres i filtres. Les combinacions assajades es detallen a continuació:

- Whatman 1 + 0,45  $\mu m$  PVDF
- Whatman 1 + 0,22  $\mu m$  PVDF
- 5  $\mu m$  PVDF + 0,22  $\mu m$  PVDF
- 0,65  $\mu m$  PVDF + 0,22  $\mu m$  PVDF
- 0,65  $\mu m$  PVDF

- 0,22 µm PVDF

El procediment que s'aplicà fou el mateix en tots els casos. La prefiltració es realitzà situant els prefiltres dins portafiltres Swinnex prèviament esterilitzats.

Un cop descontaminada la mostra es procedí a l'enumeració pel mètode Viraden, amb el condicionament de la mostra per addició de MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05 M i assaig de volums de 50 mL per duplicat i una rèplica de 100 mL per a cadascun dels tractaments.

#### **2.2.4.2 Descontaminació per filtració d'aigua residual bruta**

Es compararen els recomptes de virus obtinguts després de filtrar mostres d'aigua residual bruta a través de filtres de

- 0,22 µm PVDF i
- 0,22 µm PES

En aquest cas, la mostra descontaminada es condicionà amb MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05 M i es procedí directament amb l'enumeració de virus emprant el mètode de doble capa, el qual es descriu al Capítol 4 d'aquesta memòria. L'elecció d'un mètode de quantificació directa fou possible pel fet que es tractava de mostres d'aigua residual bruta. D'aquesta manera a més, s'evità l'efecte de la filtració a l'aplicar el mètode Viraden i només es considerà l'efecte filtre.

## 2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 2.3.1 MÈTODES DE DESCONTAMINACIÓ QUÍMICA AMB CLARIFICACIÓ

#### 2.3.1.1 Descontaminació amb DGC

##### 2.3.1.1.1 Efecte de diferents concentracions de DGC sobre poliovirus 1 (Sabin)

Els resultats dels diferents assaigs realitzats es mostren a la taula 2.3.1.1.1. Amb aquests resultats es confirma que el DGC no té efecte sobre poliovirus 1 (Sabin), el qual no perd infecciositat ni amb la concentració de DGC màxima (2,5%) ni amb el temps màxim assajat de 20 minuts.

**Taula 2.3.1.1.1.** Efecte del DGC damunt poliovirus 1 (Sabin). Càlcul de les reduccions logarítmiques emprant el mètode de monocapa.

Concentració DGC	Temps de contacte			
	5 min	10 min	15 min	20 min
0,005%		-0,20 (0,14) <sup>a</sup>		-0,11 (0,15)
0,05%	-0,03 (0,06)	-0,04 (0,11)	0,12 (0,29)	0,11 (0,23)
0,5%		-0,07 (0,11)		0,05 (0,08)
2,5%		-0,07 (0,12)		0,01 (0,12)

<sup>a</sup>Valors de la mitjana (desv. estàndard) de les reduccions logarítmiques (n=4).

##### 2.3.1.1.2 Efecte del DGC sobre els microorganismes aerobis totals presents en aigües residuals tractades d'EDARs biològica i físico-química

Els resultats de la taula 2.3.1.1.2.1 mostren les reduccions de microorganismes heterotrofs aerobis presents en aigües residuals tractades quan aquest tipus de mostra es sotmet a tractament amb concentracions de DGC de 0,05 i 0,5%.

**Taula 2.3.1.1.2.1.** Reduccions logarítmiques de microorganismes aerobis totals presents en efluents de depuradora que creixen a 37°C (Red. Log. 37°C) i a 22°C (Red. Log 22°C) per l'acció del DGC aplicant les concentracions indicades durant 20 minuts a temperatura ambient (20-25°C) .

<b>Concentració DGC</b>	<b>Red. Log. 37°C</b>	<b>Red. Log. 22°C</b>
<b>0,05%</b>	5,5	6,3
<b>0,5%</b>	>6,2	>6,4

El DGC aplicat a les concentracions anteriorment indicades, elimina els microorganismes heterotrofs aerobis presents en els efluents de depuradora analitzats, pràcticament en la seva totalitat.

**2.3.1.1.3 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica contaminades experimentalment i tractades amb DGC i prefiltració**

Les mostres d'efluents de depuradora contaminades experimentalment amb poliovirus 1 (Sabin) es sotmeteren a diferents tractaments de descontaminació per combinació de DGC i prefiltració i, es valorà la recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en funció del mètode de descontaminació emprat. Els resultats obtinguts es recullen a la taula 2.3.1.1.3.1, la qual mostra els percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) per als diferents tractaments.

El tipus de filtre que permet una millor recuperació de virus, independentment de la concentració de DGC utilitzada, és el de PVDF de 5 µm de diàmetre de porus front el de 0,65 µm de diàmetre de porus. Es pensa que aquests resultats poden deure's al fet que la presència de DGC a les mostres d'efluent secundari indueix la formació de flòculs en alguns casos que dificultarien la recuperació de virus amb el filtre de menor diàmetre de porus. Aquesta formació de flòculs podria ser la responsable de la baixa i inconstant recuperació de poliovirus 1 (Sabin) amb aquest tipus de descontaminació ja que les partícules víriques poden quedar adsorbides als flòculs, els quals, s'eliminarien durant el procediment de prefiltració. D'altra banda, quan s'aplica la filtració a través de filtres de membrana de PVDF de 5 µm de diàmetre de porus de vegades es produeix citotoxicitat en el cultiu (5% de les mostres) que tot i que no afecta a la totalitat de la monocapa, dificulta el recompte de clapes.

**Taula 2.3.1.1.3.1.** Percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en efluent secundari contaminat experimentalment. Descontaminació durant 20 minuts amb les concentracions de DGC indicades i clarificació per filtració a través dels filtres indicats. Enumeració per Viraden.

Concentració de DGC	Filtres		
	0,65 µm PVDF	5 µm PVDF	5 µm èsters de cel·lulosa
0,005%	-	21,5 (6,9) <sup>a</sup>	-
0,01%	12,3 (2,5)	57,7 (22,7)	3,6 (1,2)
0,025%	71 (17,3)	62,6 (49,4)	20,2 (8,4)
0,05%	-	55,5 (50,2)	-

<sup>a</sup> Valors corresponents a la mitjana (desviació estàndard) dels percentatges de recuperació (n=3).

#### 2.3.1.1.4 Enumeració d'enterovirus cultivables en efluents secundaris tractats amb DGC i prefiltració

A partir dels resultats obtinguts (Taula 2.3.1.1.4.1) s'observa que el sistema de descontaminació per tractament amb DGC i prefiltració a través de filtres de membrana de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus, permet recuperacions de virus similars als recomptes que s'obtenen per al mateix tipus de mostra descontaminada per filtració a través filtres de membrana de PVDF de 0,22 µm de diàmetre de porus. Aquestes darreres determinacions es realitzaren com a control per tal de comprovar l'efecte del tractament amb DGC sobre els virus naturalment presents a les mostres d'efluent secundari.



**Taula 2.3.1.1.4.1.** Recuperació de virus cultivables presents en efluents secundaris d'EDAR biològica tractats amb diferents procediments de descontaminació.

	<b>DGC 0,05% i prefiltració (PVDF de 0,65 µm)</b>	<b>Filtració (PVDF de 0,22 µm)</b>
<b>Nombre de mostres</b>	9	22
<b>Mitjana (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	80,3	93,1
<b>Desv. Est.</b>	98,5	75
<b>Valor màxim (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	330	300
<b>Valor mínim (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	20	20

Dels resultats es desprèn que quan s'aplica el DGC com a desinfectant per a la descontaminació d'efluents secundaris d'EDAR biològica, es recuperen els virus presents en aquest tipus de mostra, sense diferències significatives (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ) a quan no s'aplica el desinfectant. La combinació de DGC amb filtres de diàmetre de porus superior a 0,22 µm permet obtenir major volum de mostra descontaminada, que pot ser concentrada per Viraden per enumerar els enterovirus. Així, pensem que pot aplicar-se aquest procediment quan la contaminació virològica de l'efluent sigui menor i calgui l'anàlisi de major volum de mostra.

#### **2.3.1.1.5 Efecte del DGC per a possible aplicació a mostres d'efluent terciari clorat**

Un dels tractaments més aplicats a les aigües residuals tractades en el nostre entorn geogràfic, per tal de fer possible la reutilització d'aquestes, és la cloració. Així, doncs, molts dels efluents terciaris que es generen als quals podria aplicar-se el mètode de descontaminació amb DGC, corresponen a efluents secundaris clorats. Totes les proves realitzades tant amb efluents secundaris clorats *in situ* a l'estació depuradora, com amb efluents secundaris clorats al laboratori, no van permetre l'obtenció de resultats numèrics vàlids de recuperació de virus, ja que el tractament amb DGC en aquest tipus de mostra induí una destrucció de la monocapa cel·lular emprada en l'enumeració dels virus. La presència de clor o compostos derivats de clor, incrementà el fenomen de formació de floculs i la citotoxicitat. Una possible explicació a aquest fet és que les sals de clorhexidina a pH fisiològic produeixen un compost carregat positivament. El clor està carregat negativament. Potser aquest és el fet que fa que es

produeixi interacció entre les dues molècules i es generin els compostos que produeixen posteriorment la toxicitat al cultiu cel·lular.

### 2.3.1.2 Descontaminació amb fenol

#### 2.3.1.2.1 Efecte de diferents concentracions de fenol sobre poliovirus 1 (Sabin)

Les taules 2.3.1.2.1.1 i 2.3.1.2.1.2 mostren els resultats de reducció de poliovirus 1 (Sabin) per l'acció de diferents concentracions de fenol realitzant l'enumeració viral pel mètode de monocapa i pel mètode Viraden respectivament. Les concentracions de fenol i els temps de contacte es mostren a les taules.

De nou, aquestes experiències van servir per confirmar que el tractament amb fenol no presenta un efecte de reducció o pèrdua d'infecciositat sobre poliovirus 1 (Sabin) en les condicions descrites.

**Taula 2.3.1.2.1.1.** Efecte de diferents concentracions de fenol damunt poliovirus 1 (Sabin). Càlcul de les reduccions logarítmiques emprant el mètode de monocapa.

Concentració de fenol	Temps de contacte	
	2 minuts	10 minuts
50 mg ·L <sup>-1</sup>	0,02 (0,15) <sup>a</sup>	0,00 (0,02)
100 mg ·L <sup>-1</sup>	-0,02 (0,01)	-0,05 (0,02)

<sup>a</sup>Valors de la mitjana (desv. estàndard) de les reduccions logarítmiques (n=3).

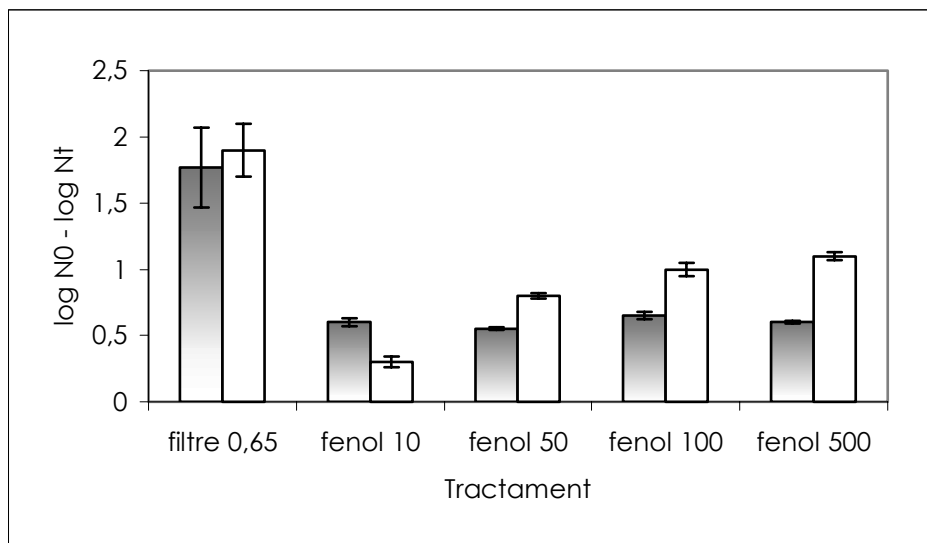
**Taula 2.3.1.2.1.2.** Efecte de diferents concentracions de fenol damunt poliovirus 1 (Sabin). Càlcul de les reduccions logarítmiques emprant el mètode Viraden.

Concentració de fenol	Temps de contacte	
	2 minuts	10 minuts
50 mg ·L <sup>-1</sup>	-0,08 (0,14) <sup>a</sup>	-
100 mg ·L <sup>-1</sup>	-0,01 (0,12)	0,07 (0,04)

<sup>a</sup>Valors de la mitjana (desv. estàndard) de les reduccions logarítmiques (n=3).

**2.3.1.2.2 Efecte del fenol sobre els microorganismes aerobis totals presents en aigües residuals tractades d'EDAR biològica**

Els resultats (Figura 2.3.1.2.2.1) mostren que l'addició de fenol a les mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica resulta només en la reducció de mig logaritme de microorganismes heterotròfics aerobis. On realment es produeix el control de la quantitat de microorganismes aerobis que poden romandre presents a la mostra després del tractament de descontaminació, és durant el procés de filtració a través de 0,65 µm PVDF. La reducció de microorganismes aerobis totals en aquest cas es situa entre 1,5 i 2 Log<sub>10</sub>, superior a la que s'observa amb els diferents tractaments amb fenol. Les evidències mostraren que la càrrega de contaminació bacteriana o fúngica que roman a la mostra després del tractament de clarificació es pot controlar amb els antibiòtics i antifúngics addicionals (gentamicina, ceftazidime i nistatina) presents al medi overlay utilitzat per al mètode Viraden (Annex II).



**Figura 2.3.1.2.2.1.** Reducció logarítmica de microorganismes aerobis totals que creixen a 22°C (■) i a 37°C (□) per efecte de la filtració a través de 0,65 µm PVDF (filtre 0,65) i per tractament amb diferents concentracions de fenol (fenol 10 mg·L<sup>-1</sup>, fenol 50 mg·L<sup>-1</sup>, fenol 100 mg·L<sup>-1</sup> i fenol 500 mg·L<sup>-1</sup>) aplicades durant 30 minuts.

### **2.3.1.2.3 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en efluent secundari contaminat experimentalment i tractat amb fenol i prefiltració**

Els resultats dels percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) afegit experimentalment a mostres d'efluent secundari, que s'obtenen aplicant tractament amb diferents concentracions de fenol es mostren a la taula 2.3.1.2.3.1.

L'addició de fenol a la mostra en cadascuna de les concentracions finals assajades i la filtració posterior a través de filtres de PVDF de 0,65  $\mu\text{m}$  i 5  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus, permet clarificar suficientment la mostra per aplicar-hi el mètode Viraden per tal d'enumerar els virus presents en aquest tipus de mostra.

Tot i que no hi ha diferències significatives entre la utilització de filtres de 0,65 o 5  $\mu\text{m}$  PVDF (ANOVA,  $P > 0,05$ ), quan s'aplica la filtració a través de 5  $\mu\text{m}$  PVDF, la concentració de fenol de 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  no és suficient per descontaminar-detoxificar la mostra i poder aplicar el mètode Viraden. Les mateixes mostres descontaminades amb 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenol i filtrades a través de 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF no produeixen toxicitat del cultiu mentre que sovint en produeixen quan han estat filtrades a través de 5  $\mu\text{m}$  PVDF. Hi ha compostos citotòxics, segurament associats a partícules en suspensió, que travessen els filtres de 5  $\mu\text{m}$  PVDF i s'acumulen al filtrat i en canvi no travessen 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF. Aquestes observacions ja s'observaven en el cas del tractament amb DGC.

Els percentatges de recuperació de virus emprant la descontaminació per tractament amb fenol i prefiltració a través de 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF són equivalents als obtinguts emprant els mètodes de descontaminació per filtració (apartat 2.3.3.1). L'avantatge és que quan s'aplica el tractament combinat de fenol més filtració a través de 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF s'obtenen entre 250 i 500 mL de mostra d'efluent secundari descontaminada emprant 1 sol filtre de membrana de 0,65  $\mu\text{m}$  i aquest volum és superior al que s'obté quan només s'aplica filtració per 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF (150 mL aproximadament). Aquesta mostra descontaminada per qualsevol d'ambdós procediments, pot assajar-se directament per Viraden sense presència d'efecte citotòxic posterior en el cultiu.

**Taula 2.3.1.2.3.1.** Percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en mostres d'efluent secundari contaminades experimentalment i tractades amb els procediments que es detallen. El tractament amb fenol s'aplica durant 30 minuts a volums de mostra de 500 mL. La floculació orgànica es realitza a partir d'un litre de mostra.

Tractament de descontaminació- clarificació i enumeració	n	Mitjana del percentatge	
		de recuperació de poliovirus 1 (Sabin)	Desv. Est.
Floculació orgànica + CHCl <sub>3</sub> + monocapa <sup>a</sup>	5	82,2	27,3
Fenol 500 mg ·L <sup>-1</sup> + 5 µm PVDF + Viraden <sup>b</sup>	6	135,3	38,4
Fenol 500 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	9	112,4	25,2
Fenol 100 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	3	95,8	17,1
Fenol 50 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	4	83	12,2
Fenol 20 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	4	100,2	25,4
Fenol 10 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	14	116	34,2
Fenol 5 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	3	157,7	52,1
Fenol 2 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	3	200	25,6
Fenol 1 mg ·L <sup>-1</sup> + 0,65 µm PVDF + Viraden	3	186,5	52,4

<sup>a</sup>Valors obtinguts en titulacions de 10 rèpliques de plaques en cada cas, emprant el mètode monocapa

<sup>b</sup>Valors obtinguts en titulacions de 2 rèpliques de plaques en cada cas, emprant el mètode Viraden

n: nombre d'experiments independents

#### **2.3.1.2.4 Enumeració d'enterovirus cultivables naturalment presents en efluent d'EDAR biològica tractats amb fenol i prefiltració**

Els enterovirus cultivables naturalment presents en efluent secundari d'EDAR biològica s'enumeraren havent aplicat tractaments amb fenol a les mostres, emprant el mètode Viraden. Els resultats de valors d'enterovirus que s'obtingueren es mostren a la taula 2.3.1.2.4.1.

**Taula 2.3.1.2.4.1.** *Valors d'enterovirus cultivables (ufp L<sup>-1</sup>) presents en efluents secundaris d'EDAR biològica. Tractament de les mostres amb 500 mg L<sup>-1</sup> de fenol durant 30 minuts i filtració a través de 0,65 µm PVDF. Enumeració per Viraden realitzant filtracions de 100 mL per membrana.*

	<b>Fenol 500 mg L<sup>-1</sup> i prefiltració (0,65 µm PVDF)</b>
<b>Nombre de mostres</b>	9
<b>Mitjana (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	11,2
<b>Desv. Est.</b>	4,7
<b>Valor màxim (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	21
<b>Valor mínim (ufp L<sup>-1</sup>)</b>	6,4

Val a dir que les diferències que s'observen en els recomptes de virus cultivables en aquest cas respecte a les mostres descontaminades amb DGC o per filtració a través de 0,22 µm PVDF (Taula 2.3.1.1.4.1) segurament es deuen al fet que les mostres d'efluent secundari que s'utilitzaren per a la descontaminació amb fenol corresponien a l'hivern. Les mostres emprades per als experiments de descontaminació amb DGC corresponien al mes de juny. Aquesta diferència estacional, que comporta una diferència en les densitats de virus cultivables en aigua residual bruta d'aproximadament un logaritme decimal, amb valors superiors a la primavera i l'estiu respecte l'hivern (veure Capítol 5) explicaria la diferència en el nivell d'enterovirus presents en l'efluent. Cabria considerar també, en aquest sentit, el volum de mostra concentrat per a la determinació de contaminació vírica emprant el mètode Viraden. Com s'ha indicat al Capítol 1, el volum de mostra que es pot concentrar emprant un filtre de membrana quan s'aplica el mètode Viraden és un factor important que influencia la recuperació de virus. En aquest sentit, val a dir que per a aquest tipus de mostra d'efluent secundari i per a l'obtenció de la major recuperació d'enterovirus cultivables, s'estableix un volum òptim de concentració de 20 mL i la recomanació de fer dues o més rèpliques d'aquest volum per comptes de concentracions de volums superiors (Capítol 1). Però, en el moment en que es realitzaren les proves de les quals es presenten els resultats en aquest apartat, el volum de concentració necessari s'havia establert en 100 mL basant-nos en dades històriques de valors d'enterovirus en aquest tipus de mostres. Els mètodes de concentració i enumeració emprats en estudis anteriors proporcionaren resultats de concentracions d'enterovirus inferiors a les que s'obtingueren amb el mètode Viraden. Així, el canvi quan als mètodes de

concentració i enumeració d'enterovirus, va fer que es considerés de nou el volum de mostra d'efluent secundari a avaluar.

## 2.3.2 MÈTODES DE CLARIFICACIÓ

### 2.3.2.1 Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) a partir d'aigua de riu clarificada per filtració i concentrada per Viraden

Es realitzaren diferents proves per tal de valorar l'aplicabilitat del mètode Viraden a la concentració i enumeració d'enterovirus presents en aigua de riu amb terboleses variables. Els resultats (Taula 2.3.2.1.1) pel que fa als percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) que s'obtenen aplicant el mètode Viraden en aigua de riu clarificada per filtració a través de 0,65 µm PVDF són variables. La mitjana del 78% de recuperació és superior al 50%, valor de recuperació mitjà descrit sovint per diferents mètodes de concentració de virus a partir de mostres ambientals i considerat òptim (APHA, 1998; Sobsey i Jones, 1979; Schwartzbrod i Lucena, 1978).

**Taula 2.3.2.1.1.** Percentatges de recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en aigua de riu contaminada experimentalment emprant el mètode Viraden.

Mostra	Terbolesa (NTU)	pH	Percentatge recuperació
1	11,13	7,13	75
2	7,6	7,11	84
3	31,3	7,06	49
4	71,9	6,94	28
5	14,6	7,1	88
6	8,2	6,97	154
7	49,6	7,07	73
<b>Mitjana</b>			<b>78,71</b>
<b>Desv. Est.</b>			<b>39,33</b>

El mètode de clarificació per filtració a través de 0,65 µm PVDF permet l'obtenció de mostres d'aigua de riu que poden ésser concentrades directament i analitzades pel

mètode Viraden, per determinar la presència i quantificar el nombre de virus cultivables en aquest tipus de mostra. Els percentatges de recuperació que s'obtenen són similars als descrits per al mètode de floculació orgànica (Katzenelson et al, 1976), essent aquest un dels mètodes més eficients per a la recuperació de virus a partir de mostres de terbolesa variable.

A partir dels resultats es calcula i s'estableix una correlació negativa entre la terbolesa i el percentatge de recuperació de virus amb  $R=0,66$  que confirma com l'augment de la terbolesa produeix un descens en la capacitat de concentració de virus del mètode Viraden.

### **2.3.3 MÈTODES DE DESCONTAMINACIÓ PER FILTRACIÓ**

#### **2.3.3.1 Descontaminació per filtració d'efluent d'EDAR biològica contaminat experimentalment amb poliovirus 1 (Sabin)**

Un cop utilitzats els sistemes de descontaminació en efluent secundaris emprant les combinacions de prefiltrats i filtres indicades, en tots els casos, el volum que es pot filtrar a través de filtres d'èsters de cel·lulosa de 3  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus a l'aplicar el mètode Viraden, és superior als 100 mL. Això és, es poden filtrar més de 100 mL sense que afecti la integritat de les cèl·lules que formen la monocapa, però sense tenir en compte doncs, l'efecte en el rendiment del mètode per pèrdua de recompte d'ufp amb l'augment del volum concentrat.

Els valors dels percentatges de recuperació per a cada experiment són el resultat de l'enumeració de poliovirus 1 (Sabin) aplicant el mètode Viraden, en volums de 50 mL i 100 mL de mostra descontaminada. Per a cada tractament s'enumeraren per duplicat volums de 50 mL i es realitzà una filtració de 100 mL. Els resultats de la taula 2.3.3.1.1 corresponen a la realització de 6 experiments independents en tots els casos.

Per al tipus de mostres analitzades, quan s'aplica la filtració a través de 0,65  $\mu\text{m}$  PVDF, no és necessari la descontaminació prèvia amb fenol. La filtració de l'efluent secundari a estudi a través de diàmetre de porus de 0,65  $\mu\text{m}$ , és suficient per poder processar la mostra aplicant el mètode Viraden. Tot i això, la descontaminació amb DGC o amb fenol suposen un tractament addicional que permet l'obtenció de major volum d'efluent descontaminat i una eliminació de toxicitat, quan les característiques de la mostra ho requereixin.



El mètode recomanat, doncs, per a la clarificació i/o descontaminació de mostres d'efluent secundari pel fet d'ésser econòmic, simple i per l'elevat percentatge de recuperació, és el de filtració a través de 0,65 µm PVDF. Quan es presentin problemes de citotoxicitat i/o contaminació de la monocapa cel·lular provocats pel tipus de mostra a analitzar, es recomana afegir un pas de descontaminació previ amb 10 mg · L<sup>-1</sup> de fenol durant 30 minuts.

**Taula 2.3.3.1.1.** *Recuperació de poliovirus 1 (Sabin) en efluent secundari contaminat experimentalment i tractat amb els sistemes de descontaminació per filtració que s'indiquen.*

<b>Tractament de descontaminació</b>	<b>Volum descontaminat (mL)</b>	<b>Mitjana de percentatge de recuperació</b>	<b>Desv. Est.</b>
Whatman 1 + 0,45 µm PVDF	30-40	105,4	16,9
Whatman 1 + 0,22 µm PVDF	10-20	105,8	29,6
5 µm PVDF + 0,22 µm PVDF	50-60	78,2	18,3
0,65 µm PVDF + 0,22 µm PVDF	60-75	115,5	33,1
0,65 µm PVDF	150-155	134,0	49,8
0,22 µm PVDF	10-15	90,0	15,4

### 2.3.3.2 Descontaminació per filtració d'aigua residual bruta

La taula 2.3.3.2.1 mostra els resultats obtinguts en les titulacions en paral·lel de mostres d'aigua residual bruta descontaminada per filtració utilitzant filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus de dues composicions diferents, *polyvinylidene fluoride* (PVDF) i *polyethersulfone* (PES), ambdós de baixa adsorció proteica.

La descontaminació d'aigua residual bruta emprant filtres de baixa adsorció proteica es provà amb anterioritat i es veié que la filtració directe de les mostres a través de filtres de 0,22 µm PVDF només permet la descontaminació de volums de mostra de 5 mL (Mocé-Llivina et al, 2002). En aquest mateix estudi es veu que a l'afegir-hi la prefiltració per Whatman 1 s'obtenen resultats que no difereixen estadísticament dels obtinguts amb la filtració únicament i, el volum de mostra descontaminada pot incrementar-se fins a 10 mL. Amb la utilització de filtres de 0,45 µm de diàmetre de porus apareix toxicitat i/o contaminació a la monocapa cel·lular en un 30% de les

mostres, un percentatge prou elevat que fa que es desestimi la seva utilització (Mocé-Llivina et al, 2002).

**Taula 2.3.3.2.1.** Recomptes d'enterovirus en aigua residual bruta descontaminada per filtració a través de 0,22  $\mu\text{m}$  PVDF i 0,22  $\mu\text{m}$  PES. Enumeracions realitzades pel mètode de doble capa (veure Capítol 4) ( $\text{ufp} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

Mostra	Filtre emprat per a la descontaminació	
	0,22 $\mu\text{m}$ PVDF	0,22 $\mu\text{m}$ PES
1	33,3	50
2	<16,6	150
3	50	<33,3
4	116,7	333,3
5	66,7	100
6	25	66,7
7	375	333,3
8	133,3	100
9	33,3	100
10	80	60
<b>Mitjana</b>	<b>101,5</b>	<b>143,7</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>109,2</b>	<b>111,4</b>

Un dels sistemes doncs, adient per a la descontaminació d'aigua residual bruta, és el de filtració a través de filtres esterilitzants de 0,22  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus. Quan es comparen les enumeracions de virus obtingudes, s'observa que La utilització de filtres de PES permet recomptes d'enterovirus en aigua residual bruta que no difereixen significativament (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ) dels obtinguts amb la utilització de filtres de PVDF i el volum de mostra filtrada pot incrementar-se dels 4-5 mL filtrats per PVDF fins a 30-40 mL, avantatge en termes de temps i econòmic ja que, al menor consum de filtres s'afegeix un menor cost d'aquests.

En la primera descripció del mètode Viraden s'informava de l'addició d'antibiòtics extra al medi d'assaig permetent així l'assaig directe de mostres naturals (aigua de mar i aigua de l'aixeta) sense necessitat de descontaminar la mostra (Papageorgiou et al, 2000). Però l'aplicació del mètode a diferents mostres d'aigua residual per a les quals el mètode semblava el més adient en aquells moments, requeria la descontaminació de la mostra. Per tal de facilitar la filtració a través de filtres esterilitzants i a través de les membranes d'èsters de cel·lulosa de 3 µm de diàmetre emprades en el mètode Viraden, la clarificació es feia imprescindible, com a mínim per a les mostres d'efluents secundaris i terciaris de depuradora on cal l'anàlisi de volums de 50 a 100 mL i de 1000 mL o més respectivament per a la detecció de virus.

Fins el moment s'aplicaven dos procediments de descontaminació per a l'anàlisi de virus en aigua residual i en concentrats virals: la descontaminació amb cloroform (Buras, 1974, APHA, 1998) i, la filtració a través de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 0,22 µm pretractats amb extracte de carn per prevenir l'adsorció dels virus combinats amb prefiltres de fibra de vidre (EPA, 1996). La desinfecció química és un procediment de

descontaminació alternatiu previ a l'enumeració de virus. El cloroform, que no inactiva els virus no embolcallats, ha estat utilitzat àmpliament per descontaminar aigua residual o suspensions de virus concentrats a partir de mostres d'aigua emprant diferents procediments (Buras, 1974, APHA, 1998). Tot i això, la utilització de cloroform presenta inconvenients metodològics quan es necessiten volums de 100 mL o més de mostra descontaminada per tal de realitzar el recompte o l'anàlisi dels virus presents en ella, ja que es requereix una gran quantitat de producte i a més, aquesta pràctica genera gran quantitat de residus tòxics. Es va observar que la filtració de mostres d'aigua que contenien desinfectants que no s'unien als filtres de membrana, no afectava la monocapa cel·lular quan s'aplicava el mètode Viraden (Papageorgiou, 2000). Així, es poden utilitzar desinfectants sense efecte virucida per descontaminar mostres abans d'enumerar-ne els virus per Viraden. Es proven el fenol i el DGC i s'observa que quan aquests desinfectants s'apliquen a mostres d'efluent secundari, es generen partícules que queden retingudes als filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa de 3 µm de diàmetre de porus emprats en el mètode Viraden i aquestes tenen efectes nocius sobre el cultiu cel·lular. Per prevenir aquest efecte, s'afegeix un

pas previ de filtració de les mostres desinfectades a través de filtres de membrana de 0,65 µm PVDF i 5 µm PVDF de diàmetre de porus. Aquests filtres no sempre eliminen la toxicitat quan s'utilitza el DGC com a desinfectant però, s'aconsegueixen en gairebé el 100% dels casos, filtrats descontaminats/detoxificats quan s'aplica com a desinfectant el fenol a concentracions de 500 mg·L<sup>-1</sup>. A més, els filtres de 0,65 µm PVDF permeten l'obtenció de volums de mostra descontaminada de 250 a 500 mL amb una terbolesa i característiques determinades que permeten que el total del volum de mostra sigui analitzat pel mètode Viraden. Cal diferenciar però, els volums que poden descontaminar-se dels volums que poden ésser filtrats aplicant el mètode Viraden sense que es produeixi pèrdua en l'eficiència d'aquest mètode.

En l'estudi s'han assajat els filtres de membrana de PVDF i de PES, els quals,

d'acord amb els resultats presentats, donen resultats similars als obtinguts amb els altres mètodes. Aquests filtres tenen l'avantatge que no necessiten cap tractament previ. Tot i això, com que els filtres de membrana de diàmetre de porus petit es colmaten amb molta facilitat pels sòlids en suspensió presents a les mostres d'aigua i, de vegades és necessària la filtració d'un determinat volum de mostra superior, pot introduir-se la prefiltració prèvia de la mostra.

El test de diferents tipus de prefiltres es desenvolupà considerant dos factors; la retenció dels virus i el grau d'eliminació dels sòlids en suspensió. Cap dels prefiltres assajats retenia quantitats significatives de virus, però la clarificació de molts d'ells no era suficient per permetre la descontaminació per filtració de volums de mostra suficients per a la detecció d'enterovirus tant pel mètode de monocapa com per Viraden.

## 2.4 CONCLUSIONS

---

---

Els tractaments químics amb DGC o fenol ajuden a la clarificació-descontaminació de mostres d'efluent secundari.

Les mostres descontaminades per combinació d'agents químics i filtres poden assajar-se directament per a la determinació de virus utilitzant el mètode Viraden.

El tractament amb DGC no pot aplicar-se a mostres d'efluents terciaris clorats.

Com per a la resta de mètodes de concentració, l'eficiència del mètode Viraden depèn del volum de mostra concentrat, possiblement degut al contingut en matèria orgànica de les mostres.

Els filtres de baixa adsorció proteica de PVDF i de PES permeten la descontaminació d'aigua residual bruta per filtració sense necessitat de tractament addicional del filtre. Els filtres de PES presenten avantatges, entre d'altres, permeten la filtració d'un major volum de mostra.

## ANNEX CAPÍTOL 2

### A.2.1 Aplicació del mètode Viraden per a la determinació d'enterovirus en mostres ambientals

La informació que es presenta a continuació s'ha originat de les experiències i observacions realitzades

durant el desenvolupament del present treball. Pretén ser un conjunt de recomanacions pràctiques relacionades amb l'aplicació del mètode Viraden per a la determinació d'enterovirus en mostres ambientals. La taula A.2.1.1 indica el volum de mostra i el tipus de filtre recomanat per a la correcta aplicació del mètode Viraden depenent del tipus de mostra a analitzar.

*Taula A.2.1.1. Volums de filtració i mida de filtre recomanats en l'aplicació del mètode Viraden depenent del tipus de mostra a analitzar.*

Mostra	Volum (mL)	Filtre (mm diàmetre)
<b>Aigua residual bruta</b>	1 - 5	47
<b>Efluent secundari</b>	20 - 50	47
<b>Efluent terciari</b>	100 - 500	90
<b>Aigua de riu (8 a 450 NTU)</b>	500 - 1000	90
<b>Aigua de mar (1 a 10 NTU)</b>	1000 - 2000	90

*Taula A.2.1.2. Període d'incubació necessari per a l'obtenció de clapes.*

Tipus de virus o tipus de mostra	Període d'incubació post-infecció mitjà (hores)	Període d'incubació post-infecció mínim (hores)
<b>Poliovirus 1 (Sabin)</b>	36 a 48	30
<b>Coxsackievirus B4 i B5</b>	60 a 72	48
<b>Echovirus 6</b>	60 a 72	48
<b>Mostra ambiental (aigua residual, riu o mar)</b>	84 a 96	

Pel que fa al període d'incubació de les plaques aquest pot fer-se més curt per tal que no s'uneixin les clapes i l'observació d'un gran nombre d'elles sigui possible. Aquest fet però pot provocar que algunes zones de lisi provocades per la infecció viral no siguin del tot visibles i s'obtingui una infravaloració del nombre de virus presents a la suspensió viral analitzada. Els períodes indicats a la taula A.2.1.2 com a períodes post-infecció mitjans correspondrien als recomanats per a una bona observació de clapes en circumstàncies en que no es produeixin fenòmens de solapament per l'elevat nombre de clapes per placa. Per als virus en cultius purs s'indica a més, un període mínim d'incubació necessari per a la correcta observació de les clapes.

## **A.2.2 Descontaminació- Clarificació de mostres ambientals**

Entre la terbolesa d'una mostra determinada i la capacitat de filtració d'un filtre s'estableix una relació. La capacitat de filtració d'un filtre pot venir donada per la colmatació i per la taxa de filtració les quals són afectades amb un augment de la terbolesa i, aquesta afectació repercuteix en la disminució del volum filtrat.

Es provà d'establir una relació entre la terbolesa d'una mostra i el volum que podia clarificar-se o descontaminar-se per filtració emprant filtres de 47 mm de diàmetre de PVDF de 0,65  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus. Aquests filtres són els que es recomanen

en el present estudi per a la clarificació de volums de mostres d'aigua relativament netes (efluents de depuradora, aigua de riu, aigua de mar) abans de processar la mostra aplicant el mètode Viraden de concentració i enumeració de virus.

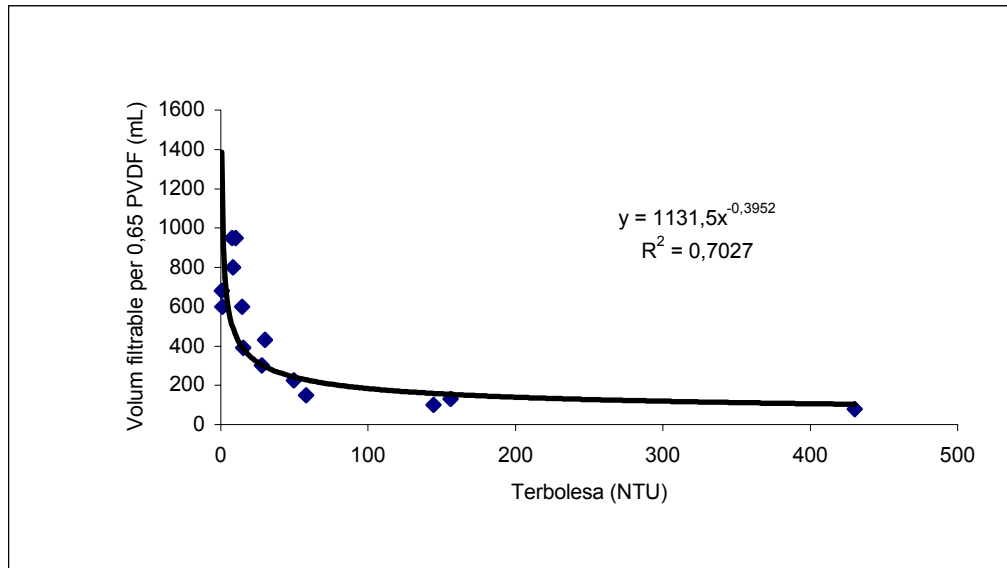
Establir aquesta relació hauria de permetre facilitar el procediment de descontaminació ja que es coneixeria la capacitat de filtració d'un filtre en funció de la terbolesa de la mostra i podria obtenir-se el resultat òptim en l'aplicació del mètode de descontaminació recomanat i en l'enumeració per Viraden.

Quan es procedí amb la descontaminació de les mostres emprades en la realització del present treball de tesi doctoral es realitzaren dues mesures addicionals de les característiques de l'aigua per tal de poder establir si existia relació entre la terbolesa (primera mesura) i el volum filtrat a través de filtres de 47 mm de diàmetre de PVDF de 0,65  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus (segona mesura). Aquestes mesures es realitzaren per a dos tipus de mostra relativament netes, aigua de riu i aigua d'efluent secundari d'EDAR biològica.

La mesura del volum filtrat es realitzà amb l'ajuda d'una proveta.

La mesura de la terbolesa es realitzà emprant un turbidímetre (Model 43900 Hach). Per tal de realitzar les mesures calia calibrar l'aparell prèviament, cada vegada.

La figura A.2.2.1 mostra la relació establerta entre la terbolesa de les mostres i el volum d'aigua de riu que pot filtrar-se per un únic filtre de PVDF de 47 mm de diàmetre i 0,65  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus, a partir de les mesures realitzades.



**Figura A.2.2.1.** Relació entre la terbolesa de l'aigua de riu i el volum de mostra que pot clarificar-se per filtració a través de filtres de 47 mm de diàmetre de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus.

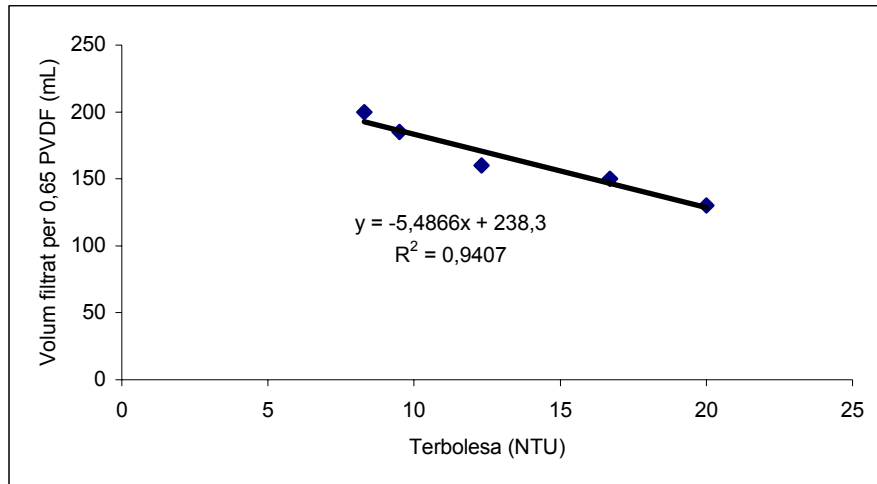
La relació que s'estableix en el cas de l'aigua de riu entre la terbolesa i el volum de mostra que pot filtrar-se per un filtre de 47 mm de diàmetre de 0,65 µm PVDF segueix un model de regressió potèncial.

Quan s'aplica el mètode de descontaminació per filtració a través de 0,65 µm PVDF a mostres d'efluent secundari d'EDAR biològica s'estableix una regressió lineal entre la terbolesa de la mostra i el volum que pot filtrar-se a través d'un d'aquests filtres de membrana de 47 mm de diàmetre abans de la seva colmatació (Figura A.2.2.2).

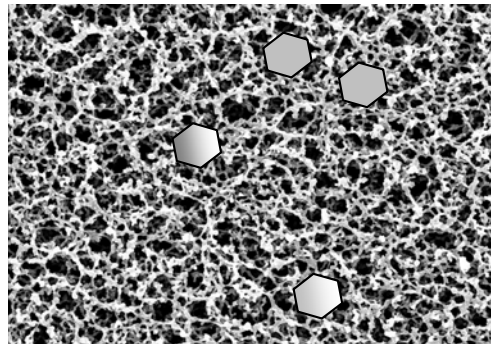
La diferència en el tipus de regressió entre el cas de l'aigua de riu i l'aigua residual tractada pot deure's simplement als intervals de terbolesa estudiats.

Val a dir que el riu del que es van prendre les mostres per a l'estudi de vegades conté molt fang en suspensió.





**Figura A.2.2.2.** Relació entre la terbolesa de l'efluent secundari i el volum d'aquest que pot clarificar-se per filtració a través d'un filtre de membrana de 0,65 µm PVDF de 47 mm de diàmetre.



CAPÍTOL 3. APLICACIÓ DEL MÈTODE  
VIRADEN PER MESURAR LA  
INACTIVACIÓ DE VIRUS ADSORBITS  
A SUPERFÍCIES

## 3.1 INTRODUCCIÓ

---

Com s'ha assenyalat a la Introducció General, els virus presenten diferents vies de transmissió. En el cas dels virus entèrics humans, aquesta transmissió pot produir-se a través d'aigua de beguda, aliments i superfícies contaminades. Pel que fa a brots produïts per virus entèrics, en molts dels casos, el vehicle de transmissió s'ha identificat com superfícies contaminades amb material fecal (Butz et al, 1993; Sattar et al, 1986).

La supervivència dels virus entèrics sobre diferents superfícies inanimades (fomites) varia depenent del tipus de virus que es tracti. HAV i rotavirus sobreviuen millor que astrovirus i aquests, a la vegada, millor que poliovirus i adenovirus quan es troben adsorbits a diferents suports (Abad et al, 1994; Abad et al, 2001). Tots ells però, poden sobreviure períodes llargs adsorbits a diferents materials que es troben envoltant els humans (Abad et al, 1994).

Els germicides s'utilitzen àmpliament en la descontaminació de material mèdic, de superfícies i de les mans i per al control ambiental dels virus. La determinació de l'activitat antimicrobiana de desinfectants i antisèptics és un procediment complex (Anònim, 1981; Anònim, 1984). Els productes químics utilitzats com a antisèptics per a la pell són bastant diferents dels utilitzats en les altres dues aplicacions, i es troben disponibles diferents mètodes per avaluar la seva activitat virucida (Sattar i Ansari, 2002). Les publicacions al respecte han determinat que quan s'apliquen mètodes per assajar l'activitat bactericida dels desinfectants en suspensió hi ha diferències significatives en els resultats dins i entre laboratoris (Bloomfield i Looney, 1992). Una de les raons d'aquestes diferències podria ser la complexitat del procediment. La determinació de l'activitat virucida dels desinfectants i els antisèptics encara és més complicada (Anònim, 1989; Boudouma et al, 1984). L'activitat virucida dels germicides químics es mesura tant en suspensió com sobre suports. En els assaigs en suspensió una quantitat coneguda de l'organisme a estudi, amb o sense material interferent, es barreja amb un volum del germicida a assajar a la dilució d'ús coneguda per malmetre el virus test. Les barreges es mantenen durant el temps de contacte a una temperatura específica, es neutralitzen per aturar l'activitat virucida, s'assaja el nombre d'organismes infecciosos i es calcula el grau de pèrdua d'infecciositat. La complexitat metodològica afegeix variació extra als resultats fins i tot quan s'utilitzen mètodes estandarditzats, fet pel qual, els assaigs virucides haurien de ser el més simples possible.

Un dels principals problemes per a l'anàlisi de l'activitat virucida de desinfectants i antisèptics és la citotoxicitat dels compostos. Aquesta s'evita diluint la barreja de suspensió viral i producte a analitzar o, separant el desinfectant o antisèptic mitjançant columnes de Sephadex LH20 que retenen aquests productes però no retenen els virus. Ambdós mètodes presenten les seves pròpies limitacions; alguns desinfectants no es retenen per les resines de Sephadex (ex. amonis quaternaris) i, la dilució requereix un títol viral suficientment alt ( $10^7$  a  $10^9$  unitats infeccioses per mL) per tal de poder aplicar-se i dur-se a terme la titulació i l'obtenció de resultats. La necessitat de diluir, a més, fa que s'hagin d'analitzar grans volums de solució test. Valot et al (2000) descriuen un mètode de filtració en membrana per evitar aquest problema. Apliquen test en suspensió de desinfectants, i seguidament filtren la barreja. El percentatge de virus que queda retingut depèn del tipus de virus i, a més, un procediment d'elució posterior fa que s'afegeixi una pèrdua viral d'aproximadament 0,35 unitats logarítmiques.

Quan s'utilitzen concentracions elevades de virus hi ha dos inconvenients; primer, les concentracions elevades de virus no reflecteixen les situacions reals i, segon, pot produir-se agregació viral, fenomen que afecta a la mesura de la resistència dels virus front als desinfectants. Aquest fet explicaria els resultats variables obtinguts per autors diferents quan a l'activitat virucida de desinfectants i antisèptics (Floyd i Sharp, 1978; Shaffer et al, 1980; Sharp i Leong, 1980).

El mètode Viraden permet l'avaluació de l'activitat virucida de desinfectants i antisèptics aplicant tests en suspensió. I permet avaluar l'activitat sense necessitat de disposar de concentracions de virus elevades (Papageorgiou et al, 2001).

D'altra banda però, els patògens es troben a la natura normalment adsorbits a les superfícies. Així, els resultats dels assaigs sobre suports són també importants per predir l'activitat de germicides químics en situacions de camp reals. Cal doncs, assajar l'efecte de diferents condicions sobre els virus adsorbits a suports sòlids. Aquests assaigs són, generalment, més complexos i difícils d'aplicar que els assaigs d'activitat virucida sobre virus en suspensió.

En els assaigs sobre suports descrits fins al moment, un volum conegut de suspensió de l'organisme a assajar es fa assecar sobre una superfície representativa i llavors, l'inòcul sec s'exposa al producte químic en qüestió durant un temps de contacte a una temperatura determinada. Quan ha passat el temps de contacte, la barreja organisme-germicida s'elueix de la superfície suport i es procedeix a l'enumeració de l'eluat per determinar el grau de pèrdua de viabilitat del virus. Aquests tipus d'assaigs presenten diversos inconvenients; els més importants implicarien el fet que es pogués confondre la inactivació dels virus causada per un determinat producte amb pèrdues d'aquests durant el període de dessecació (difícilment evitable), durant períodes de

rentat (fet evitable) i finalment, per problemes o ineficàcia del procediment d'elució previ a la titulació (de nou, difícilment evitable). Aquests tres efectes confonen el resultat final d'inactivació. Pel que fa al període de dessecació, caldria establir molt bé la seva durada, a quina temperatura es realitza i sobretot, quina resistència presenten els virus a aquest període ja que aquest pot tenir una implicació posterior en la determinació de la capacitat del virus de sobreviure quan s'assaja el desinfectant. Aquesta observació es deriva del fet que, un descens pronunciat en el títol de poliovirus 1 i adenovirus en el pas de la dessecació, fa que es redueixi la possibilitat que el virus persisteixi els períodes posteriors adsorbit sobre fomites i sotmès a condicions de dessecació (Abad et al, 1994). Val a dir que astrovirus resisteix bé el pas de la dessecació sobre fomites (Abad et al, 2001). Pel que fa als rentats, haurien d'establir-se i controlar-se les condicions de pH i de nou la durada i la temperatura. I, pel que fa al procés d'elució, hauria d'assajar-se la supervivència dels diferents virus a aquest i la capacitat d'infecció del cultiu hoste que presenten després d'aquest procés.

Així, doncs, en general, la diferent supervivència o resistència dels diferents virus a les condicions d'assaig haurà de ser un factor a considerar en el moment d'escollir un virus model per a ésser emprat en els assaigs de valoració de desinfectants.

Per als assaigs d'inactivació de virus adsorbits s'han descrit diversos tipus de suports que permeten la realització d'aquests tipus d'assaigs. Petits quadrats de vidre (Best et al, 1994), suports fabricats amb fusta de pollancre (Yilmaz i Kaleta, 2003), pell de porc (Woolwine i Gerberding, 1995), poliestirè (Abad et al, 1997) i les pròpies mans d'humans (Sattar i Ansari, 2002).

Cal considerar el potencial d'una superfície determinada per disseminar una infecció viral, el qual depèn de la freqüència de contacte, de la capacitat d'alliberar el virus adsorbit i de quina part del cos de l'hoste entra en contacte amb la superfície contaminada. Aquests fets suggereixen que no hi ha un tipus de superfície model que pugui representar el gran nombre de variacions que es troben al camp. Tot i això, hi ha consideracions bàsiques a tenir en compte al seleccionar una superfície per a ésser emprada com a suport en els assaigs virucides de productes químics:

- No ha d'unir, adsorbir o segrestar el virus test de manera que faci difícil l'elució d'aquest.
- La seva superfície no ha de ser molt llisa; per tal que representi d'una manera adient la topografia de les superfícies representatives en les condicions d'ús.
- Hauria de poder ser reutilitzable mitjançant descontaminació i esterilització.
- La superfície ha de permetre dipositar el volum de suspensió de virus test i de desinfectant necessàries.

- Ha de poder recuperar-se la major part possible dels virus dipositats en el suport durant el procés d'elució.
- L'elució ha de realitzar-se amb un volum que possibiliti l'anàlisi de tot l'eluat.

Les característiques del mètode Viraden permetrien l'aplicació d'aquest per mesurar la inactivació viral de les partícules víriques adsorbides als filtres de membrana, utilitzant aquests filtres, doncs, com a suports per a l'aplicació dels assaigs de desinfectants en superfície. A més, com en el cas de l'assaig amb virus en suspensió, l'aplicació del mètode Viraden per avaluar l'activitat virucida de desinfectants i antisèptics sobre virus adsorbits, permetria treballar amb títols virals més propers a les situacions reals de contaminació.

### **3.1.1 DESCRIPCIÓ DELS DESINFECTANTS I ANTISÈPTICS ASSAJATS. CARACTERÍSTIQUES I MECANISMES D'ACCIÓ VIRUCIDA**

#### **3.1.1.1 Glutaraldehyd**

El glutaraldehyd (GTA) és un dialdehyd que s'utilitza com a desinfectant i com a esterilitzant, particularment per a desinfecció i esterilització a baixa temperatura d'endoscopis i equipament quirúrgic. Per a desinfecció, es comercialitza una solució àcida al 2%, la qual ha d'ésser activada (alcalinitzada) abans de la seva utilització. El glutaraldehyd té un ampli espectre d'activitat contra bacteris i les seves espores, fongs i virus i hi ha gran quantitat d'informació disponible actualment sobre els mecanismes pels quals són inactivats aquests organismes (Gorman i Scott, 1977; Gorman et al, 1980; Power, 1995; Scott i Gorman, 1991; Russell et al, 1999).

És una molècula altament reactiva i per tant, un agent virucida potent (Favero i Bond, 1991; Kobayashi et al, 1984). La taxa de reacció és pH dependent, augmentant considerablement dins el rang de pH de 4 a 9. Concentracions baixes (<0,1%) de glutaraldehyd alcalí són efectives contra poliovirus purificats (Bailly et al, 1991). La pèrdua d'infecciositat de poliovirus induïda per glutaraldehyd està associada amb canvis a la càpside (Bailly et al, 1991). El glutaraldehyd a concentracions de 0,05 i 0,005% interacciona amb proteïnes de la càpside de poliovirus i echovirus; les diferències en la sensibilitat d'aquests dos virus reflecteixen variacions estructurals entre ells (Chambon et al, 1992).

### 3.1.1.2 Compostos halogenats

Els components basats en clor i iode són els halogenats microbicides més significants i s'ha usat tradicionalment i s'usen com a desinfectants i antisèptics.

#### 3.1.1.2.1 Clor i compostos clorats

Es disposa de diverses revisions a destacar que tracten de les propietats químiques, físiques i microbiològiques dels agents clorats (Bloomfield, 1996; Dychdala, 1991). Els tipus més importants són l'hipoclorit de sodi, el diòxid de clor i els components N-clor com el dicloroisocianurat de sodi (NaDCC) i les cloramines. Les solucions d'hipoclorit de sodi són molt utilitzades en desinfecció de superfícies dures i poden utilitzar-se per desinfectar vessaments de sang que contingui HIV o HBV. El NaDCC pot utilitzar-se per aquests propòsits i té l'avantatge de proporcionar una elevada concentració de clor lliure disponible i és menys susceptible d'inactivació per matèria orgànica. A l'aigua, l'hipoclorit de sodi s'ionitza per produir  $\text{Na}^+$  i ió hipoclorit ( $\text{ClO}^-$ ) el qual estableix un equilibri amb l'àcid hipocloròs (Bloomfiel, 1996). A pH entre 4 i 7, el clor existeix predominantment com a HClO com a molècula activa, mentre que a pH per sobre de 9, predomina l'ió  $\text{ClO}^-$ .

Tot i que pugui sorprendre per la gran quantitat d'estudis que hi ha sobre els agents clorats, el mecanismes d'acció d'aquests no es coneixen totalment. Els agents clorats són altament oxidants i per tant, poden destruir l'activitat de proteïnes (Bloomfield, 1996); l'oxidació es potencia a pH àcids, en els que l'activitat dels agents clorats és màxima. L'àcid hipocloròs ha estat considerada la molècula activa responsable de la inactivació bacteriana produïda pels agents clorats. L'ió  $\text{ClO}^-$  té un efecte menor comparat amb el HClO no dissociat (Dychdala, 1991). Aquest fet correlaciona amb l'observació que, l'activitat dels agents clorats és major quan el percentatge de HClO no dissociat és elevat. D'altra banda, estudis realitzats amb diòxid de clor mostren un major efecte d'aquest sobre poliovirus a pH 10 que a pH 6 (Alvarez i O'Brien, 1982). Els resultats d'aquest mateix estudi indiquen que el iode reduiria la capacitat dels virions per adsorbir-se a les cèl·lules hoste actuant a nivell de proteïnes de la càpside.

Els agents clorats tenen activitat virucida (Best et al, 1994; Bloomfield et al, 1990; Dennis et al, 1979; Mbithi et al, 1990; Resnick et al, 1986; Rubin, 1991; Sattar et al, 1994; Springthorpe et al, 1986; Springthorpe i Sattar, 1990). D'una banda es troben evidències que el clor afecta les proteïnes de la càpside i la integritat d'aquesta (Floyd et al, 1979;

O'Brien i Newman, 1979) i de l'altra, que afecta l'ARN de poliovirus (Taylor i Butler, 1982).

S'estableixen diferències de resistència individual al clor entre els diferents virus entèrics. Aquestes diferències poden venir donades per factors de l'entorn del virus o per propietats d'aquests. Entre d'altres, el pH i la temperatura (Engelbrecht et al, 1980), l'ambient iònic (Sharp et al, 1980) i l'estat d'agregació (Jensen et al, 1980).

#### **3.1.1.2.2 Iode i compostos iodats**

Tot i que menys actiu que el clor, el iode és bactericida, fungicida, virucida i esporocida i actua ràpidament (Gottardi, 1991). Tot i que les solucions aquoses o alcohòliques (tintura) de iode s'utilitzen des de fa al menys 150 anys com a antisèptics, aquestes s'associen amb irritació i tinció excessiva. A més, les solucions aquoses són generalment inestables; en solució, com a mínim set espècies de iode estan presents en un complex equilibri amb el iode molecular ( $I_2$ ) com a principal responsable de l'eficàcia antimicrobiana (Gottardi, 1991).

De manera semblant al clor, l'acció antimicrobiana del iode és ràpida, fins i tot a baixes concentracions. Es coneix poc sobre l'acció antiviral del iode, però els virus no embolcallats són menys sensibles que els embolcallats (Prince et al, 1991). De manera similar al cas dels bacteris, sembla que el iode ataca proteïnes de superfície dels virus embolcallats. Per als no embolcallats també s'ha descrit activitat sobre proteïnes de la càpside, reduint la capacitat dels virions per adsorbir-se a les cèl·lules hoste (Alvarez i O'Brien, 1982).

### **3.1.2 INACTIVACIÓ DE VIRUS PER FACTORS FÍSICS**

L'atmosfera és un ambient poc hospitalari per als microorganismes, principalment per l'estrès de dessecació. Això fa que els microorganismes, entre ells els virus, puguin mantenir-se biològicament actius un temps limitat en aquest tipus d'ambient abans no assoleixen un nou ambient (un organisme hoste o un suport). Molts microorganismes presenten mecanismes específics de resistència però els virus no es compten entre aquests, fet pel qual, la supervivència d'aquests en els aerosols pot mesurar-se sovint en segons.



Molts factors ambientals s'han mostrat influents sobre la capacitat de supervivència dels microorganismes. Els més importants són la humitat relativa i la temperatura. El contingut d'oxigen, els ions específics, la radiació UV, diversos contaminants i altres, són factors que influeixen en la pèrdua d'activitat biològica.

La humitat relativa es defineix com el contingut d'aigua relatiu a l'aire i es considera el factor més important per a la supervivència dels microorganismes de transmissió aèria. En general, els virus embolcallats tenen major supervivència a l'aire quan la humitat relativa és inferior al 50%; mentre que, els virus amb nucleocàpside nua són més estables a humitats relatives superiors al 50%. Però hi ha diferents excepcions; diferents tipus de rotavirus (entre ells rotavirus SA11) presenten major supervivència a humitats relatives baixes i mitjanes (del 30 al 50%) que a humitats altes del 80% (Ijaz et al, 1985b; Sattar, 1984). I el cas del virus de l'hepatitis A, que a diferència de la resta d'enterovirus presenta una supervivència inversament proporcional al nivell d'humitat relativa. Així, el HAV presenta supervivències mitjanes que superen els 7 dies a humitat relativa baixa (25%) i temperatures de 5°C i en canvi, aquestes es redueixen a dues hores amb humitats relatives del 95% i 35°C (Mbithi et al, 1991). Poliovirus 1 (Sabin) sí presenta major supervivència a humitats relatives elevades que a humitats relatives baixes (Ijaz et al, 1985a; Mbithi et al, 1991).

La temperatura és l'altre factor principal implicat en la inactivació dels microorganismes. En general, les altes temperatures promouen la inactivació i, les baixes temperatures, permeten temps de supervivència més llargs. Els efectes de la temperatura es troben estretament lligats amb els d'altres factors ambientals que inclouen la humitat relativa.

Com a **objectius** per al present capítol es plantejà:

- Determinar l'efecte de diferents solucions desinfectants sobre els virus quan aquests es troben adsorbits a suports sòlids i comparar els resultats amb l'efecte de les mateixes condicions sobre els virus quan estan en suspensió.
- Valorar l'efecte de diferents temperatures sobre la persistència de diferents enterovirus i comparar la supervivència que presenten aquests quan es troben adsorbits a suports sòlids respecte a quan es troben en suspensió.
- Determinar l'efecte de la humitat relativa a diferents temperatures sobre diferents enterovirus adsorbits sobre suports sòlids.

## 3.2 MATERIAL I MÈTODES

### 3.2.1 EFECTE COMPARATIU DE DESINFECTANTS I ANTISÈPTICS SOBRE VIRUS EN SUSPENSÍO I VIRUS ADSORBITS

Els assaigs de desinfectants es realitzaren sobre virus en suspensió i sobre virus adsorbits a membranes d'èsters de cel·lulosa. Aquesta condició s'utilitzà per simular l'efecte de la desinfecció de superfícies. S'avaluà l'acció de diferents concentracions de diferents desinfectants i antisèptics;

- 0,5 ppm de clor
- 200 mg ·mL<sup>-1</sup> de iode
- 20 mg ·mL<sup>-1</sup> de iode
- 0,2 mg ·mL<sup>-1</sup> de iode
- 0,05% glutaraldehid
- 0,1% glutaraldehid

Les solucions de clor es prepararen a partir de lleixiu comercial encetat en el mateix moment de preparar la solució. D'aquesta manera, s'assumí que el lleixiu a la sortida de fàbrica és una solució d'hipoclorit sòdic amb 42,5 g de clor actiu per litre.

Les solucions de iode es prepararen a partir d'una solució tòpica farmacèutica per a ús extern de tintura de iode. La composició d'aquesta solució per 100 mL segons el fabricant és la següent: 2 g de iode, 2,5 g de iodur potàssic i 100 mL d'alcohol etílic 50°. A partir d'aquesta solució es prepararen dilucions 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> i 1:10<sup>6</sup> en aigua bidestil·lada estèril.

Les solucions de glutaraldehid es prepararen a partir d'una solució al 25% realitzant les dilucions en aigua bidestil·lada estèril a pH 8.

Els virus sobre els que s'aplicaren les solucions desinfectants foren:

- poliovirus 1 (Sabin) (Lsc-2ab),
- coxsackievirus B5,
- echovirus 6 -aïllament d'aigua residual identificat per RT-PCR i RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)- i

- AR51101.1 -enterovirus amb patró de RFLP identificat com a Patró 1, freqüentment aïllat d'aigua residual (descriu en el Capítol 4 d'aquesta memòria)-. El Patró 1 correspon a Echovirus per seqüenciació d'una regió del genoma.

Els assaigs es realitzaren en paral·lel amb els virus en suspensió i els virus adsorbits. Els temps assajats en cada cas es mostren a les taules de resultats. Totes les anàlisis es realitzaren per triplicat fent el recompte dels enterovirus per duplicat en cadascuna de les rèpliques experimentals.

Es realitzaren dilucions decimals dels estocs de virus de títol alt (conservats en MEM 1% SFB a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) en PBS 1x estèril (pH 7,2) fins obtenir el valor de virus desitjat en cada cas. La dilució final per tal d'obtenir suficient volum de suspensió viral per poder realitzar tots els assaigs en paral·lel es realitzà en aigua bidestil·lada estèril.

### **3.2.1.1 Assaigs amb virus en suspensió**

Es realitzaren els assaigs adaptats de Papageorgiou et al (2001). El procediment tal com s'aplicà a l'estudi es detalla a continuació.

- Es repartí la suspensió viral en volums de mostra problema equivalents utilitzant tubs estèrils de polipropilè de 50 mL de capacitat.
- S'afegí el volum de desinfectant necessari per obtenir la concentració final de desinfectant desitjada.
- S'agità suaument i s'incubà estàtic a temperatura ambient ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) el temps indicat en cada cas.
- L'activitat del desinfectant es neutralitzà de la manera indicada a la taula 3.2.1.1.1 dependent del tipus de desinfectant utilitzat en cada cas.
- Es titulà el volum necessari de suspensió per tal d'obtenir plaques amb un nombre adient de clapes aplicant el mètode Viraden.

**Taula 3.2.1.1.1.** Neutralització de l'activitat desinfectant en els assaigs realitzats amb els virus en suspensió.

Desinfectant	Mètode d'inactivació
Clor	20 µL de tiosulfat 3% per 100 mL de solució que conté 1 ppm de clor
Iode	Volum de tiosulfat 3% equivalent al volum de tintura de iode utilitzat
Glutaraldehyd	Dilució 1:100 en fred

### 3.2.1.2 Assaigs amb virus adsorbits

Per als test amb els virus adsorbits, es procedí com s'indica a continuació.

- S'afegiren volums d'1 mL de suspensió viral amb el nombre de virus determinat (màxim 300 ufp · mL<sup>-1</sup>) a volums de 8 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,05 M.
- Es filtrà la suspensió obtinguda amb l'ajuda d'una rampa de filtració amb embuts prèviament esterilitzats, aplicant el cabdal indicat per al mètode Viraden (0,03 L · min<sup>-1</sup>) emprant filtres d'èsters de cel·lulosa de 47 mm de diàmetre. Els filtres es condicionaren prèviament amb MgCl<sub>2</sub> 0,05 M.
- Com a control del nombre de virus a temps inicial s'usaren filtres obtinguts de la manera descrita emprant el mètode Viraden que es titularen immediatament després de la seva preparació.
- Les membranes problema amb els virus adsorbits que es sotmeteren als assaigs amb els desinfectants, es disposaren dins plaques de Petri de 50 mm de diàmetre estèrils amb la part on havien quedat adsorbits els virus cap a dalt.
- S'aplicaren volums de 5 mL per placa del desinfectant a assajar en cada cas. Aquest superava el volum necessari per a que el desinfectant cobrís completament el filtre (2 mL).
- S'incubaren sense agitació a temperatura ambient (20-25°C) el temps indicat en cada cas.
- Es retirà el filtre i es procedí a la neutralització, de manera diferent depenent del desinfectant o antisèptic assajat (Taula 3.2.1.2.1). La neutralització es realitzà submergint el filtre en els volums de solució indicada en cada cas.

- S'incubaren durant 5 a 10 minuts a temperatura ambient.
- Es retirà l'excés de neutralitzant per contacte del filtre amb paper 3MM sec per la zona on no hi havia els virus adsorbits.
- Es procedí amb la titulació pel mètode Viraden, disposant el filtre damunt la suspensió cel·lular en plaques de cultiu cel·lular amb monocapa confluent de cèl·lules BGM. S'afegí el medi overlay i s'incubaren les plaques durant 48 a 72 hores.
- Passat el període d'incubació es retiraren l'agar i el filtre, es fixaren i tenyiren les plaques amb la solució de cristall violeta i formaldehid i, es realitzà el recompte de clapes.

**Taula 3.2.1.2.1.** Neutralització de l'activitat desinfectant en els assaigs realitzats amb els virus adsorbits.

Desinfectant	Mètode d'inactivació <sup>a</sup>
Clor	20 mL de tiosulfat 0,003%
Iode	20 mL de tiosulfat 0,003%
Glutaraldehid	50 mL d'aigua bidestil·lada estèril freda (5 ± 3)°C

<sup>a</sup>Els volums indicats corresponen als necessaris per a un filtre de membrana de 47 mm de diàmetre.

### 3.2.2 PERSISTÈNCIA A DIFERENTS TEMPERATURES

S'avaluà la persistència de diferents virus sotmesos a diferents temperatures de conservació valorant a més, l'efecte que tenia sobre ells el fet de trobar-se en una suspensió aquosa o bé adsorbits a una superfície (els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa). Es feu una valoració de les temperatures de conservació dels virus a curt termini (temperatura ambient, refrigeració i congelació).

Per als experiments de conservació a curt termini, les temperatures assajades foren:

- temperatura ambient (20 ± 5)°C
- refrigeració (5 ± 3)°C
- congelació a (-10 ± 5)°C

Els virus a estudi foren poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B5, echovirus 6 i AR51101.1 (Echovirus - Patró 1).

- Es prepararen dilucions decimals de cadascun d'aquests virus en PBS estèril pH 7,2 fins obtenir un nombre final de virus per mL que fos enumerable pels mètodes utilitzats en les anàlisi, el mètode Viraden i el mètode de monocapa (màxim 300 ufp). Es preparà el volum total necessari de suspensió viral de cadascun dels virus de manera que tots els tubs i totes les filtracions es realitzaren a partir de la mateixa suspensió viral.
- Per a les valoracions amb els virus en suspensió, es repartiren volums d'1,2 mL de la suspensió viral en microtubs estèrils preparant el nombre de tubs necessaris per tal de realitzar determinacions de supervivència a diferents temps (24 hores, 48 hores, 72 hores, 96 hores i 312 hores) emprant com a mètode de titulació en paral·lel el mètode Viraden i el mètode de monocapa.
- Per a les valoracions amb els virus adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa es procedí a la filtració de volums d'1 mL de suspensió viral aplicant el mètode Viraden. Els filtres resultants amb els virus adsorbits a la superfície es mantingueren dins plaques de Petri de 50 mm de diàmetre estèrils segellades amb "parafilm" (menys en el cas de la incubació a temperatura ambient en que les plaques es mantingueren sense segellar).
- Es repartiren els tubs i els filtres corresponents als diferents virus, protegits de la llum, en diferents zones per tal d'obtenir les diferents temperatures: al laboratori per a temperatura ambient, en una cambra a  $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$  i en una cambra de congelació a  $(-10 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ .
- Es procedí a les valoracions de la quantitat de virus que es mantingueren en les diferents condicions durant els temps indicats i emprant com s'ha dit, dos mètodes diferents. Per als virus en suspensió, es titulà 1 mL en cada cas.

### 3.2.3 PERSISTÈNCIA A DIFERENTS HUMITATS RELATIVES

Per als experiments de valoració de l'efecte de la humitat relativa s'escolliren dos virus, un de col·lecció (poliovirus 1 (Sabin)) i el que s'aïlla en major percentatge a partir de mostres d'aigua residual (echovirus 6) per tal de valorar l'efecte de la humitat relativa quan aquests es trobaven adsorbits a un suport i es mantenien a temperatura ambient i refrigerats.

- Es prepararen dilucions decimals en PBS estèril pH 7,2 de cadascun d'aquests virus fins obtenir un nombre final de virus per mL que fos enumerable pel mètode Viraden. Es preparà el volum total necessari de suspensió viral de cadascun dels virus de manera que tots els tubs i totes les filtracions es realitzaren a partir de la mateixa suspensió viral.
- Per a la valoració dels virus en suspensió, es repartí el volum total de suspensió en tubs a raó de 1,2 mL de suspensió viral preparant els tubs necessaris per a les valoracions a diferents temps (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h i 312 h) i a diferents temperatures, temperatura ambient i  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Les titulacions es realitzaren cada vegada per duplicat, així, cada conjunt de 12 tubs s'incubava a la temperatura determinada protegits de la llum.
- Per a la valoració de la humitat relativa, es prepararen filtres de membrana amb 1 mL de suspensió viral aplicant el mètode Viraden emprant filtres de 47 mm de diàmetre. Els filtres es prepararen per duplicat per tal de comparar filtres que es mantenien amb humitat i filtres que es mantenien en sec.
- Es seguiren dues aproximacions depenent de la temperatura d'incubació:
  - A temperatura ambient, els filtres es mantingueren dins plaques de Petri de 50 mm de diàmetre estèrils sense segellar per tal d'obtenir les condicions de sequedat ambiental i, la resta de filtres es mantingueren dins un recipient (tancat més o menys hermètic) on s'aconseguia preservar la humitat amb paper de cel·lulosa negat d'aigua bidestil·lada. Cada dia s'humitejava de nou el paper per tal que es mantingués el màxim nivell possible d'humitat.
  - A la cambra de  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , els filtres es mantingueren dins plaques de Petri de 50 mm de diàmetre estèrils segellades amb "parafilm" i, la resta, es disposaren sense segellar dins d'un recipient hermètic on es produí un ambient sec per la presència de partícules de sílica gel (211335.1210, Panreac).
- Passat el període d'incubació en cada cas, es procedí a la titulació dels virus en suspensió i dels adsorbits pel mètode Viraden. Per als virus en suspensió es titulà 1 mL. Els filtres que s'havien mantingut amb humitat s'aplicaren directament sobre les cèl·lules BGM, mentre que els filtres als que s'havia aplicat dessecació s'humitejaren prèviament amb  $\text{MgCl}_2$  0,05 M estèril per tal que al dipositar-los damunt la suspensió cel·lular no es produís citotoxicitat (fenomen observat en experiments exploratoris).



### 3.2.4 VALORACIÓ DEL POSSIBLE EFECTE DE L'ADHERÈNCIA DELS VIRUS AMB PRESENCIA D'IONS DIVALENTS A LES PARETS DE MICROTUBS

Per realitzar els experiments de persistència de virus a diferents temperatures s'empraren dilucions de virus en una solució de  $\text{MgCl}_2$  0,05 M ja que aquesta condició és la que s'utilitza per a l'adsorció dels virus a la membrana quan s'aplica el mètode Viraden i, es volien equiparar al màxim les condicions ambientals (de l'entorn) del virus. La presència d'ions divalents afecta en l'adsorció dels virus i pot afectar per tant en l'adherència d'aquests als materials en els que es trobin continguts. Es va voler comprovar si existien aquests fenòmens d'agregació o adherència que poguessin modificar els resultats dels experiments realitzats amb els virus en suspensió.

Es prengué com a control on no es produïa adherència dels virus a les parets del tub, la suspensió en PBS, condició comprovada i descrita anteriorment per Gassilloud (2003).

Per tal de realitzar aquesta prova es prepararen dilucions de poliovirus 1 i echovirus 6 emprant com a diluents PBS pH 7,2 i  $\text{MgCl}_2$  0,05 M fins obtenir títols de virus de  $(100 \pm 20)$  ufp  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . La dilució en PBS es prengué com a control; sense ions divalents a la solució no hauria de produir-se adsorció ni adherència dels virus a les superfícies. La dilució en  $\text{MgCl}_2$  0,05 M era la que s'emprava en els experiments de valoració de la persistència a diferents temperatures. Aquesta condició era la que hauria pogut influenciar en els resultats finals de reducció o inactivació de virus.

Aquestes dilucions es mantingueren a dues temperatures, a temperatura ambient (amb temperatures enregistrades de 28 a 30°C) i refrigerades a la cambra a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

Es prengueren fraccions d'aquestes a diversos intervals de temps; una primera a temps zero que serví de control per a l'enumeració dels virus presents a l'inici de l'experiment i posteriorment a les 24, 48, 72, 96 i 168 hores.

Es procedí titulant, emprant el mètode Viraden, fraccions d'1 mL de les dilucions en PBS per a cadascun dels virus, d'1 mL de les dilucions en  $\text{MgCl}_2$  0,05 M i a més, d'1 mL de les dilucions en  $\text{MgCl}_2$  0,05 M tractades amb SDS a concentració final 10 mM. Aquest últim tractament s'aplicà per tal de desadherir els possibles virus que haguessin quedat en les parets dels tubs i es procedí com es detalla a continuació.

A la fracció de la dilució en  $\text{MgCl}_2$  0,05 M s'afegí SDS a concentració final 10 mM, es deixà durant 5 minuts a temperatura ambient i es procedí a recuperar el volum agitant a l'hora suaument amb la pipeta per tal de separar els possibles virus adherits a les parets dels microtubs. Per tal de poder realitzar l'enumeració de virus aplicant un

mètode de titulació sobre cultiu cel·lular sense que la presència d'SDS afectés les cèl·lules, s'aplicà una dilució 1:100 de la fracció tractada en  $MgCl_2$  0,05 M i s'aplicà el mètode Viraden concentrant tot el volum resultant. Aquesta condició es va mostrar, en estudis previs, sense efecte citopàtic sobre les cèl·lules BGM emprades en la titulació.

## 3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 3.3.1 EFECTE COMPARATIU DE DESINFECTANTS I ANTISÈPTICS SOBRE VIRUS EN SUSPENSÍO I VIRUS ADSORBITS

Els resultats que s'obtenen a partir dels experiments realitzats per a la valoració de l'efecte de diferents desinfectants i antisèptics sobre diferents virus, s'expressen com a valors de reducció logarítmica. Aquesta reducció logarítmica es calcula restant el valor logarítmic de la concentració de virus en un temps determinat del valor logarítmic de la concentració de virus inicial. Així doncs, s'obté la reducció en el títol viral que presenten els diferents enterovirus assajats en suspensió i adsorbits a suports d'èsters de cel·lulosa, quan s'apliquen els desinfectants i antisèptics indicats a les taules 3.3.1.1 i 3.3.1.2.

Una consideració inicial pel que fa als valors mitjans de reducció logarítmica en el títol viral. Es considera que els valors inferiors a 0,3 podrien deure's més a la incertesa o imprecisió en el mètode de quantificació (Viraden) que a una reducció o inactivació viral real. Per aquest fet es considera que per valors de reducció inferiors a 0,3 unitats logarítmiques no s'ha produït inactivació viral, si aquesta es mesura com a reducció del títol viral.

Hi ha diferents consideracions generals a fer-se pel que fa a la resistència dels virus als tractaments amb desinfectants i antisèptics assajats. D'una banda, val a dir que, tot i tractar-se de quatre virus que corresponen al mateix gènere *Enterovirus*, la resposta que s'obté front als diferents tractaments varia depenent del virus assajat. Un mateix tractament aplicat a diferents virus fa que cadascun d'aquests presenti una inactivació diferent, podent agrupar-se, per a un tractament determinat, en grups de virus més o menys resistents. D'altra banda, fet més esperable, els diferents tractaments aplicats a un sol virus, mostren efectes diferents.

Els virus adsorbits sobre un suport resisteixen durant més temps l'acció d'un determinat desinfectant o antisèptic quan es compara amb l'acció d'aquest sobre el virus en suspensió (Taula 3.3.1.3). Per als casos assajats, els virus mostren major resistència a l'efecte dels desinfectants quan estan adsorbits, trobant-se diferències significatives (*Student's T Test*,  $P < 0,05$ ) en tots els casos si es compara amb les mateixes condicions sobre els virus en suspensió. I aquest fet s'observa per a tots els virus i tots els desinfectants assajats.

**Taula 3.3.1.1.** Reducció logarítmica per acció de desinfectants i antisèptics sobre enterovirus quan aquests es troben en suspensió. Resultats mitjans (desv. est.) de 3 experiments independents (titulacions per duplicat).

Desinfectant o antisèptic	Temps (min)	Poliovirus 1 (Sabin)	Coxsackievirus B5	Echovirus 6	AR51101.1
<b>Clor 0,5 ppm</b>	3	5,3 (0,4)	2,0(0,1)	2,2 (0,1)	3,2 (0,0)*
	10	>6,4	2,2 (0,1)	2,3 (0,1)	4,1 (0,0)
<b>Iode 200 mg mL<sup>-1</sup></b>	3	1,1 (0,1)	nd	>2,8	>3,5
	10	4,9 (0,2)		>7,6	>8,2
<b>Iode 20 mg mL<sup>-1</sup></b>	3	nd	nd	>2,9	4,5 (0,0)
	10			>7,6	6,5 (0,2)
<b>Iode 0,2 mg mL<sup>-1</sup></b>	3	nd	3,4 (0,1)	2,6 (0,0)	nd
	10		4,9 (0,1)	3,6 (0,0)	
<b>GTA 0,05%</b>	15	2,8 (0,2)	0,7 (0,0)	1,3 (0,1)	1,1 (0,0)
	30	3,3 (0,1)	0,7 (0,0)	2,1 (0,1)	2,1 (0,0)
	60	3,9 (0,5)	0,8 (0,0)	3,0 (0,1)	3,1 (0,0)
<b>GTA 0,1%</b>	5	nd	2,6 (0,2)	2,9 (0,5)	1,7 (0,1)
	15		3,8 (0,2)	>3,4	4,3 (0,2)

nd: no determinat

\* Les desviacions estàndard indicades a la taula com a 0,0 es troben entre 0,01 i 0,04.

**Taula 3.3.1.2.** Reducció logarítmica per acció de desinfectants i antisèptics sobre enterovirus quan aquests es troben adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. Resultats mitjana (desv. est.) de 3 experiments independents (titulacions per duplicat).

Desinfectant o antisèptic	Temps (min)	Poliovirus 1 (Sabin)	Coxsackievirus B5	Echovirus 6	AR51101.1
<b>Clor 0,5 ppm (0,5 mg L<sup>-1</sup>)</b>	3	1,7 (0,4)	0,5 (0,1)	0,2 (0,1)	2,3 (0,0)*
	10	2,2 (0,3)	1,0 (0,1)	0,6 (0,3)	2,3 (0,0)
<b>Iode 200 mg mL<sup>-1</sup></b>	3	0,3 (0,1)			
	10		nd	nd	nd
<b>Iode 20 mg mL<sup>-1</sup></b>	3	0,3 (0,1)	2,3 (0,0)		0,7 (0,0)
	10	0,3 (0,1)	>2,3	nd	2,3 (0,2)
<b>Iode 0,2 mg mL<sup>-1</sup></b>	3		1,8 (0,2)	0,6 (0,2)	0,0 (0,0)
	10		2,2 (0,2)	0,8 (0,1)	0,0 (0,0)
<b>GTA 0,05%</b>	15	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,4 (0,0)	0,7 (0,1)
	30	0,1 (0,0)	0,2 (0,1)	1,6 (0,2)	1,9 (0,1)
	60	2,1 (0,4)	0,2 (0,1)	2,1 (0,2)	2,4 (0,2)
<b>GTA 0,1%</b>	5			0,8 (0,1)	1,0 (0,2)
	15	Tox	Tox	Tox.	Tox.

nd: no determinat

\* Les desviacions estàndard indicades a la taula com a 0,0 es troben entre 0,01 i 0,04.

Les diferències quan a la reducció dels diferents virus en funció de si estan en suspensió o adsorbits a suports de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa, són diferents per a cadascun dels virus (Taula 3.3.1.3) variant entre 1,3 i 2,7 logaritmes, mostrant-se sempre, com s'ha dit, més sensibles quan es troben en suspensió que quan es troben adsorbits.

Per al cas de poliovirus 1 (Sabin) la diferència és màxima i aquest hauria d'ésser un factor a considerar ja que aquest virus sovint es pren com a model en els assaigs virals de desinfectants i antisèptics.

**Taula 3.3.1.3.** *Relació entre la reducció logarítmica experimentada pels diferents virus analitzats quan el test dels desinfectants es realitza amb els virus en suspensió o adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa.*

<b>Virus</b>	<b>Mitjana de la diferència de reducció logarítmica</b>	<b>Desviació estàndard</b>
Poliovirus 1 (Sabin)	2,7	1,1
Coxsackievirus B5	1,3	0,7
Echovirus 6	1,6	0,7
AR51101.1	1,6	1,5

Diferents estudis coincideixen amb els nostres resultats en el fet que els virus s'inactiven més fàcilment en suspensió que sobre suports; Yilmaz i Kaleta (2003) analitzant l'efecte del glutaraldehid i altres desinfectants sobre enterovirus, reovirus i adenovirus, conclouen que cal el doble de temps per aconseguir la mateixa inactivació de virus quan aquests estan en suport a quan estan en suspensió. Treballant amb bacteriòfags, Woolwine i Gerberding (1995) detecten clarament que l'activitat antiviral d'un determinat desinfectant o antisèptic sempre és més alta quan es realitzen test en suspensió a quan es fan sobre un suport de teixit.

Considerant els assaigs amb clor (Taules 3.3.1.1 i 3.3.1.2) els resultats mostren que coxsackievirus B5 i echovirus 6 són més resistents que poliovirus 1 (Sabin) i echovirus-AR51101.1 a la desinfecció per aquest agent halogenat. Així els virus poden agrupar-se com a més resistents (coxsackievirus B5 i echovirus 6) i menys resistents (poliovirus 1 i AR51101.1) al clor, trobant-se diferències estadísticament significatives entre ambdós grups ( $P < 0,05$ ). Diferents estudis coincideixen en el fet de la major resistència al clor de coxsackievirus B5 sobre poliovirus 1 (Engelbrecht et al, 1980; Jensen et al, 1980; Payment et al, 1985).

Payment et al (1985) observen, a més que, els aïllaments de coxsackievirus B5 procedents de mostres ambientals d'aigua tractada amb clor, són més resistents que les soques de laboratori. Aquest fet però, no s'observa per a la resta de virus a estudi (poliovirus 1, 2 i 3 i coxsackievirus B4). En aquest sentit, pel fet que poliovirus 1 és molt susceptible al clor, es considera que si aquests virus escapen a la desinfecció, és

probablement, per que es troben protegits per diferents mecanismes com l'agregació i/o la presència de matèria orgànica i d'aquesta manera són inactivats en menor mesura (Hejkal et al, 1979).

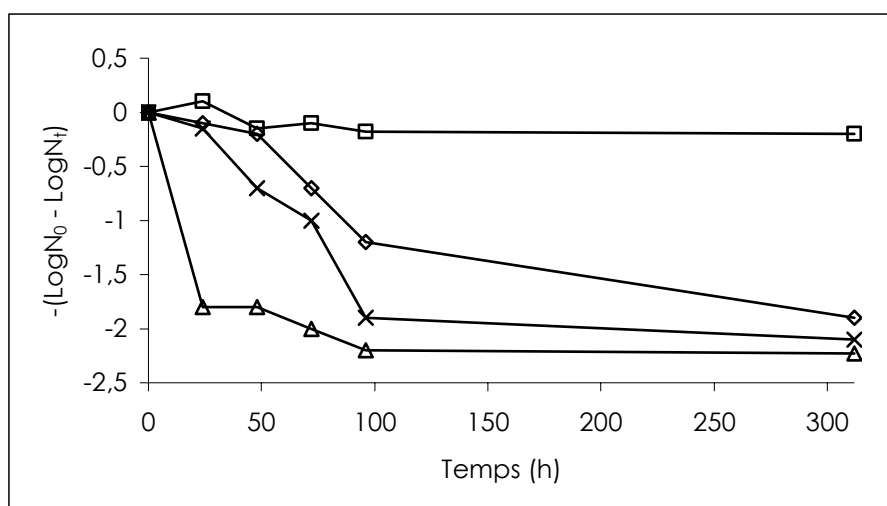
Quan es comparen les inactivacions dels diferents virus pel tractament amb iode (Taules 3.3.1.2 i 3.3.1.3), la situació pateix una certa inversió. Coxsackievirus B5 i echovirus 6 apareixen ara com el grup de virus més sensible al iode quan es troben en suspensió i adsorbits. S'observen però, diferències estadísticament significatives en la inactivació d'aquests dos virus (ANOVA,  $P < 0,05$ ) tant en els assaigs amb virus en suspensió com adsorbits.

Quan a la seva relació amb el glutaraldehid els diferents virus presenten diferències; coxsackievirus B5 apareix poc sensible a concentracions de GTA de 0,05% observant-se amb aquest virus, la menor reducció logarítmica dels quatre (ANOVA,  $P < 0,05$ ), tant si estan en suspensió com si estan adsorbits. Echovirus 6 presenta una major sensibilitat a aquesta mateixa concentració de GTA, semblant a la de poliovirus 1 (Sabin) i echovirus (AR51101.1).

Hi ha estudis que proposen la tècnica de la RT-PCR com a metodologia alternativa a la detecció de virus per cultiu cel·lular, en els assaigs de desinfectants. Un cas és el de la valoració de l'activitat virucida del clor aplicat a concentracions elevades. En aquest cas podria seguir-se l'acció del clor com a virucida ja que malmet l'ARN viral (Ma et al, 1994a). Per a concentracions de clor molt baixes en que aquest efecte no és tant notable i, per al cas d'altres desinfectants que no malmeten l'àcid nucleic, aquesta aproximació no seria vàlida. A més, la pèrdua d'infecciositat dels virus es produeix principalment per canvis de conformació de la càpside viral que indueixen una disminució de la capacitat de fixació dels virus als receptors cel·lulars. Així, mètodes moleculars, els quals detecten el genoma viral significativament durant més temps que els virus infecciosos (Enriquez et al, 1995; Nuanualsuwan i Cliver, 2003) quedarien invalidats.

### 3.3.2 PERSISTÈNCIA A DIFERENTS TEMPERATURES

Els resultats corresponents als experiments de persistència de diferents enterovirus, en suspensió o adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa, conservats a diferents temperatures es mostren en forma de gràfics on es detallen les reduccions logarítmiques mitjanes en els diferents títols virals independentment del mètode de quantificació utilitzat, el mètode Viraden o de monocapa. Els resultats corresponen a la determinació de virus per duplicat per a cada mètode en dues rèpliques experimentals. Tot i que els valors de reducció que s'indiquen a les figures corresponen a les mitjanes, les barres de desviació estàndard no s'han inclòs en el gràfic ja que eren molt petites i quedaven sobre els diferents símbols dificultant l'observació de les dades.



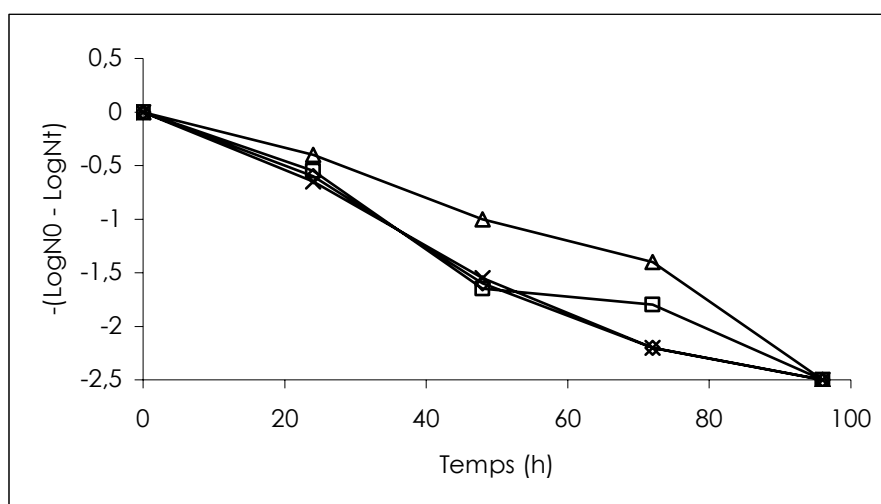
**Figura 3.3.2.1.** Enterovirus mantinguts a temperatura ambient (20-25°C) en suspensió en una solució de MgCl<sub>2</sub> 0,05 M. Poliovirus 1 (Sabin) (◇); Coxsackievirus B5 (□); Echovirus 6 (△) i Echovirus - AR51101.1 (x).

La figura 3.3.2.1 mostra una certa agrupació de virus més i menys resistents a temperatures de 20-25°C. Coxsackievirus B5 es mostra més resistent a la temperatura que poliovirus 1 (Sabin), echovirus 6 i echovirus-AR51101.1. Les diferències entre la reducció de coxsackievirus B5 i la resta d'enterovirus a temperatura ambient són significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ), mentre que les reduccions entre poliovirus 1 (Sabin), echovirus 6 i echovirus-AR51101.1 no són significativament diferents (ANOVA,  $P > 0,05$ ) entre elles.

La figura 3.3.2.2 corresponent a les reduccions dels diferents enterovirus analitzats quan es mantenen adsorbits a temperatura ambient, mostra un tipus de gràfic diferent al que s'obté en les mateixes condicions amb els virus en suspensió. A més de la ràpida



inactivació, tots els virus presenten una reducció similar al llarg de les 96 hores. Aquest fet ens feu pensar en la major importància de l'efecte de la humitat relativa front la temperatura en la supervivència dels virus adsorbits per dos motius principalment. D'una banda, aquest fet no s'observà en la resta de condicions (quan aquests mateixos virus es mantenen a temperatures de 4°C i -10°C) i, d'altra banda, en els experiments a temperatura ambient, les plaques es mantenen obertes a l'atmosfera, els filtres de seguida s'assecaren i per tant, l'efecte de la temperatura no era l'únic a considerar sinó que hi estava actuant l'efecte de la humitat relativa ambiental. D'aquí que posteriorment es valorés com influïa aquesta condició d'humitat relativa sobre la persistència viral.



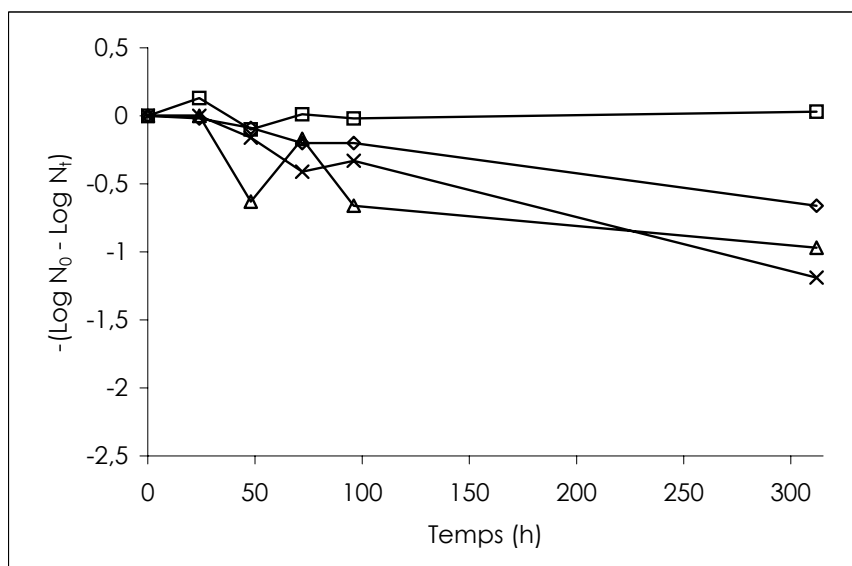
**Figura 3.3.2.2.** Enterovirus mantinguts a temperatura ambient (20-25°C) i humitat relativa ambiental (50%) adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. Poliovirus 1 (Sabin) (◇); Coxsackievirus B5 (□); Echovirus 6 (△) i Echovirus - AR51101.1 (x).

Notis el canvi d'escala a l'eix d'abscisses respecte les taules anterior i posteriors.

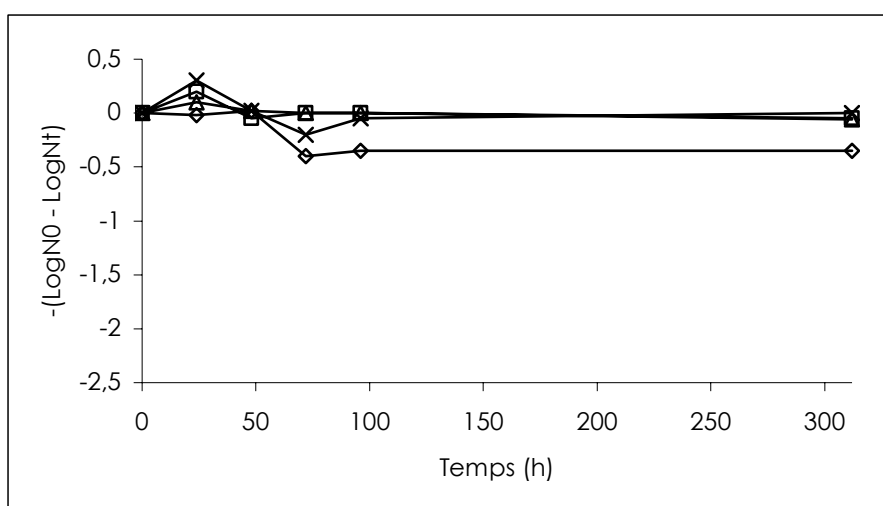
Quan els virus es mantenen refrigerats hi ha major reducció quan es troben en suspensió respecte a quan es troben adsorbits, en general. Cal exceptuar el cas de coxsackievirus B5 que no presenta reducció de títol viral a temperatures de 4°C en cap de les dues condicions (suspensió o adsorbits) dins els temps assajats.

Quan els virus es mantenen en suspensió refrigerats (Figura 3.3.2.3) s'observen diferències significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre coxsackievirus B5 i la resta d'enterovirus assajats. I a l'hora hi ha diferències significatives (ANOVA,  $P < 0,01$ ) entre poliovirus 1 (Sabin) i echovirus 6. Quan es mantenen a aquesta mateixa temperatura de  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa (Figura 3.3.2.4), el

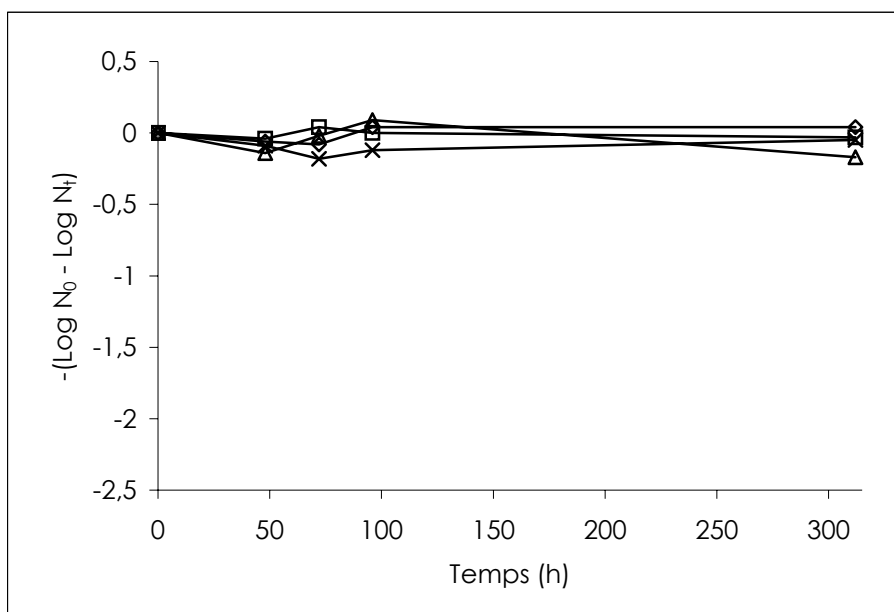
comportament dels quatre enterovirus és lleugerament diferent. Echovirus 6 i AR51101.1 s'acosten a coxsackievirus B5 amb qui no presenten diferències significatives (ANOVA,  $P > 0,05$ ). I cap d'aquests tres enterovirus presenta una reducció de títol superior a 0,05 unitats logarítmiques dins les 312 hores. Mentre que poliovirus 1 (Sabin) presenta reduccions de 0,4 unitats logarítmiques per al mateix període que difereixen estadísticament de les reduccions experimentades per la resta de virus assajats (ANOVA,  $P < 0,05$ ).



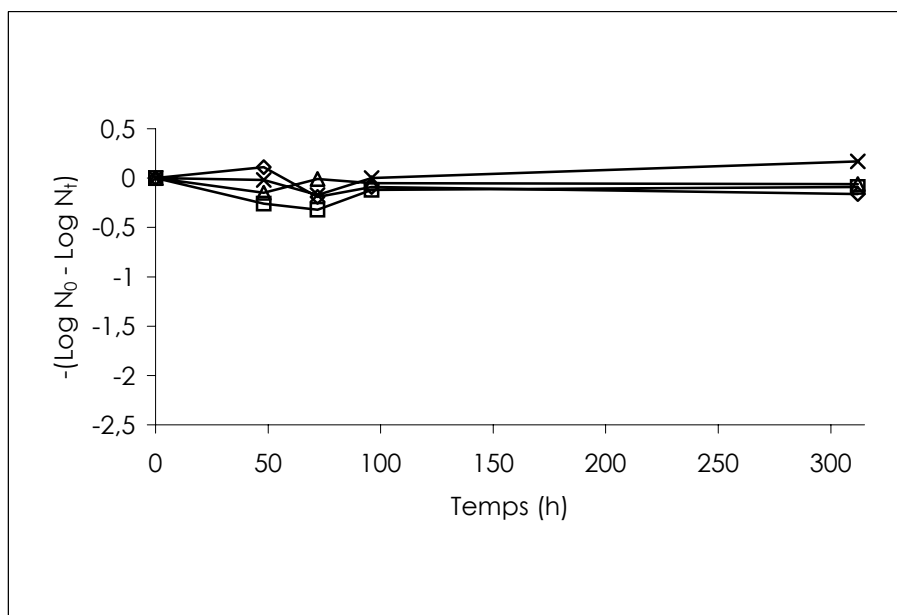
**Figura 3.3.2.3.** Enterovirus mantinguts a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en suspensió en una solució de  $\text{MgCl}_2$  0,05 M. Poliovirus 1 (Sabin) (◇); Coxsackievirus B5 (□); Echovirus 6 (△) i Echovirus - AR51101.1 (x).



**Figura 3.3.2.4.** Enterovirus mantinguts a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. Poliovirus 1 (Sabin) (◇); Coxsackievirus B5 (□); Echovirus 6 (△) i Echovirus - AR51101.1 (x).



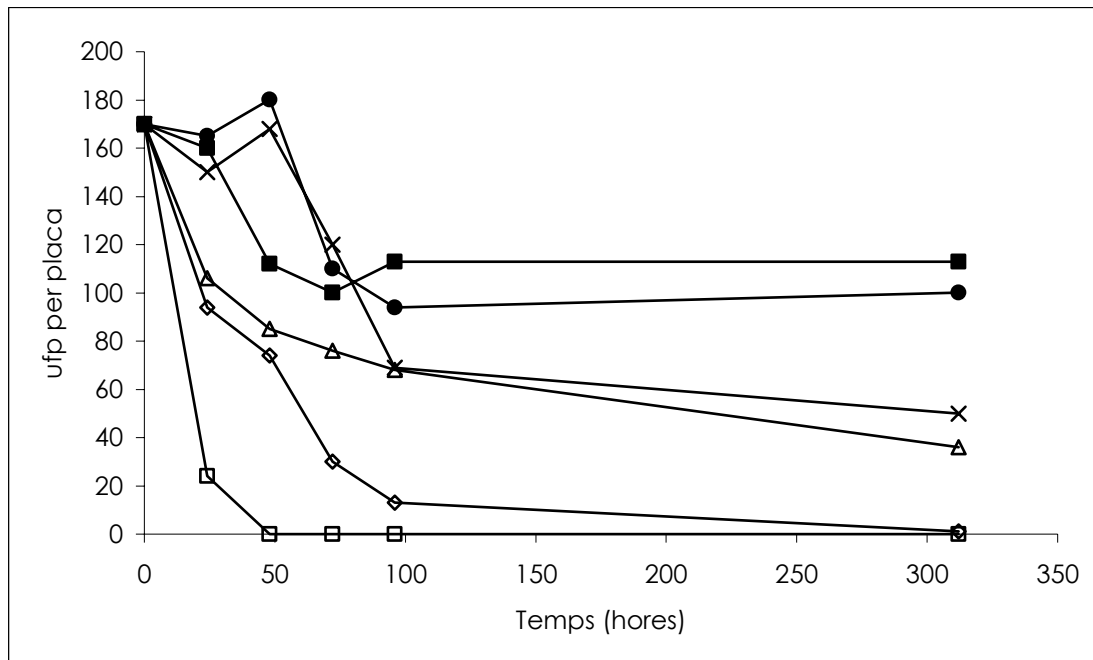
**Figura 3.3.2.5.** Enterovirus mantinguts a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  en suspensió en una solució de  $\text{MgCl}_2$  0,05 M. Poliovirus 1 (Sabin) ( $\diamond$ ); Coxsackievirus B5 ( $\square$ ); Echovirus 6 ( $\triangle$ ) i Echovirus – AR51101.1 (x).



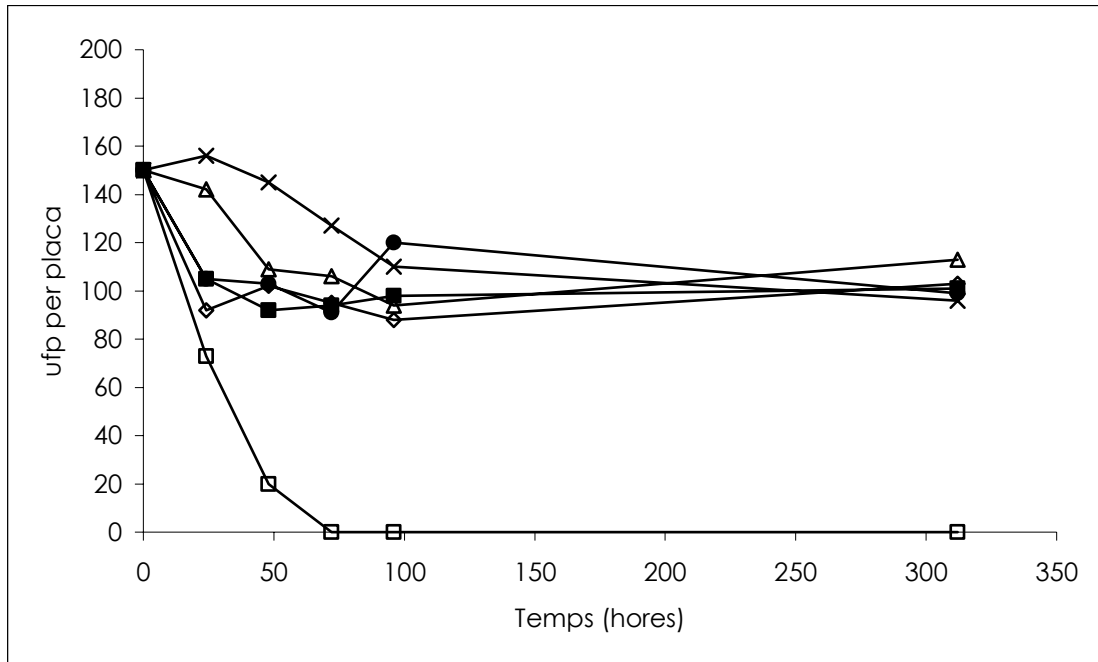
**Figura 3.3.2.6.** Enterovirus mantinguts a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. Poliovirus 1 (Sabin) ( $\diamond$ ); Coxsackievirus B5 ( $\square$ ); Echovirus 6 ( $\triangle$ ) i Echovirus – AR51101.1 (x).

Quan els virus es mantenen a temperatures inferiors a 0°C (Figures 3.3.2.5 i 3.3.2.6) durant 312 hores, no s'observa reducció del títol viral, per a cap dels virus assajats i per a cap de les condicions (en suspensió o adsorbits).

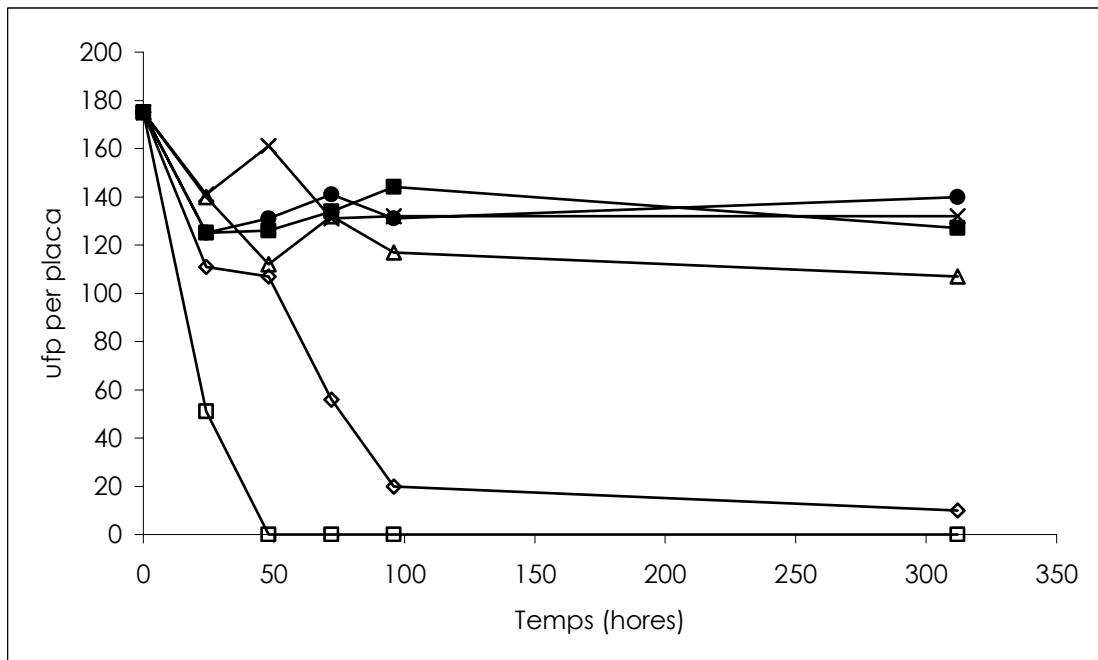
Pel que fa a com afecten les diferents condicions de manteniment a cadascun dels virus (Figures 3.3.2.7, 3.3.2.8, 3.3.2.9 i 3.3.2.10) s'observen gràfiques de reducció de títol viral en funció del temps diferents per a cadascun dels enterovirus assajats. Per a poliovirus 1 (Sabin) (Figura 3.3.2.7) s'observa diferent comportament en funció de la temperatura. Per a coxsackievirus B5 (Figura 3.3.2.8) només es detecten diferències quan es mantenen adsorbits a temperatura ambient respecte la resta de condicions. En aquest cas l'efecte en la supervivència pot ésser degut més a la baixa humitat relativa que a la temperatura. Per a echovirus 6 (Figura 3.3.2.9) només hi ha efecte en la supervivència quan es mantenen a temperatura ambient. Echovirus-AR51101.1 es manté millor congelat o adsorbit a 4°C que a aquesta mateixa temperatura en suspensió o a temperatura ambient (Figura 3.3.2.10). Tot i tractar-se de virus que pertanyen a un mateix gènere, cadascun d'ells presenta un comportament diferent per a les condicions assajades. Coxsackievirus B5 és un dels que presenten menor pèrdua de títol viral (fins i tot a temperatura ambient).



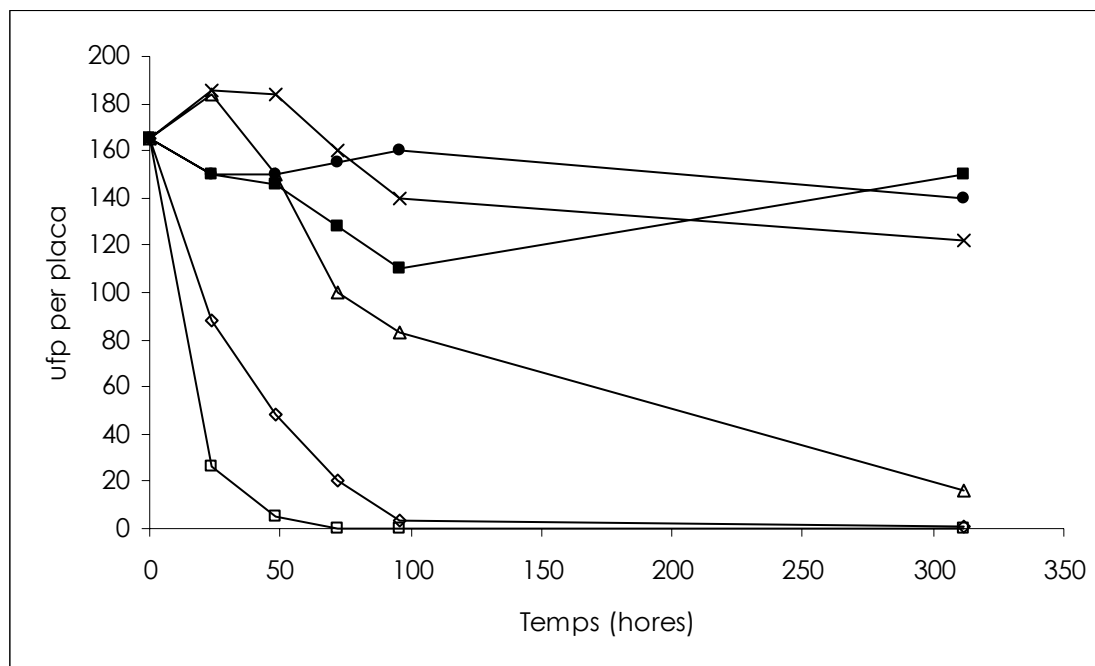
**Figura 3.3.2.7.** Poliovirus 1 (Sabin) conservats en diferents condicions; a temperatura ambient en suspensió (◇) i adsorbits (□), a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en suspensió (△) i adsorbits (x) i a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  en suspensió (■) i adsorbits (●).



**Figura 3.3.2.8.** Coxsackievirus B5 conservats en diferents condicions; a temperatura ambient en suspensió (◇) i adsorbts (□), a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en suspensió (△) i adsorbts (x) i a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  en suspensió (■) i adsorbts (●).



**Figura 3.3.2.9.** Echovirus 6 conservats en diferents condicions; a temperatura ambient en suspensió (◇) i adsorbts (□), a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en suspensió (△) i adsorbts (x) i a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  en suspensió (■) i adsorbts (●).



**Figura 3.3.2.10.** Echovirus AR51101.1 (Patró 1 RFLP) conservats en diferents condicions; a temperatura ambient en suspensió (◇) i adsorbits (□), a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  en suspensió (△) i adsorbits (x) i a  $(-10 \pm 5)^\circ\text{C}$  en suspensió (■) i adsorbits (●).

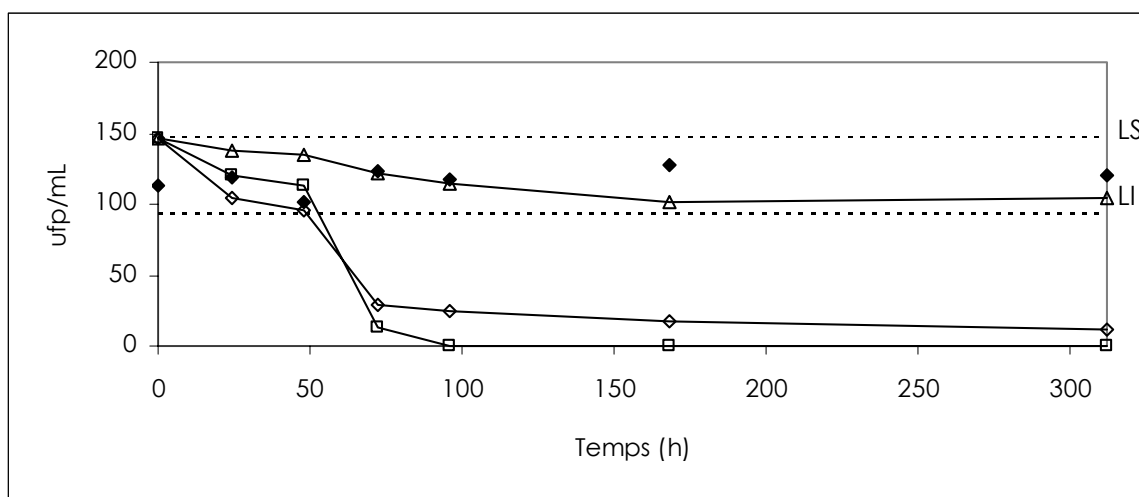
### 3.3.3 PERSISTÈNCIA A DIFERENTS HUMITATS RELATIVES

Dels resultats de l'apartat anterior s'intueix un efecte significatiu de la humitat relativa sobre la supervivència a temperatura ambient dels virus adsorbits. La humitat relativa del laboratori, corresponent al període en que es van realitzar els assaigs, es situà al voltant del 50%. Quan s'indica que la humitat relativa es mantingué elevada (emprant les estratègies descrites a l'apartat de Material i Mètodes del present capítol) es fa referència al manteniment de valors d'humitat del 85-90% o superiors.

Així doncs, es realitzaren els experiments per a la valoració de l'efecte de la humitat relativa sobre dos dels enterovirus a estudi, poliovirus 1 (Sabin) i echovirus 6 (aïllat de l'ambient). Els resultats corresponents als diferents assaigs es presenten a continuació. Els assaigs es realitzaren amb els virus adsorbits sobre suports de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa que es conservaren a temperatura ambient ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ) o refrigerats ( $4^\circ\text{C}$ ).

Els resultats es presenten en forma de gràfics on es detallen les enumeracions de virus al llarg del temps. El nombre de virus a temps zero fou el títol viral control emprat per a les tres condicions experimentals (virus en suspensió, virus adsorbits amb humitat

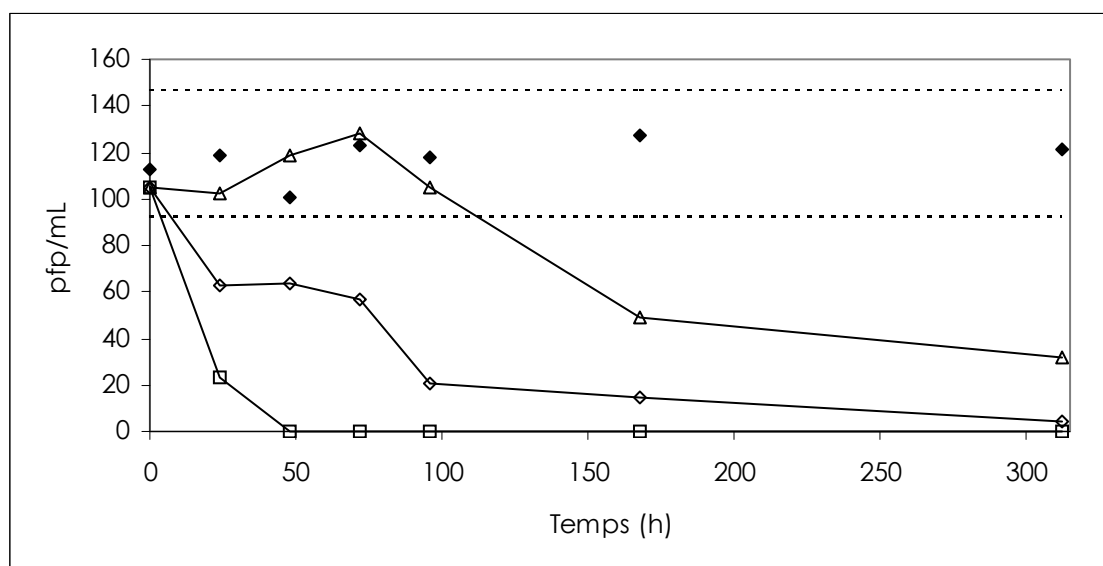
relativa ambiental i virus adsorbits amb humitat relativa propera al punt de saturació). Les determinacions del nombre d'ufp per mL (equivalents al nombre d'ufp per placa de cultiu) es realitzaren per duplicat, per a cadascuna de les tres rèpliques experimentals de cadascuna de les condicions assajades. Els gràfics, com en el cas anterior, mostren les mitjanes però s'omet la representació de les barres d'error, ja que de nou, les diferències foren molt petites i dificultaven la visualització de les dades. Als gràfics s'inclouen alguns dels recomptes dels materials de referència per a poliovirus 1 (Sabin) i echovirus 6. Amb el total dels recomptes de cadascun dels materials de referència es construïren les cartes de control a partir de les quals, es calcularen els límits superior i inferior d'acció. Per a cadascuna de les situacions s'assenyalen aquests límits superior (LS) i inferior (LI) d'acció dins els gràfics. Aquesta fou l'eina utilitzada per poder determinar a partir de quin punt es podia considerar que la humitat relativa afectava la supervivència dels diferents virus. Quan els recomptes dels diferents virus es troben per sota del límit inferior d'acció, es considera que hi ha hagut una modificació significativa dels nombres de virus i per tant, un efecte significatiu de la humitat relativa sobre la supervivència d'aquests.



**Figura 3.3.3.1.** Efecte de la humitat relativa sobre poliovirus 1 (Sabin) quan es mantenen a 4°C en suspensió aquosa (◇), adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa sotmesos a la humitat relativa ambiental (□), adsorbits sobre filtres amb humitat relativa propera a la saturació (△). Es representen alguns dels valors emprats per al càlcul dels límits superiors i inferiors d'acció (...) de la carta de control (◆).

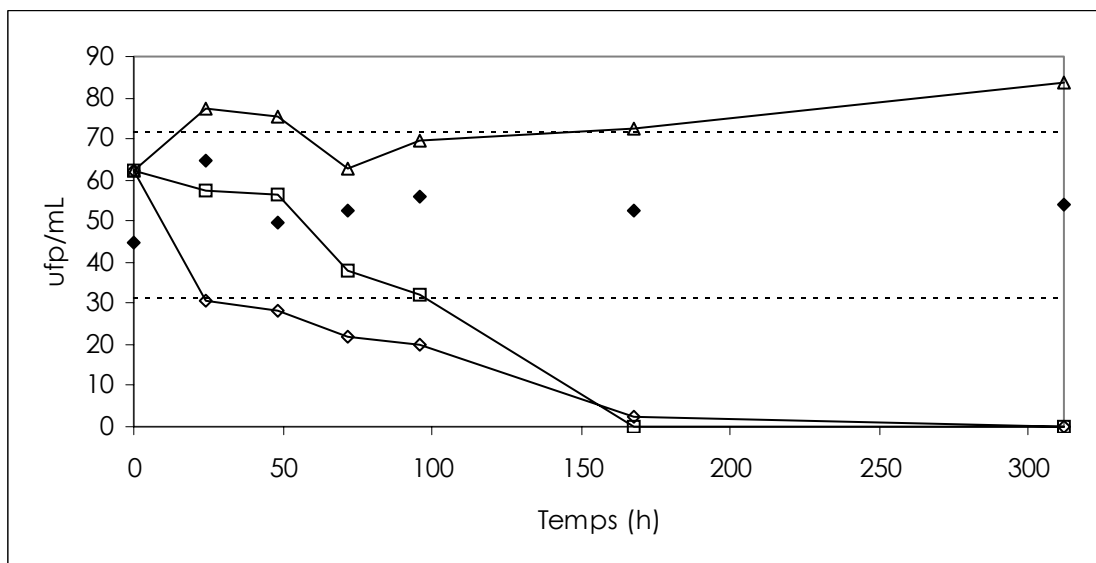
Les figures 3.3.3.1 a 3.3.3.4 mostren els resultats dels experiments de valoració de l'efecte de la humitat relativa sobre poliovirus 1 (Sabin) i sobre echovirus 6. Quan poliovirus 1 (Sabin) es manté a 4°C adsorbit a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa, hi ha un efecte de la humitat relativa a partir de les 48 hores. Els valors que es mantenen dins els límits d'acció de la carta de control durant més temps (300

hores), són els que s'obtenen quan es mantenen poliovirus 1 (Sabin) adsorbits sobre filtres amb humitat relativa elevada, superior al 90% (Figura 3.3.3.1). Quan es mantenen poliovirus 1 (Sabin) a 4°C, en suspensió o adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa sotmesos a la humitat relativa ambiental, els recomptes de virus es situen dins la carta de control fins a les 48 hores. Mentre que en les mateixes condicions a temperatura ambient (20-25°C) ja s'obtenen recomptes per sota del límit inferior d'acció a les 24 hores (Figura 3.3.3.2). A temperatura ambient, el període en que poliovirus 1 (Sabin) persisteix adsorbit amb humitat propera a la saturació també es redueix respecte a la situació en que estan refrigerats. Així, els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) adsorbits amb humitat relativa elevada a temperatura ambient es situen fora del límit inferior de la carta de control a partir de les 96 hores aproximadament (Figura 3.3.3.2). Aquests recomptes es mantenen dins els límits de la carta de control fins les 300 hores, quan els filtres amb poliovirus 1 (Sabin) adsorbits es mantenen a 4°C.

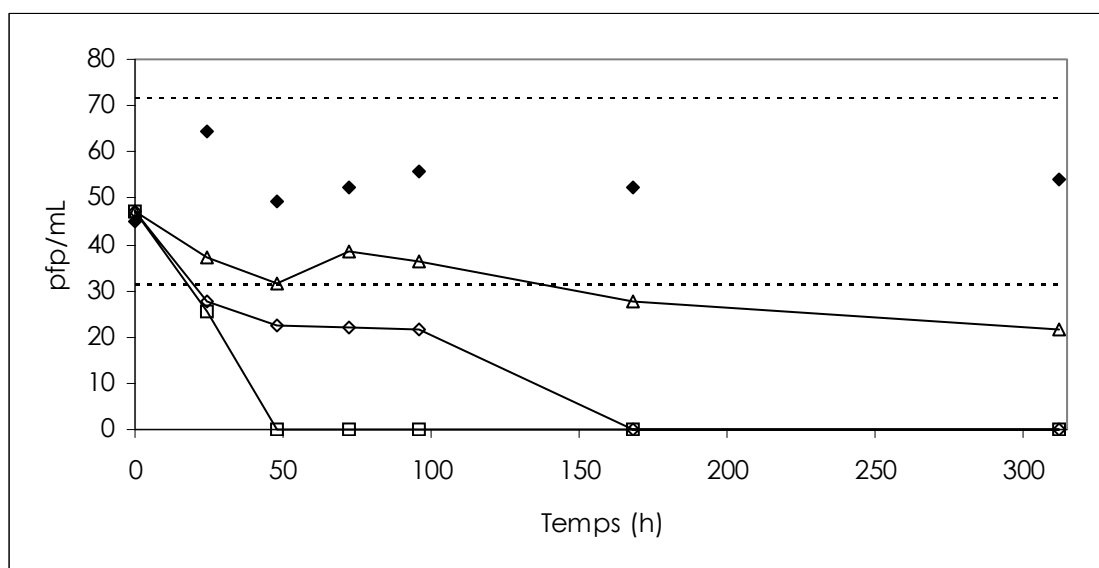


**Figura 3.3.3.2.** Efecte de la humitat relativa sobre poliovirus 1 (Sabin) quan es manté a temperatura ambient en suspensió aquosa (◇), adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa sotmesos a la humitat relativa ambiental (□), adsorbits sobre filtres amb humitat relativa propera a la saturació (△). Es representen alguns dels valors emprats per al càlcul dels límits superiors i inferiors d'acció (...) de la carta de control (◆).





**Figura 3.3.3.3.** Efecte de la humitat relativa sobre echovirus 6 (aïllament ambiental) quan es manté a 4°C en suspensió aquosa (◇), adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa sotmesos a la humitat relativa ambiental (□), adsorbits sobre filtres amb humitat relativa propera a la saturació (△). Es representen alguns dels valors emprats per al càlcul dels límits superiors i inferiors d'acció (...) de la carta de control (◆).



**Figura 3.3.3.4.** Efecte de la humitat relativa sobre echovirus 6 quan es manté a temperatura ambient en suspensió aquosa (◇), adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa sotmesos a la humitat relativa ambiental (□), adsorbits sobre filtres amb humitat relativa propera a la saturació (△). Es representen alguns dels valors emprats per al càlcul dels límits superiors i inferiors d'acció (...) de la carta de control (◆).

Per a echovirus 6 els resultats són pràcticament equivalents als comentats per poliovirus 1 (Sabin). A temperatura ambient (Figura 3.3.3.4), els valors d'ufp d'echovirus 6 només es mantenen dins els límits de la carta control més enllà de les 24 hores per a la condició en que els virus es troben adsorbits amb humitat relativa alta, superior al 90%.

Així, els dos virus assajats, poliovirus 1 (Sabin) i echovirus 6, presenten les mateixes tendències quan a la persistència en diferents condicions de temperatura i humitat. S'observa una major persistència o conservació del virus, independentment de la temperatura, quan aquests es mantenen adsorbits als filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa i se'ls procura una humitat relativa alta (superior al 90%).

Així doncs, es confirma, fet que ja s'apuntava en la introducció del capítol, que per als dos enterovirus assajats, el percentatge d'humitat relativa o la dessecació, és el factor potser amb més importància per a la supervivència d'aquests quan es troben sobre superfícies (fomites), el factor que presentaria més efecte en aquest aspecte, fins i tot més que la temperatura. Aquests resultats coincideixen amb els que obtenen diferents autors treballant amb enterovirus 70 (Sattar et al, 1988), rhinovirus 14 (Sattar et al, 1987) i rotavirus (Ijaz et al, 1985b; Abad et al, 1994).

A partir de les experiències realitzades i dels resultats obtinguts, es confirma que els enterovirus persisteixen durant períodes més llargs de temps si es mantenen a temperatures baixes (4°C) i en condicions d'humitat relativa alta (>85%). Aquests resultats s'obtenen amb dos tipus diferents d'enterovirus, essent un d'ells una soca de laboratori i l'altre, un aïllament ambiental. Per aquest fet, potser les conclusions podrien fer-se extensives a la resta d'enterovirus. Així, les baixes temperatures per si soles, si no es mantenen condicions d'humitat elevada, no permeten un manteniment idoni dels enterovirus adsorbits als suports d'èsters de cel·lulosa al llarg del temps.

Un segon factor a considerar observant els resultats obtinguts, pel que fa a la persistència dels enterovirus a l'ambient, és que aquests virus, independentment de la temperatura, sobreviuen millor adsorbits sobre un suport que en suspensió quan se'ls procura humitat relativa alta. Aquest fet tindria significació en la transmissió d'aquests tipus de virus per contacte amb superfícies contaminades (fomites). Aquest fet de la major persistència a factors externs quan els virus es troben adsorbits a quan es troben en suspensió s'observa també en l'apartat de resultats de l'acció de desinfectants i antisèptics sobre diferents enterovirus.

### **3.3.4 VALORACIÓ DEL POSSIBLE EFECTE DE L'ADHERÈNCIA DELS VIRUS AMB PRESÈNCIA D'IONS DIVALENTS A LES PARETS DE MICROTUBS**

La conservació dels virus suspesos en una solució aquosa al llarg del temps, a temperatura ambient o refrigerats, no mostrà diferències per a les tres condicions assajades. La conservació per suspensió en PBS o en MgCl<sub>2</sub> 0,05M aplicant el tractament amb SDS 10 mM, no difereix de la conservació dels virus suspesos en MgCl<sub>2</sub> 0,05M sense aplicar tractament previ a l'enumeració viral.

D'aquests resultats es dedueix doncs que, en els experiments d'inactivació dels virus quan es mantenen en suspensió descrits en aquesta memòria, no hi ha efecte d'adsorció dels virus a les parets dels microtubs, fet que calia considerar important per als experiments amb durades llargues en el temps. Així doncs, per a les concentracions de virus utilitzades en els estudis de persistència a diferents temperatures i en els estudis de valoració de l'efecte de la humitat relativa, no cal considerar un efecte d'adherència dels virus a les parets dels microtubs emprats que reduís el nombre de virus presents en la suspensió en el moment de realitzar l'enumeració viral passats els períodes d'incubació determinats.

De totes les experiències recollides en aquest capítol de la memòria de tesi, es conclou que el mètode Viraden ofereix bones perspectives per a la seva aplicació en l'estudi de l'efecte de diferents condicions sobre els virus. Pot aplicar-se per avaluar l'activitat virucida de desinfectants i antisèptics i per estudis de persistència a diferents temperatures i diferents condicions d'humitat relativa. A més, el mètode Viraden ofereix una aplicació útil per a l'avaluació de les diferents condicions sobre els virus en suspensió i/o adsorbits als filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa.

Emprant com a suports filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa i el mètode Viraden com a mètode de quantificació, s'assoleix complir amb algun dels requisits dels assaigs d'activitat virucida de desinfectants sobre superfícies. La superfície dels filtres presenta irregularitats (Figura 1.1.1.1, Capítol 1). La unió dels virus és difícilment reversible si es mantenen les condicions en les que s'ha produït l'adsorció, fet que garanteix la no pèrdua dels virus i que no dificulta ja que no cal procediment d'elució per recuperar els virus a partir del filtre. Els filtres no són reutilitzables però el preu econòmic (1,02 Euros per filtre) fa que pugui utilitzar-se una membrana diferent per cada test sense encarrir substancialment l'anàlisi. Pel fet que els virus poden concentrar-se sobre aquests suports emprant la tècnica de

filtració en membrana, s'aconsegueix que tots els virus presents en una suspensió quedin dipositats sobre el suport i per tant el volum de mostra no és un factor que condicioni el procés. Quan s'aplica el mètode Viraden no cal un procediment d'elució previ a l'enumeració. D'aquesta manera, el recompte final correspon a l'enumeració de tots els virus intactes o parcialment inactivats, presents sobre la membrana. Hi ha un requeriment mínim, el volum de suspensió desinfectant necessari per tal que la totalitat de la superfície del filtre de membrana quedi coberta és de 2 mL.

Quan s'utilitzen filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa com a suports per als assaigs de desinfectants, cal considerar diferents factors;

- i. la naturalesa del producte químic a analitzar ja que determinats productes o concentracions de productes poden malmetre el suport en el moment de la seva aplicació,
- ii. la capacitat del desinfectant d'adherència al suport que pogués condicionar una resposta citotòxica del cultiu cel·lular emprat en l'enumeració viral i,
- iii. el manteniment dels virus adsorbits sobre el suport durant el procés de valoració de l'activitat virucida.

Per al darrer dels punts cal fer la consideració que els virus s'adsorbeixen

al filtre de membrana d'èsters de cel·lulosa per interacció de càrregues electrostàtiques. Si el pH de la solució es manté per sota del punt isoelèctric del virus, aquests adquireixen càrrega neta positiva i per tant, haurien de mantenir-se adsorbits a les membranes d'èsters de cel·lulosa (electro-negatives). En aquest punt, cal doncs, el control del pH de la solució desinfectant. Si l'activitat d'aquesta ha de dur-se a pH alcalí, els virus mantindrien càrrega neta negativa fent imprescindible la presència de cations divalents ( $Mg^{2+}$ ) per tal de mantenir l'adsorció dels virus als filtres de membrana i pogués aplicar-se el mètode Viraden. Així, el mètode pot aplicar-se amb diferents condicions de pH que cal considerar, a pH per sota del punt isoelèctric els virus es mantindrien units als filtres de membrana electronegatius per interacció de càrregues electrostàtiques i a pH per damunt del punt isoelèctric, els virus requeririen la presència de cations per tal que la unió als filtres de membrana electronegatius pogués mantenir-se.

L'aplicació del mètode Viraden té avantatges addicionals ja comentades

anteriorment. D'una banda permet treballar amb concentracions baixes de virus (simulant més acuradament les condicions reals de camp) i de l'altra, permet concentrar volums de mostra grans. Aquesta capacitat és útil quan es neutralitza l'activitat dels desinfectants per dilució.

Un altre avantatge és que en l'aplicació del mètode Viraden no cal incloure l'etapa d'assecat per tal que els virus s'adhereixin al suport, etapa necessària quan es treballa amb qualsevol altre tipus de suport sòlid per als assaigs amb virus adsorbits. D'aquesta manera no hi ha un efecte de dessecació sobre els virus previ a l'acció dels productes virucides a analitzar. Aquest efecte de la manca d'humitat s'ha descrit i s'ha comprovat en el present estudi, molt important per a la supervivència dels virus.

A més, no és necessari el procediment d'elució de virus del suport. El procediment d'elució té una eficiència determinada que sumaria, sobreestimaria, l'activitat virucida del producte assajat.

## 3.4 CONCLUSIONS

---

---

El mètode Viraden permet d'una manera fàcil i ràpida valorar l'efecte de diferents desinfectants i antisèptics sobre la infecciositat viral amb els virus adsorbits sobre el suport de membrana d'èsters de cel·lulosa. A més permet la comparació amb la pèrdua d'infecciositat en les mateixes condicions, quan els virus es troben en suspensió en una solució aquosa.

La utilització del mètode Viraden permet valorar la persistència de virus a diferents temperatures quan es troben adsorbits a una superfície.

El mètode Viraden permet valorar fàcilment l'efecte de la humitat relativa sobre la supervivència dels virus adsorbits a una superfície.

Els enterovirus analitzats presenten una pèrdua d'infecciositat major per efecte de desinfectants i antisèptics, i per efecte de la temperatura quan es troben en suspensió, si es comparen els resultats amb els que s'obtenen quan els virus es troben adsorbits a suports inerts.

La humitat relativa es presenta com un dels factors més importants, més que la temperatura, per a la supervivència dels enterovirus adsorbits a suports sòlids (fomites).

Els diferents enterovirus assajats, tot i pertànyer a un mateix gènere, presenten molta diversitat entre ells pel que fa als efectes de les diferents condicions inactivants als que han estat sotmesos.

---

## ANNEX CAPÍTOL 3

---

### CONSERVACIÓ A LLARG TERMINI D'ENTEROVIRUS

#### ADSORBITS A ( $-70 \pm 10$ )°C

##### A.3.1 Introducció

Es provà un sistema de conservació de virus a llarg termini, trobant-se aquests adsorbits a un suport de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa per tal de saber si un cop concentrats els virus sobre el suport emprat en l'aplicació del mètode Viraden podien conservar-se les mostres durant períodes més o menys llargs de temps de manera que es pogués afegir una avantatge addicional al mètode. Així doncs es procedí a realitzar una valoració de la conservació a llarg termini per congelació a ( $-70 \pm 10$ )°C amb virus adsorbits a filtres d'èsters de cel·lulosa. El sistema de conservació de virus a llarg termini recomanat és el de congelació a  $-70$ °C en suspensió (APHA, 1998). Aquest sistema és vàlid quan es tracta de la conservació de suspensions de cultius purs de soques víriques de referència, o per a la conservació de volums petits de mostra directa i de concentrats virals quan no es pot procedir immediatament amb la titulació però, si el volum de mostra és gran (d'un a

diversos litres) i es vol emprar com a mètode de concentració i enumeració de virus el mètode Viraden, calia comprovar si els virus un cop concentrats per filtració podien mantenir-se en aquestes condicions fins al moment de la titulació.

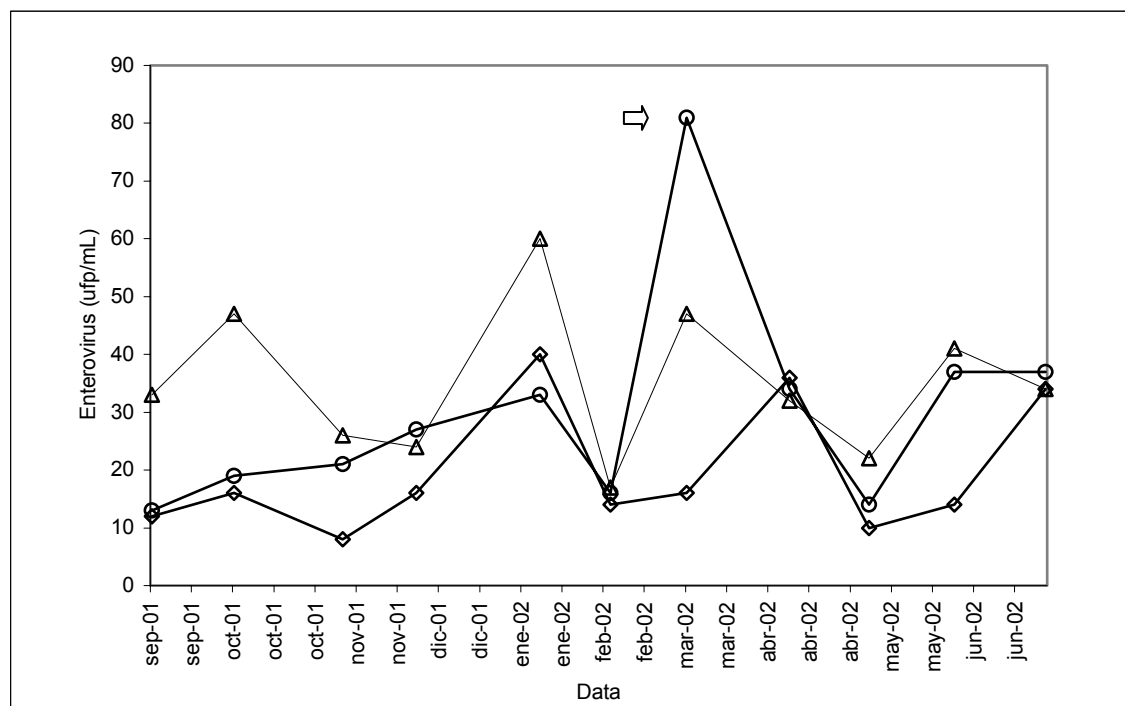
##### A.3.2 Material i Mètodes

Es preparà un material de referència per als tres virus de laboratori assajats; poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5. Es procedí a l'adsorció d'aquests damunt filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa per filtració i es dipositaren els filtres dins plaques de Petri de 50 mm de diàmetre estèrils. Es segellaren amb "parafilm" i es mantingueren a ( $-70 \pm 10$ ) °C durant un període de 11 mesos. Es realitzaren determinacions d'ufp per filtre mensualment emprant el mètode Viraden. En el moment de la titulació cal deixar descongelar els filtres de membrana durant un mínim de 10 minuts a temperatura ambient.

### A.3.3 Resultats

La figura A.3.3.1 mostra els recomptes corresponents a diferents enterovirus conservats durant 11 mesos a temperatures de  $-70^{\circ}\text{C}$  adsorbits sobre suports de filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa.

L'avantatge d'aquest sistema de conservació és que permet la conservació en un espai molt reduït de les mostres ja concentrades a punt per a la titulació pel mètode Viraden. D'aquesta manera no han de conservar-se volums grans de mostres quan aquestes no puguin processar-se immediatament per a l'enumeració de virus pel mètode Viraden.



**Figura A.3.3.1.** Recompte sobre cèl·lules BGM d'enterovirus conservats a  $-70^{\circ}\text{C}$  adsorbits a filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa durant un any. Poliovirus 1 (Sabin) (◇), coxsackievirus B4 (△) i coxsackievirus B5 (○). La fletxa assenyala un punt que sobrepassa el límit superior d'acció de la carta de control. Els valors corresponen a la mitjana de la titulació per duplicat de cadascun dels virus.



Abans



Ara



CAPÍTOL 4. EL MÈTODE DE DOBLE  
CAPA. UN NOU MÈTODE PER  
QUANTIFICAR VIRUS CULTIVABLES

## 4.1 INTRODUCCIÓ

### 4.1.1 MÈTODES DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE VIRUS CULTIVABLES

Pel fet que els virus són paràsits intracel·lulars obligats, aquests només multipliquen en cèl·lules hostes vives. Aquesta capacitat de multiplicar i destruir les cèl·lules és la base per als assaigs d'infecciositat. Abans dels anys 50, quan els cultius cel·lulars prengueren importància en virologia, l'hoste estàndard per al cultiu de molts virus eren els ous embrionats de gallina i els animals de laboratori (generalment ratolins). Gairebé tots els virus que es coneixien en aquell moment podien créixer sobre ous embrionats en les cèl·lules d'una o altra membrana embrionària, anomenades amnion, alantoide, corion o sac vitel·lí (Fenner et al, 1974). La tècnica del cultiu cel·lular fou implantada per Goodpasture el 1932 i extensament desenvolupada per Burnet els anys següents.

Tota la recerca científica depèn de la disponibilitat de mètodes òptims de mesura i en el cas dels virus una de les propietats que cal mesurar és la capacitat d'infecció. El contingut de virus infecciosos en una suspensió donada pot "titular-se" infectant cultius cel·lulars, ous embrionats o animals de laboratori amb dilucions de les suspensions virals i seguir l'evolució d'aquests al llarg dels dies pel que fa a l'evidència de multiplicació viral.

Els dos sistemes majoritaris de cèl·lules hostes per als virus humans entèrics són els animals (principalment ratolins) i els cultius cel·lulars establerts a partir de cèl·lules originàries de primats i humans. Els virus cultivables en una línia cel·lular determinada, es poden detectar i quantificar emprant diferents mètodes. Es poden diferenciar dos tipus d'assaigs d'infecciositat: els quantitius i els quantals. D'entre tots, els que destaquen, per la major implantació són, dins els mètodes quantitius, l'assaig en monocapa i l'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió i dins els mètodes quantals, el MPNCPU (*Most Probable Number of Cytopathogenic Units*) o el càlcul de TCID<sub>50</sub> (*50% Tissue Culture Infectious Dose*) (APHA, 1998).

La selecció del mètode d'assaig utilitzant cultiu cel·lular depèn de les característiques de la mostra i del fet d'haver d'obtenir la màxima sensibilitat o la màxima precisió en l'estimació de la concentració de virus a la mostra. La tècnica de clapes generalment és més precisa i acurada que l'assaig quantal mentre que aquest és més sensible que el mètode de monocapa però menys que el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió (Morris i Waite, 1980).

Pel fet que les clapes són àrees d'infecció discretes i s'assumeix que cadascuna s'origina a partir de la infecció d'una partícula vírica, és relativament senzill recuperar virus d'aquestes clapes individuals i procedir amb la reinfecció d'un cultiu cel·lular per tal d'obtenir una suspensió viral pura per procedir a la seva identificació. Val a dir però que poden formar-se clapes a partir de més d'un virus que es trobin adsorbits entre ells o adsorbits a partícules, de manera que es produeixin infeccions múltiples. A més, de vegades hi ha una proporció de clapes anomenades "falsos-positius" que no es confirmen com a virus quan el material procedent d'aquestes zones es reinfecta de nou en cultius cel·lulars (Kedmi i Fattal, 1981). Encara no es sap si aquest fenomen es deu a que aquestes àrees es desenvolupen per la presència de substàncies citotòxiques a la mostra, o es deu a la incapacitat de transferir satisfactòriament els virus al nou cultiu durant el procediment de reinfecció. Hi ha diferències entre la taxa de falsos-positius depenent del mètode utilitzat per analitzar les mostres. Les clapes que s'obtenen a partir de cultius purs de laboratori de virus mostren una major taxa de confirmació que els virus que provenen de clapes aïllades a partir de mostres d'aigua residual, comptant la influència del tipus de virus present a la mostra (Dahling et al, 1989a). Quan es realitza la confirmació directament s'obtenen millors taxes de recuperació (90% o superiors) que quan l'aïllament es congela a  $-70^{\circ}\text{C}$  i es realitza la infecció a posteriori. El terme "clapes falses positives" s'ha aplicat al tipus particular de clapes que no es confirmen, existint un nombre substancial de clapes no confirmades causades per les tècniques de transferència de clapes (Dahling et al, 1989).

Una de les limitacions dels mètodes quantitius és que no tots els virus produeixen clapes eficientment. I, d'altra banda, la citotoxicitat produïda pels components de l'aigua en les mostres que provenen de concentrats virals o mostres directes és difícilment controlable en els sistemes de producció de clapes, pel fet que el medi *overlay* que conté agar és difícil de retirar i substituir com es faria en un anàlisi quantal amb medi líquid com a medi de post-infecció.

Una limitació potencial dels mètodes quantals és la possibilitat que dos o més virus diferents siguin inoculats al mateix pou i això produeixi un sol resultat positiu. Aquest fet no resulta només en una potencial subestimació del valor de la concentració viral sinó que a més caldria la separació dels diferents virus individuals per infeccions successives en cultius cel·lulars. La proporció d'aquestes infeccions virals mixtes disminueix quan el cultiu cel·lular s'inocula amb porcions petites de la mostra fent diverses rèpliques (Schmidt et al, 1978; Irving i Smith, 1981). La citotoxicitat quan s'utilitzen mètodes quantals pot prevenir-se canviant el medi de cultiu post-infecció de manteniment abans que les cèl·lules presentin efecte citopàtic i morin.

#### 4.1.1.1 Mètodes quantitativs. Unitats formadores de clapes (ufp)

L'assaig de quantificació de partícules o unitats formadores de clapes és un mètode que quantifica el nombre d'unitats infeccioses en una suspensió viral. Aquest mètode s'utilitza des de la primera descripció el 1952 per Dulbecco. Es basa en que quan una partícula viral inicia una infecció en una gespa formada per cèl·lules hoste, es produeix una zona de lisi o citopaticitat generant-se una àrea més clara en la gespa de creixement cel·lular. Aquesta zona s'anomena clapa (*plaque*) i s'assumeix que cada clapa s'origina a partir de la replicació d'un virió. Les clapes poden formar-se tant en monocapes com en cèl·lules en suspensió amb medis que continguin agar. Després de diversos cicles de replicació les clapes són suficientment grans per a ésser observades a simple vista. La manera de poder-les observar passa per augmentar el contrast entre les zones de lisi formada per cèl·lules mortes i la monocapa cel·lular intacte mitjançant tinció diferencial.

Les unitats emprades per al recompte viral s'anomenen "unitat formadora de clapa" i s'abreuen com a ufp (acrònim adaptat de l'anglès *plaque forming units*, pfu).

Pel fet que cada clapa (o la gran majoria) s'origina a partir de la infecció d'un sol virió, el recompte d'aquestes permet un càlcul precís del títol viral. Les clapes representen un clon i és per això que poden identificar-se directament emprant diferents mètodes (hibridació, immunodetecció) com en el cas dels bacteris i els bacteriòfags (Sambrook et al, 1989) o aïllar-se i identificar-se posteriorment.

Els mètodes de formació de clapes s'han desenvolupat per a la detecció de diversos virus entèrics entre els que s'inclouen enterovirus (Hsiung i Melnick, 1958; Guttman-Bass, 1982), soques citopàtiques d'HAV (Cromeans et al, 1987), adenovirus 40 (Hashimoto et al, 1991), adenovirus 41 (Grabow et al, 1992) i rotavirus (Smith i Gerba, 1982).

##### 4.1.1.1.1 Mètode de monocapa

Dulbecco el 1952 introduí una modificació de l'assaig de formació de clapes de bacteriòfags al món de la virologia animal i aquest ha estat un mètode àmpliament utilitzat per a la quantificació de virus animals. Monocapes cel·lulars confluents en plaques o flascons de cultiu cel·lular s'inoculen amb la mostra i s'incuben durant d'una a dues hores a 37°C. S'elimina l'excés de mostra i s'afegeix el medi *overlay* que conté 0,75% d'agar o algun altre element solidificant com la metil cel·lulosa. La mida de l'inòcul és crucial i depèn del tipus de mostra i de la superfície de l'àrea de cultiu

cel·lular. Per plaques de 90 mm de diàmetre es recomana 1 mL d'inòcul (Payment i Trudel, 1985). S'examinen les plaques per a la formació de clapes de lisi. Les clapes (efecte citopàtic) son fàcils de localitzar/detectar ja que l'agar manté la multiplicació dels virus al lloc d'inici de la infecció de manera que la clapa estigui formada per la progènie d'una sola partícula vírica infecciosa. Els resultats més òptims quan al nombre de clapes, en el cas de poliovirus s'obtenen quan els cultius es mantenen durant un període de 2 hores d'adsorció a la monocapa cel·lular i en agitació suau (1 oscil·lació per minut). La presència de proteïnes en el medi d'inòcul del virus fa que es detectin reduccions significatives en el títol viral i en la mida de les clapes (Richards i Weinheimer, 1985). El procediment detallat tal com es va aplicar en la realització d'aquest estudi es descriu a l'Annex I, "Detecció de virus per cultiu cel·lular: Inoculació de mostres en medi sòlid. Mètode de monocapa".

A Europa i als Estats Units, el mètode emprat per a la determinació de virus cultivables és el de monocapa cel·lular. A l'hora, és el mètode recomanat per la OMS com a mètode estàndard per a l'enumeració d'enterovirus cultivables.

#### **4.1.1.1.2 Mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió**

El mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió va ser descrit per Copper (1961) i adaptat per al seu ús a mostres d'aigua per Slade (1978). S'utilitza molt al Regne Unit (Anònim, 1995b) però no és gaire popular a la resta d'Europa ni als Estats Units. Un dels principals desavantatges del mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió és que es necessiten grans quantitats de cèl·lules i personal qualificat per aplicar-lo ja que l'observació de les clapes de vegades és molt difícil.

El principi del mètode és que la suspensió cel·lular s'inocula amb la mostra i posteriorment s'hi afegeix el medi post-infecció amb una concentració final d'agar de l'1%. La barreja es diposita en una placa de Petri per a cultiu cel·lular i es deixa solidificar. La placa de Petri s'incuba durant 2-5 dies a  $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  amb 5%  $\text{CO}_2$  i s'inicia el recompte de clapes a partir del segon dia. La dispersió dels virus de cèl·lula a cèl·lula produeix clapes, que són visibles per la pèrdua, per part de les cèl·lules infectades, del colorant vital roig neutre. Cada cercle de coloració més pàl·lid es compta com a una ufp (Slade et al, 1984). El procediment detallat tal com es va aplicar en la realització d'aquest estudi es descriu a l'Annex I, "Mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió". Com tots els mètodes, el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió té avantatges i desavantatges. Els avantatges del sistema són: i) es necessita menys temps ja que no cal la preparació prèvia de les

plaques amb la monocapa confluent; ii) les clapes són fàcils d'aïllar ja que es troben dins la capa d'agar; iii) es detecten més virus en suspensions que continguin una baixa concentració d'aquests que amb els mètodes de monocapa i quantals; i iv) el sistema és independent de la superfície en que es realitza l'anàlisi.

Els desavantatges, d'altra banda, són que: i) es necessiten 10 vegades més cèl·lules que per a una anàlisi emprant el mètode de monocapa; ii) les clapes no són clarament diferenciables i presenten dificultat en el recompte; i iii) els cultius en suspensió només es mantenen durant una setmana en el medi *overlay* mentre que els cultius en monocapa es mantenen durant dues setmanes (Dahling i Wright, 1988).

La sensibilitat del mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió ha esta provada en estudis amb mostres ambientals per a la detecció de baixos nivells de virus. Rao et al (1984) trobaren que en mostres d'aigua de mar i de sediments marins que presentaven resultat negatiu pel que feia a presència d'enterovirus quan s'aplicaven el mètode de monocapa (inoculació de mostres en medi sòlid) o inoculació de mostres en medi líquid, s'obtenien mostres positives quan es realitzava l'anàlisi en paral·lel utilitzant com a mètode de quantificació el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió. Els percentatges de positivitat foren del 20% per a les mostres de sòlids en suspensió, sediments esponjosos i sediments i, del 33% per a les mostres d'aigua (Rao et al, 1984). D'altres estudis emprant el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió per a la detecció d'enterovirus cultivables, obtenen mostres positives en un 45,8% per a aigua de mar i un 84,6% per a aigües recreacionals dolces (Hughes et al, 1992). Així doncs, es confirma que es tracta d'un mètode clarament sensible per a la detecció d'enterovirus en mostres ambientals però, cal molta experiència en la seva realització i assumir un cost econòmic important per tal de poder-lo aplicar correctament.

#### Comparació de les titulacions per monocapa i per cèl·lules en suspensió.

Els dos mètodes usant cèl·lules BGM es comparen a Slade et al (1984). Els resultats mostren que el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió és superior a la monocapa en el recompte d'un gran nombre de virus cultivables. S'obtenen enumeracions superiors amb poliovirus 1 i 3, coxsackievirus B1, B4, B5 i A9 i enumeracions inferiors per a echovirus 1 i 4. La relació de Suspensió respecte Monocapa (S/M) descrita per Slade et al (1984) és de

- 4,6 per a poliovirus 1
- 9,7 per a poliovirus 3
- 2,7 per a coxsackievirus B1

- 7,2 per a coxsackievirus B4
- 0,6 per a echovirus 1 i
- 0,12 per a echovirus 4.

La superioritat d'aquest mètode en el recompte de virus cultivables es manifesta també utilitzant cèl·lules Vero amb una relació S/M per a poliovirus 1 de 5,3. A més, mostra que les recuperacions de virus a partir de mostres ambientals és major amb el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió amb relacions S/M que varien entre 1,0 i >15.

Morris i Waite (1980) també detecten recomptes superiors de poliovirus i coxsackievirus B emprant el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió comparat amb el mètode de monocapa. El més important és que el mètode de cèl·lules en suspensió és més sensible i pot detectar virus en suspensions amb baix títol de virus que el mètode de monocapa no detectaria. Aquest fet es posa de manifest per Dahling i Wright (1988) en un estudi desenvolupat per a l'optimització del mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió. En aquest estudi s'estableix el nombre de cèl·lules òptim per a la titulació en  $2 \cdot 10^7$  cèl·lules per a una superfície de 25 cm<sup>2</sup> i s'obtenen títols de virus més alts quan la barreja de virus i cèl·lules es manté en agitació abans d'afegir el medi *overlay*. Amb 67 mostres d'aigua residual analitzades, la mitjana de la relació S/M fou de 6.

La raó de perquè les cèl·lules en suspensió mostren més sensibilitat als virus que quan estan en monocapa no es coneix. S'apunta a una relació amb els agents quelants (EDTA) i els enzims digestius (tripsina) emprats per preparar la suspensió cel·lular (Slade et al, 1984) tot i que potser caldria considerar el nombre de receptors cel·lulars disponibles com un factor més.

#### **4.1.1.1.3 Assaig de centres d'infecció**

Una modificació important de l'assaig de clapes és el recompte de centres infecciosos (Fenner et al, 1974). Suspensions de cèl·lules que han estat infectades amb virus es plaquegen en una monocapa cel·lular preformada durant el període de latència, abans que es produeixin nous virions, i la monocapa és coberta amb compte amb agar. El nombre de clapes que apareixen és una mesura del nombre de cèl·lules infectades originàriament, així aquesta és una manera de càlcul simple per determinar la proporció de cèl·lules infectades al cultiu assajat. Un inconvenient d'aquest mètode és el període que es mantenen les cèl·lules en contacte amb els virus per tal que es

produeixi la infecció. L'anomenat període de latència és diferent per a cada tipus de virus i per tant, en suspensions on hi hagi diferents tipus virals, no es pot tenir la certesa que no s'ha produït replicació abans de disposar les cèl·lules sobre la monocapa preformada.

#### **4.1.1.1.4 Mètode de doble capa**

En el present estudi es desenvolupà un nou mètode de quantificació de virus per recompte d'ufp i s'anomenà mètode de doble capa. Aquest mètode sorgí de la combinació de l'elevada sensibilitat del mètode de cèl·lules en suspensió, amb la facilitat i major objectivitat de lectura del mètode de monocapa. Així, sobre monocapes de cultiu cel·lular, s'afegeix una barreja de suspensió viral, suspensió cel·lular (que pot ser igual o diferent de la que forma el creixement en monocapa) i medi *overlay* que conté agar. D'aquesta manera, un cop produïda la infecció en les cèl·lules en suspensió, aquesta es trasllada, en zones localitzades, a la monocapa cel·lular i es pot detectar per fixació i tinció d'aquesta amb la solució de cristall violeta i formaldehid. Aquest mètode presenta un clar avantatge, l'elevada sensibilitat sumada a la facilitat de realització. Un dels possibles desavantatges és que les cèl·lules només es mantenen una setmana un cop s'ha produït la infecció.

#### **4.1.1.2 Mètodes quantals. Mètodes de presència/absència**

Els mètodes de presència/absència ens indiquen si els virus estan presents en volums determinats de mostra. Quan la presència de virus es determina en diferents volums de mostra o dilucions, es pot calcular mitjançant estimació estadística, el nombre de virus presents en la mostra. Aquests assaigs es basen doncs, en la presència i detecció de partícules virals capaces de produir efecte citopàtic. Les cèl·lules creixen en monocapes confluents en multiplaques de 6, 24 o 96 pous, i són inoculades amb les dilucions de la suspensió viral a assajar. Cada pou ofereix una peça de la informació, és a dir si hi ha efecte citopàtic al cultiu o no resultat de la replicació viral. El procediment detallat com s'aplica en el present estudi es troba a l'Annex I, "Detecció de virus per cultiu cel·lular: inoculació de mostres en medi líquid". El mètode quantal utilitzat més freqüentment per a l'enumeració de virus és el del càlcul de la TCID<sub>50</sub> que es defineix com la dilució de virus necessària per produir efecte citopàtic en el 50% d'un conjunt de cultius cel·lulars infectats (APHA, 1998). Un altre mètode utilitzat és el



del càlcul del nombre més probable (NMP) a partir de dilucions seriades. El NMP es determina calculant el nombre més probable de dilució seriada de la suspensió viral que produeix efecte citopàtic en el cultiu cel·lular infectat (Chang et al, 1985; Guttman-Bass, 1982).

#### 4.1.2. LÍNIES CEL·LULARS PER A LA DETECCIÓ D'ENTEROVIRUS A L'AMBIENT

S'han realitzat estudis per tal de determinar el cultiu cel·lular amb major sensibilitat per a la recuperació de virus a partir d'aigües residuals (Schmidt et al, 1978). Les cèl·lules BGM es trobaren adients per a la recuperació de poliovirus i coxsackievirus B però no per a la recuperació d'altres enterovirus en aquell moment. Tot i això, la línia BGM és una de les línies cel·lulars més emprades per a la detecció d'enterovirus. Dahling i Wright (1986a) van optimitzar els mètodes de cultiu d'aquesta línia per a la realització de procediments d'assaig viral en mostres ambientals.

La línia cel·lular CaCo-2 pot suportar la replicació de la majoria dels enterovirus amb manifestació d'efecte citopàtic (Reigel, 1985). La línia PLC/PRF/5 es descriu com una de les línies d'interès en la detecció de virus entèrics (Botma, 1999). Aquestes cèl·lules poden suportar la replicació d'enterovirus i d'altres virus entèrics incloent-hi soques adaptades de HAV, amb la producció d'efecte citopàtic (Crance et al, 1987; Girond et al, 1991; Grabow et al, 1983).

Algunes de les característiques d'aquestes tres línies cel·lulars es defineixen a continuació.

- **Línia cel·lular BGM (monkey, African green, kidney)**

Línia cel·lular continua, que creix a 37°C amb morfologia fibroblàstica. Establerta el 1962 a partir de cèl·lules de ronyó de mico africà (*Cercopithecus aethiops*) anomenada BGM com acrònim de "Buffalo Green Monkey" o BGMK (*Buffalo Green Monkey Kidney*)

Segons la descripció inicial de la línia, és susceptible de ser infectada pels següents virus: Poliovirus 1, 2 i 3; Echovirus tipus 3, 6, 7, 9, 11, 12 i 27; Coxsackievirus tipus A, B1, B2 i B3; Reovirus tipus 1 i Myxoma.

- **CaCo-2 (human, Caucasian, colon, adenocarcinoma)**

Línia cel·lular que creix a 37°C amb morfologia de cèl·lules epitelials adherents. La línia es va establir el 1974 a partir d'un tumor de colon primari (adenocarcinoma) d'un home de 72 anys d'edat. Després del subcultiu les

cèl·lules inicien el seu creixement formant colònies que posteriorment s'estendran per tal de formar monocapes. Les cèl·lules presenten diferenciació (polarització) a partir dels 6-7 dies de creixement (Pinto et al, 1983; Rodriguez-Boulan i Nelson, 1989) .

Susceptible de ser infectada pels següents virus: enterovirus (coxsackie B1-B6, poliovirus tipus 1-3, la majoria d'echovirus i de coxsackievirus A), adenovirus, herpes simplex tipus 1 i 2, virus del xarampió, virus sincicial respiratori, parainfluença tipus 2, i amb menor extensió virus de la rubèola i virus de les paperes (Reigel, 1985).

- **PLC/PRF/5 (human, liver, hepatoma, Alexander cells)**

Línia cel·lular continua que creix a 37°C amb morfologia epitelial. Establerta a partir de carcinoma hepatocel·lular primari humà.

#### **4.1.3 COMBINACIÓ DE DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS PER A L'ENUMERACIÓ D'ENTEROVIRUS CULTIVABLES**

La recuperació d'alguns tipus de virus com els enterovirus, és relativament senzilla ja que molts d'ells repliquen en una o altra de les línies cel·lulars establertes. Però, tot i els esforços destinats a l'establiment d'una metodologia per recuperar els virus a partir de mostres ambientals, l'aïllament de virus a partir de determinades mostres és encara una tasca que presenta dificultat, en part per l'alt grau de variabilitat donada pel fet que diferents virus poden replicar en els diferents sistemes d'hoste disponibles (Cooney, 1973; Morris i Waite, 1980, Taylor et al, 1997).

La combinació de tipus cel·lulars diferents per a l'anàlisi viral d'una mostra s'ha estudiat des de fa ja uns quants anys, provant diferents esquemes per tal d'augmentar l'eficiència de les tècniques de quantificació de virus. Els primers estudis utilitzaven cèl·lules humanes d'amnion en combinació amb cèl·lules de ronyó de mico que creixien com a monocapes diferents dins el mateix flascó on es realitzava l'anàlisi d'aparició de citotoxicitat (Herrmann i Rawls, 1963). Metcalf et al (1980) van utilitzar procediments d'adsorció seqüencial utilitzant les línies cel·lulars BGM, HEp-2 i PSY-15 les quals eren totes molt permissives per a la replicació dels virus utilitzats en aquell estudi per l'assaig en monocapa. Benton i Hurst (1986) van utilitzar 4 línies cel·lulars contínues diferents (BGM, RD, L-132 i HEL-299) per obtenir plaques amb cultius mixtes. Feren els assaigs utilitzant diferents virus i en aquells casos en que totes les cèl·lules eren permissives per a la replicació del virus en qüestió s'observava un increment en el

recompte respecte a la utilització d'una línia individual. Quan en el cultiu mixt hi havia cèl·lules no permissives els recomptes obtinguts eren inferiors. Aquests mateixos autors proven que la inoculació seqüencial d'aquestes 4 línies cel·lulars contínues generalment produeix una major recuperació de virus. Quan s'utilitza una línia cel·lular permissiva en el primer o l'últim pas d'inoculació, l'augment de recuperació de virus és del 35% respecte el mètode tradicional (Benton i Hurst, 1990).

A més de la combinació de diferents línies cel·lulars, s'ha assajat la modificació d'aquestes. Les cèl·lules anomenades BGМК-hDAF corresponen a cèl·lules BGМК modificades genèticament per tal que sobreexpressin *decay accelerating factor* (DAF). Aquesta sobreexpressió fa que les cèl·lules presentin major susceptibilitat i sensibilitat per molts tipus d'enterovirus (polio, echo i coxsackie B) comparat amb les cèl·lules BGМК sense modificar (Huang et al, 2002). A més, el cultiu mixt d'aquestes cèl·lules BGМК-hDAF i les cèl·lules CaCo-2 fa que es detectin més enterovirus en mostres clíniques dels que es detectaven en els controls amb els cultius habituals (Huang et al, 2002).

#### **4.1.4 MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR PER A LA IDENTIFICACIÓ D'ENTEROVIRUS**

Els principals mètodes per a la identificació de virus, a més del desenvolupament d'efecte citopàtic sobre cultius cel·lulars, es basen en la utilització d'anticossos i en tècniques d'amplificació i caracterització d'àcids nucleics genòmics. La caracterització molecular per tal de tipar els virus no és tant important per al diagnòstic i l'establiment de tractaments, com pot ser-ho per als estudis epidemiològics i per a la investigació de la patogènia i de la progressió de malalties víriques. Fa dues dècades el principal mètode per a la identificació de virus era el creixement en cultius cel·lulars i la observació de l'efecte citopàtic. Seguí l'aplicació d'anticossos (policlonals i monoclonals), l'aplicació d'endonucleases de restricció i més recentment les tècniques de seqüenciació. Aquestes dues darreres tècniques, en el cas de virus amb genoma ARN han d'anar precedides d'una etapa de transcripció reversa i una amplificació del fragment desitjat de genoma viral (RT-PCR). La utilització d'anticossos permet diferenciar grans grups de virus però no permet la identificació de subgrups. D'aquí la necessitat de la identificació de genomes virals utilitzant tècniques de caracterització d'àcids nucleics.

Els genomes virals varien molt a nivell de seqüència nucleotídica i tot i això mantenen les característiques essencials a nivell de proteïnes i de virions. Aquesta variabilitat és la

base per a la caracterització molecular i la classificació dels virus en subtipus. Algunes regions del genoma viral dels enterovirus són extremadament estables i resistents a la mutació, mentre que d'altres són hipervariables. Aquestes característiques i el treball diferenciat a les diverses regions del genoma, són extremadament útils per a l'aplicació de diferents tècniques d'anàlisi d'àcid nucleic per a la caracterització, identificació i classificació dels enterovirus. La utilització únicament de la tècnica de PCR no permet la classificació dels enterovirus en subgrups. Així doncs cal combinar-la amb altres mètodes per tal d'obtenir la caracterització dels virus. Aquests mètodes inclouen com a més comunament utilitzats, entre d'altres, la seqüenciació de fragments d'ADN i l'anàlisi per RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

La tècnica d'anàlisi RFLP es basa en la utilització d'endonucleases o enzims de restricció que tallen l'ADN en seqüències de nucleòtids determinades. La presència de mutacions a les dianes fa que apareguin diferents patrons de fragments d'ADN quan aquests es separen en un gel d'agarosa. Molts dels enterovirus s'han analitzat seguint aquesta metodologia per tal de detectar i diferenciar els serotips (Kuan, 1997; Georgopoulou et al, 2000). Aquesta tècnica és simple i s'utilitza àmpliament ja que pot detectar mutacions puntuals quan aquestes es produeixen en una diàna de restricció. Pot utilitzar-se per comparar gran nombre d'aïllaments en estudis epidemiològics.

Un exemple de la importància de la correcta identificació dels aïllaments virals és el cas de poliovirus. La OMS vol aconseguir l'eradicació de la poliomièlitis i de poliovirus salvatge. Quan això s'aconsegueixi pot parar-se la vacunació amb poliovirus però només quan l'eradicació de poliovirus salvatge estigui documentada de manera convincent. Per tot, és molt important identificar correctament les soques com a poliovirus (soques vacunals, salvatges o revertents derivades de vacunes) o com a enterovirus no polio (NPEV). Pel fet que un elevat percentatge d'infeccions per poliovirus són asimptomàtiques, demostrar l'absència de casos de poliomièlitis paralítica no és un marcador fiable d'eradicació i cal un seguiment virològic. Després de dos anys sense casos de poliomièlitis paralítica (paràlisi flàccida) en una població de 200.000 habitants, la probabilitat de presència d'infeccions asimptomàtiques és encara del 38%. Calen períodes de més de tres anys sense manifestació de la malaltia per tal de tenir una certesa del 95% que hi ha hagut extinció local de la infecció per poliovirus salvatge. Fins i tot després de 5 anys sense casos, la probabilitat de transmissió de poliovirus silenciosos pot estar encara en el rang de 0,1 a 1% (Eichner i Dietz, 1996).

Els **objectius** del present capítol foren els que s'enumeren a continuació.

- Desenvolupar el mètode de doble capa per a la quantificació d'enterovirus.
- Determinar l'efecte de combinar dues línies cel·lulars diferents a les capes inferior i superior per als mètodes Viraden i de doble capa en la quantificació d'enterovirus.
- Determinar l'efecte de la línia cel·lular en la diversitat dels aïllaments virals de mostres ambientals.
- Comparar el mètode de doble capa amb els mètodes de quantificació descrits fins al moment per a la determinació d'enterovirus en suspensions virals de cultius purs i en mostres ambientals.

---

## 4.2 MATERIAL I MÈTODES

---

### 4.2.1 LÍNIES CEL·LULARS I CULTIU

En el cultiu de la línia BGM al laboratori es decidí implementar algunes de les recomanacions de Dahling i Wright (1986a) per tal d'obtenir els majors títols possibles amb aquesta línia cel·lular emprada en l'estudi, optimitzant d'aquesta manera les condicions per a les anàlisis de virus. Així doncs, s'utilitzaren cèl·lules BGM amb de 3 a 5 dies de creixement per a la titulació de suspensions virals, cèl·lules BGM amb de 4 a 5 dies de creixement per a la titulació de mostres ambientals, es decidí afegir tampó Hepes al medi de cultiu de creixement i de manteniment, i passar els períodes d'adsorció en els procediments d'infecció de 60 a 90 minuts.

L'aplicació dels mètodes Viraden i de doble capa implica la utilització de cèl·lules en suspensió. Les cèl·lules per a la suspensió poden pertànyer a la mateixa línia cel·lular emprada per a la formació de la monocapa o ésser diferents. Així, es poden combinar línies cel·lulars diferents per a la determinació d'enterovirus, utilitzant una línia per a la formació de la monocapa i una segona diferent, per a la preparació de la suspensió cel·lular que formarà la capa superior.

Les cèl·lules de la línia BGM creixen bé formant monocapes confluents en 3 dies. En canvi, les línies cel·lulars PLC/PRF/5 i CaCo-2 presenten més dificultat per a la formació de monocapes però és descriuen amb major sensibilitat per a la infecció viral. Així doncs, la línia BGM s'emprà en totes les experiències del present capítol per al cultiu en monocapa i, es combinà amb suspensions cel·lulars a la capa superior de la mateixa línia BGM, de la línia PLC/PRF/5 i de la línia CaCo-2 quan s'aplicaren els mètodes Viraden i de doble capa.

**Taula 4.2.1.1.** *Condicions de creixement i fonts de les diferents línies cel·lulars emprades en aquest treball de tesi.*

	<b>BGM</b>	<b>CaCo-2</b>	<b>PLC/PRF/5</b>
<b>Medi de creixement</b>	MEM 5% SFB	MEM 10% SFB	MEM 10% SFB
<b>Medi de manteniment</b>	MEM 1% SFB	MEM 2% SFB	MEM 2% SFB
<b>Requeriments</b>	-	NEAA	NEAA
<b>Dilució per subcultiu</b>	1:3 a 1:4	1:2	1:5
<b>Temps per obtenir monocapes confluents</b>	3-4 dies	4-5 dies	4-5 dies
<b>Font</b>	"Centro de Instrumentación Científica" de la Universidad de Granada	Dr. Bosch, Grup de Virus Entèrics, Universitat de Barcelona	"Centro de Instrumentación Científica" de la Universidad de Granada

## 4.2.2 MÈTODES DE QUANTIFICACIÓ D'ENTEROVIRUS

### 4.2.2.1 Mètode de monocapa

El mètode s'aplicà en la realització del treball per a l'enumeració d'enterovirus seguint el procediment com es descriu a l'Annex I: "Detecció de virus entèrics per cultiu cel·lular. Inoculació de mostres en medi sòlid. Mètode de monocapa".

### 4.2.2.2 Viraden

El mètode s'aplicà en la realització del treball per a l'enumeració d'enterovirus seguint el procediment que es descriu al Capítol 1.

#### 4.2.2.3 Mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió

El mètode s'aplicà en la realització del treball per a l'enumeració d'enterovirus seguint el procediment com es descriu a l'Annex I: "*Suspended cell plaque assay*. Assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió"

#### 4.2.2.4 Càlcul del nombre més probable d'unitats citopàtiques (NMPUC)

El mètode s'aplicà en la realització del treball per a l'enumeració d'enterovirus seguint el procediment tal com es descriu a l'Annex I: "Detecció de virus entèrics per cultiu cel·lular. Inoculació de mostres en medi líquid", emprant microplaques de 96 pous i multiplaques de 24 pous.

#### 4.2.2.5 El mètode de doble capa (Mocé-Llivina et al, 2004)

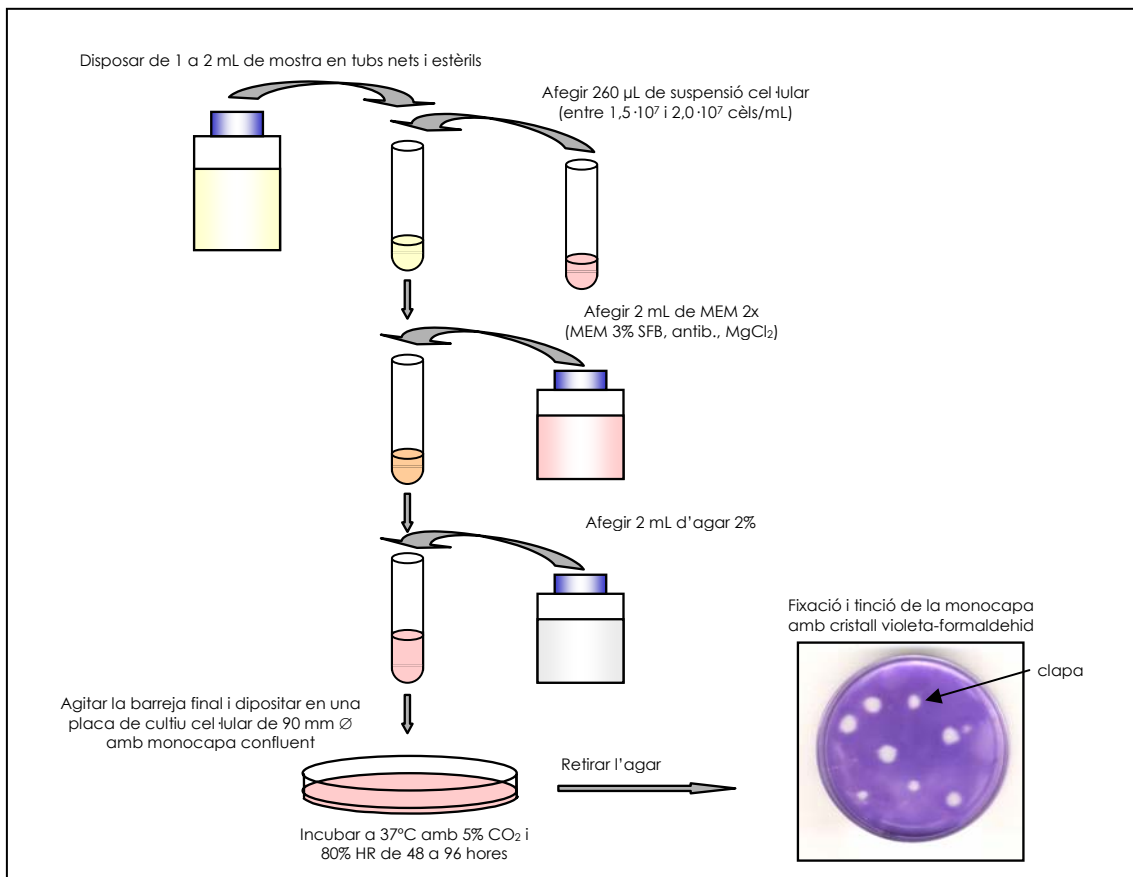
El mètode de doble capa es dissenyà i desenvolupà durant la realització d'aquest treball de tesi com a combinació o modificació dels mètodes de monocapa i de cèl·lules en suspensió. El procediment a seguir es detalla a continuació (Figura 4.2.2.5.1).

- Preparar la suspensió cel·lular necessària de la línia cel·lular a utilitzar com es descriu per al mètode Viraden (Annex I).
- Un cop descontaminada la mostra, repartir-la en tubs estèrils a raó de 1 a 2 mL màxim.
- Afegir 260  $\mu\text{L}$  de la suspensió cel·lular que conté  $1,5 \cdot 2 \cdot 10^7$  cèl·lules  $\cdot \text{mL}^{-1}$  a cadascun dels tubs.
- Afegir 2 mL de medi MEM 2x amb antibiòtics (Annex II)
- Afegir 2 mL d'agar 2% (Annex II) i barrejar immediatament. Abocar ràpidament, evitant que es solidifiqui la barreja, en una placa de Petri de cultiu cel·lular que contingui una monocapa de cèl·lules BGM (3 a 5 dies de creixement) de la que prèviament s'haurà retirat el medi de cultiu.
- Deixar solidificar a temperatura ambient sobre una superfície plana.



- Incubar sense invertir les plaques, el temps necessari per a la formació de clapes a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ , en un incubador amb 5%  $\text{CO}_2$  i 80% humitat relativa.
- Passat el període d'incubació, retirar l'agar amb l'ajuda d'una espàtula, tenyir les plaques amb solució de cristall violeta-formaldehid (Annex II) i realitzar el recompte de clapes.

En l'aplicació del mètode de doble capa, utilitzant suspensions de cultius purs de virus i mostres d'aigua residual bruta, es provà de doblar i triplicar la quantitat de cèl·lules que s'afegien en la suspensió cel·lular. En cap cas aquest fet resultava en un increment en el recompte de virus en les 5 experiències realitzades, ni per les suspensions virals amb cultius purs ni en les mostres d'aigua residual.



**Figura 4.2.2.5.1.** Esquema del mètode de doble capa.

### 4.2.3 COMPARACIÓ DE MÈTODES

Per a la comparació de la recuperació d'enterovirus emprant els diferents mètodes de quantificació, es segueixen dues aproximacions; comparar els mètodes emprant suspensions de cultius purs de diferents enterovirus (de laboratori i aïllaments d'aigua residual purificats) i, comparar la recuperació d'enterovirus a partir de diferents mostres d'aigua residual, i concentrats d'aigua de riu i aigua de mar.

El mètode Viraden pot aplicar-se com a mètode de concentració i quantificació de virus cultivables a partir de mostres ambientals. Per aquest motiu es comparà l'aplicació d'aquest mètode amb mètodes de concentració establerts, combinats amb la quantificació de virus cultivables per monocapa o doble capa, per determinar la presència d'enterovirus en mostres d'aigua de riu i aigua de mar.

#### 4.2.3.1 Suspensions de cultius purs de soques víriques de referència

##### 4.2.3.1.1 Comparació de mètodes de quantificació

Amb suspensions de virus purificats a partir de la infecció d'un cultiu de BGM en medi líquid, es realitzaren dilucions decimals en PBS 1x estèril i una dilució final en  $MgCl_2$  0,05 M, fins tenir valors de  $100 \pm 50$  ufp  $\cdot mL^{-1}$  pel mètode de major recompte. Les dilucions necessàries per obtenir les concentracions de virus desitjades, quantificades pel mètode de major recompte, es fixaren en experiències prèvies per a cadascun dels virus assajats.

Es procedí a l'anàlisi de volums d'1 mL de les diferents suspensions virals obtingudes a partir dels diferents virus:

- poliovirus 1 (Sabin)
- coxsackievirus B4
- coxsackievirus B5
- echovirus 6 (aïllament d'aigua residual) i
- echovirus-AR51101.1 (enterovirus amb Patró 1 de RFLP aïllat d'aigua residual)

S'analitzaren les diferents suspensions virals utilitzant els diferents mètodes de quantificació de virus, el mètode de monocapa, el mètode de cèl·lules en suspensió

(només per a poliovirus 1 Sabin), el mètode Viraden i el mètode de doble capa. Per a aquest últim mètode s'assajaren dues modificacions addicionals:

- la incubació de la barreja de la suspensió viral i la suspensió cel·lular a  $(36 \pm 2)$  °C, durant 30 minuts en agitació (200 rpm) i,
- l'addició d'IDU al cultiu en monocapa de cèl·lules BGM en creixement utilitzades per a les determinacions.

#### **4.2.3.1.2 Estudis de combinació de línies cel·lulars aplicant els mètodes Viraden i de doble capa.**

A partir de suspensions virals de títol alt de poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B5, echovirus 6 i enterovirus-AR51101.1 (Patró 1 de RFLP), es procedí a la dilució d'aquestes en  $\text{MgCl}_2$  0,05 M fins tenir valors de  $100 \pm 50$  ufp · mL<sup>-1</sup>.

Es repartiren les suspensions resultants en microtubs estèrils a raó d'1,2 mL per tub i es congelaren a  $(-70 \pm 10)$  °C. Passats 15 dies aproximadament a partir de la seva preparació, es procedí a la titulació en paral·lel de volums d'1 mL de les diferents suspensions virals emprant els mètodes Viraden i de doble capa, utilitzant plaques amb monocapes cel·lulars confluent preparades amb cèl·lules BGM i, suspensions cel·lulars per a la capa superior preparades a partir de cultius de les línies BGM i CaCo-2.

### **4.2.3.2 Suspensions de virus obtingudes de mostres ambientals**

#### **4.2.3.2.1 Aigua residual bruta**

Les diferents mostres d'aigua residual urbana de diferents orígens es descontaminaren per filtració i es procedí a la determinació de virus cultivables utilitzant els diferents mètodes de quantificació disponibles; monocapa, Viraden, doble capa i infecció en medi líquid per al càlcul de NMP.

Les mostres es tractaren com es detalla a continuació en tots els casos:

- Es descontaminà el volum necessari de mostra per filtració a través d'unitats de filtració de 0,22 µm de diàmetre de porus de baixa adsorció proteica (PES o PVDF).

- Es condicionà el volum de mostra resultant amb  $MgCl_2$  a concentració final de 0,05M.

En la determinació de virus cultivables en aigua residual emprant els mètodes descrits, es realitzaren diferents valoracions per veure com influïen diferents condicions en la recuperació dels virus. Així, es valorà l'efecte dels dies d'incubació després de la infecció fins a la lectura de les plaques; l'efecte de l'addició d'IDU al cultiu i, la utilització de suspensions cel·lulars de diferents línies cel·lulars permissives a la capa superior.

Si no s'especifica res, cada determinació d'enterovirus en aigua residual es feu com segueix; dues rèpliques per volums d'1 i 10 mL per al mètode Viraden (22 mL en total) i 5 rèpliques per volums d'1 i 2 mL per al mètode de doble capa (15 mL en total).

#### 4.2.3.2.1.1 Efecte dels dies d'incubació post-infecció

Es valorà l'efecte dels dies d'incubació post-infecció en la recuperació de virus cultivables a partir de l'aigua residual bruta. Utilitzant diferents mètodes de quantificació d'enterovirus, es valorà l'efecte de realitzar la lectura de les plaques als 3 dies o als 4 dies d'incubació post infecció.

#### 4.2.3.2.1.2 Efecte de l'addició d'IDU al cultiu en l'enumeració d'enterovirus en aigua residual bruta

A partir de les mostres d'aigua residual descontaminades i condicionades com es descriu anteriorment, es feren titulacions emprant els mètodes de monocapa, Viraden i de doble capa, sobre dos tipus de cèl·lules. D'una banda, utilitzant monocapes cel·lulars que creixien amb medi de creixement 5% SFB (sense IDU), condició control i, de l'altra, utilitzant monocapes que creixien amb medi de creixement suplementat amb IDU (concentració final  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) a les 24 hores de creixement. Amb els resultats d'ufp per litre, es calcularen, els coeficients entre els valors obtinguts amb les plaques amb IDU respecte les plaques control, per a cadascun dels mètodes de quantificació utilitzats.

#### 4.2.3.2.1.3 Efecte de la combinació de diferents línies cel·lulars en la quantificació i aïllament d'enterovirus en aigua residual bruta

Com ja s'ha esmentat anteriorment per al mètode Viraden, el mètode de doble capa també permet la utilització a l'hora de diferents línies cel·lulars en la determinació de virus cultivables. Així pot utilitzar-se una línia en la monocapa i una segona, igual o diferent, en la capa superior. La combinació de cèl·lules que es proposa per als mètodes Viraden i de doble capa és una aproximació diferent a les seguides en els treballs previs, basats principalment en la formació de monocapes mixtes o en la inoculació seqüencial de diferents cultius cel·lulars.

En el treball s'utilitzà la línia BGM per a la formació de les monocapes en tots els casos ja que són cèl·lules que creixen fàcilment i formen monocapes confluents sense dificultat. I per a la capa superior, per a les cèl·lules que formarien la suspensió cel·lular, s'utilitzaren diferents línies; la línia BGM, la línia CaCo-2 i la línia PLC/PRF/5.

Les línies CaCo-2 i PLC/PRF/5 presenten requeriments d'aminoàcids no essencials per al seu creixement i manteniment. Per aquest fet, els medis *overlay* emprats en les anàlisi realitzades amb combinació de línies cel·lulars es modificaren per addició d'aminoàcids no essencials a concentració final 1x, quan s'utilitzaren les línies CaCo-2 i PLC/PRF/5.

#### 4.2.3.2.1.4 Determinació de virus cultivables en aigua residual utilitzant el mètode de NMP

Per a la determinació de virus cultivables en aigua residual bruta per NMP s'utilitzaren diferents mètodes d'infecció.

- Multiplaques de 24 pous amb cèl·lules BGM formant monocapes confluents (4 dies de creixement) s'infectaren amb volums de 50 µL per pou d'aigua residual bruta descontaminada per filtració. S'inocularen dues multiplaques per mostra reservant un pou per al control negatiu realitzat amb PBS estèril i un pou per al control positiu realitzat amb coxsackievirus B5 ( $100 \pm 15$  ufp·mL<sup>-1</sup>).
- Microplaques de 96 pous amb cèl·lules BGM formant monocapes confluents (4 dies de creixement) s'infectaren amb volums de 20 µL per pou d'aigua residual bruta descontaminada per filtració. S'inoculà una microplaca per mostra reservant un pou per al control negatiu realitzat amb PBS estèril i un pou per al control positiu realitzat amb coxsackievirus B5 ( $100 \pm 15$  ufp·mL<sup>-1</sup>).

#### 4.2.3.2.1.5 Detecció d'enterovirus en aigua residual bruta per RT-PCR

A partir de mostres d'aigua residual bruta es procedí amb l'extracció d'àcids nucleics (ADN i ARN) a partir de 200 µL de mostra, utilitzant el kit d'extracció QIAamp® DNA Blood (51104, Qiagen GmbH) seguint les instruccions del fabricant.

Seguidament es procedí amb la detecció d'ARN d'enterovirus utilitzant tècniques d'amplificació d'àcids nucleics de RT-PCR i PCR imbricada amb els cebadors Ent1 i Ent2 per a la RT-PCR i els cebadors nEnt1 i nEnt2 per a la reacció de PCR imbricada (Pina et al, 1998) seguint els procediments descrits a l'Annex I: "RT-PCR per enterovirus" i "PCR imbricada".

#### **4.2.3.2.2 Aigua residual tractada**

Les mostres corresponien a diferents efluents recollits en els decantadors secundaris d'EDAR biològica.

Les mostres es descontaminaren per filtració a través de filtres de baixa adsorció proteica (PVDF o PES) de 0,22 µm de diàmetre de porus. Es condicionaren amb MgCl<sub>2</sub> fins a concentració final de 0,05 M.

Es realitzà l'enumeració d'enterovirus emprant dos mètodes diferents;

- Per al mètode Viraden: volums de 20 i 50 mL de mostra en filtres de 47 mm de diàmetre.
- Per al mètode de doble capa: anàlisi de 20 mL de volum total de mostra, titulant, com a màxim, 2 mL per placa de Petri de cultiu cel·lular de 90 mm de diàmetre.

Es combinaren les diferents línies cel·lulars BGM, CaCo-2 i PLC/PRF/5 com es descriu per a l'aigua residual bruta.

#### 4.2.3.2.3 Aigua de riu

##### 4.2.3.2.3.1 Comparació de mètodes de quantificació d'enterovirus en concentrats virals

La concentració d'enterovirus a partir de mostres d'aigua de riu es realitzà com s'indica a continuació seguint un procediment adaptat de la metodologia descrita al "ICR Microbial Laboratory Manual" (EPA, 1996). Breument,

- es partí de filtres electropositius MK (MicroKlean MK 100 de 9<sup>3/4</sup>", Cuno Inc.) on prèviament s'havien concentrat volums variables (100 a 200 litres) d'aigua de riu.
- S'eluí amb tampó glicina pH 10,5 com es descriu Annex I: "Elució de filtres electropositius".
- Es reconcentrà per floculació orgànica amb extracte de carn 3% (Annex I: "Concentració de virus per floculació orgànica") i es recollí el concentrat en 50 mL de PBS 1x estèril pH 7,2.
- Es descontaminà per filtració a través de filtres de PES de 0,22 µm de diàmetre de porus.
- La mostra es dividí en dues i es procedí a l'enumeració d'enterovirus emprant el mètode de monocapa (Annex I) i el mètode de doble capa, emprant la línia cel·lular BGM en tots els casos. Es garantí l'anàlisi de volums de 20 mL de mostra mitjançant el mètode de monocapa.
- S'incubaren les plaques durant 4 dies a (36 ± 2)°C, 5% CO<sub>2</sub> i 80% HR. S'eliminà l'agar i es fixaren i tenyiren les cèl·lules amb la solució de cristall violeta i formaldehid. Es procedí amb el recompte de clapes i l'expressió dels resultats com a ufp per 20 mL de concentrat viral.

##### 4.2.3.2.3.2 Comparació de mètodes de concentració-enumeració d'enterovirus en aigua de riu

Les mostres es recolliren en contenidors estèrils en el punt de captació de l'Estació de Tractament d'Aigua Potable (ETAP) que es troba situada en el curs del riu Llobregat al municipi d'Abrera i que pertany al consorci Aigües Ter Llobregat (ATLL).

Les mostres d'aigua de riu crua es processaren seguint dues aproximacions metodològiques per tal de valorar l'aplicabilitat i l'eficiència dels mètodes Viraden i de doble capa per a l'enumeració de virus cultivables en aigua de riu. Aquesta valoració es destinà a saber si era possible evitar el pas de concentració primària per filtres electropositius, per a aquest tipus de mostra d'aigua de riu.

**Per al mètode Viraden:**

- Es clarificà la mostra filtrant a través de filtres de PVDF de 0,65 µm de diàmetre de porus.
- Es condicionà la mostra filtrada amb MgCl<sub>2</sub> fins obtenir una concentració final de 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>.
- S'aplicà el mètode Viraden en placa de 90 mm, filtrant volums de 250, 500 i 1000 mL de mostra per filtre de 90 mm de diàmetre, assegurant un cabdal mínim de 0,1 L·min<sup>-1</sup>. El volum final de mostra analitzat fou de 2 litres.
- Es titulà emprant la línia cel·lular BGM tant a la monocapa com a la suspensió cel·lular.
- S'incubaren les plaques durant 4 dies a (36 ± 2)°C, 5% CO<sub>2</sub> i 80% HR.
- Es retirà l'agar i el filtre i es fixaren i tenyiren les cèl·lules amb la solució de cristall violeta-formaldehid.
- Es realitzà el recompte de les clapes i s'expressaren els resultats com a ufp per litre.

**Per als mètodes de concentració per floculació orgànica i enumeració per doble capa** es seguí com es detalla a continuació:

- A partir d'un litre d'aigua de riu (pH 7 a 7,5) es procedí a la concentració per floculació orgànica amb extracte de carn 3% (Annex I).
- Es descontaminà el volum de floculat (50 mL) per filtració a través de 0,22 µm PES.
- S'inoculà tot el volum de concentrat resultant, aplicant el mètode de doble capa, titulant 2 mL per placa de Petri de 90 mm de diàmetre.
- S'incubaren les plaques durant 4 dies a (36 ± 2)°C, 5% CO<sub>2</sub> i 80% HR.
- Es retirà l'agar i es fixaren i tenyiren les cèl·lules amb la solució de cristall violeta-formaldehid.



- Es realitzà el recompte de clapes. El nombre total de clapes corresponia a les ufp per litre.

D'aquestes mostres es realitzaren recomptes addicionals de bacteris indicadors de contaminació fecal (coliformes fecals) i de bacteriòfags (colifags somàtics, fags somàtics i F-específics de *Salmonella typhimurium* WG49, bacteriòfags que infecten *Bacteroides fragilis* RYC2056 i bacteriòfags que infecten *Bacteroides thetaiotaomicron* GA-17). Els procediments que s'aplicaren per aquestes determinacions i els resultats obtinguts es recullen al Capítol 5.

#### **4.2.3.2.4 Aigua de mar**

Per a l'anàlisi d'enterovirus en aigua de mar segons la Directiva 76/160/CEE, cal analitzar volums de mostra de 10 litres per cada determinació. Calen doncs, procediments de concentració per tal de procedir a la determinació de virus cultivables en aquest tipus de mostra.

Per tal d'establir el procediment més adient per a l'anàlisi d'enterovirus en aigua de mar, es seguiren les aproximacions següents. En primer lloc es compararen diferents mètodes de concentració-enumeració, i seguidament es compararen dues línies cel·lulars diferents.

Per als estudis de comparació de mètodes s'utilitzaren mostres recollides a nivell de línia de costa (platja) en dos localitats de la zona metropolitana de Barcelona. Pel fet de tractar-se de mostres per a les que s'esperaven nombres molt baixos de virus, es van utilitzar en tots els casos cèl·lules BGM que havien crescut amb la presència d'IDU al medi de cultiu.

##### 4.2.3.2.4.1 Comparació de mètodes de concentració-enumeració d'enterovirus en aigua de mar

En primer lloc, s'assajaren tres procediments de concentració-enumeració diferents;

- la concentració utilitzant el procediment d'adsorció-elució de virus a pols de vidre tal com es descriu a l'Annex I i, anàlisi del concentrat pel mètode de monocapa,
- la concentració per adsorció-elució a pols de vidre i anàlisi del concentrat pel mètode de doble capa i,

- la concentració-enumeració utilitzant el mètode Viraden en placa de 90 mm. En aquest cas, prèviament a la concentració, la mostra es prefiltrà per 0,65 µm PVDF i es condicionà amb MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05 M. El mètode Viraden en placa de 90 mm s'aplicà en tots els casos filtrant 1 litre de mostra clarificada i condicionada per cada filtre; així doncs, calgueren 10 plaques de cultiu per cada anàlisi a realitzar. La línia cel·lular emprada per a les titulacions fou la línia BGM en tots els casos.

#### 4.2.3.2.4.2 Comparació de línies cel·lulars

Es compararen dues línies cel·lulars amb el mètode Viraden en placa de 90 mm, per veure si es detectaven diferències en la utilització d'una o altra. La monocapa es preparà per a totes les experiències amb cèl·lules BGM tractades que creixien amb IDU (concentració final 50 µg·mL<sup>-1</sup>) al medi de cultiu. Les combinacions de línies cel·lulars escollides foren:

- BGM a la capa superior sobre BGM a la monocapa i
- CaCo-2 a la capa superior sobre BGM a la monocapa.

Així doncs, s'analitzaren mostres d'aigua de mar clarificades per filtració a través de filtres de 0,65 µm PVDF i condicionades amb MgCl<sub>2</sub> a concentració final de 0,05 M, emprant el mètode Viraden en placa de 90 mm.

### **4.2.4 IDENTIFICACIÓ D'AÏLLAMENTS VIRALS MITJANÇANT RT-PCR SEGUIDA DE RFLP I/O SEQÜENCIACIÓ**

De les mostres ambientals analitzades es realitzà l'aïllament de virus a partir de les clapes per tal de procedir posteriorment a la seva identificació seguint tècniques d'amplificació i caracterització del genoma d'ARN viral. L'aïllament de virus a partir de les clapes havia de fer-se abans de la tinció de les cèl·lules amb la solució de cristall violeta-formaldehid, observant les clapes a contrallum com a zones de menor densitat cel·lular. Per a això, un cop retirada la capa d'agar o bé, l'agar i el filtre per al mètode Viraden, es procedí a identificar les zones de lisi cel·lular a contrallum abans de tenyir i fixar la monocapa. Un cop localitzades les zones es procedí a l'aïllament de les partícules víriques ressuspenent el material que provenia d'una zona de lisi localitzada i

separada de la resta, en  $MgCl_2$  0,05 M com es descriu a l'Annex I: "Aïllament de virus procedents de zones de lisi cel·lular".

Mitjançant la reinfecció d'un cultiu de cèl·lules BGM fent inoculació en medi líquid en multiplaques de 24 pous (Annex I) s'obtingueren cultius enriquits (presumptament purs) de virus de títol elevat ( $10^8$  ufp  $\cdot mL^{-1}$  aproximadament). A partir d'aquests cultius es procedí amb l'extracció d'ARN viral emprant dues metodologies diferents descrites a l'Annex I, corresponents a dos kits d'extracció d'àcids nucleics diferents.

#### **4.2.4.1 Amplificació de fragments del genoma viral per a la identificació d'enterovirus**

A partir de la suspensió d'ARN viral es procedí a la seva amplificació mitjançant la tècnica de RT-PCR seguint dos protocols diferents i utilitzant com a cebadors per a la detecció d'enterovirus EP1 i EP4 (Gow et al, 1991). Inicialment s'aplicà l'amplificació seguint passos seqüencials de desnaturalització, síntesi d'ADNc i amplificació de les dobles cadenes híbrides (Annex I: "RT-PCR per enterovirus") fet que implicava tres passos diferents i major manipulació dels tubs. Per tal de simplificar la metodologia, les amplificacions es realitzaren, posteriorment, fent una única barreja inicial de reactius (Annex I: "RT-PCR per enterovirus en un sol pas").

Per a la confirmació i identificació dels aïllaments corresponents a poliovirus 1 s'utilitzaren cebadors diferents per a l'amplificació de l'ARN viral amb el procediment de RT-PCR en un sol pas. Els cebadors reben els noms de UC<sub>53</sub> i UG<sub>52</sub> (Georgopoulou et al, 2000).

En els casos de resultats negatius de RT-PCR per a enterovirus, es realitzà la reacció de RT-PCR amb cebadors de reovirus (Taula 4.2.4.1.1).

**Taula 4.2.4.1.1.** Cebadors emprats per a l'amplificació de regions de genoma d'enterovirus i de reovirus per RT-PCR i PCR-imbricada.

Cebador	Virus tipus (regió)	Posició	Reacció d'amplificació	Mida del producte (pb)	Seqüència	Referència
<b>Ent1</b>	CV B4 (5'NTR)	64-83	RT-PCR	540	5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'	Pina et al, 1998
<b>Ent2</b>	Polio 1 (5'NTR)	578-597	RT-PCR		5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	
<b>nEnt1</b>	Polio 1 (5'NTR)	430-450	PCR-Imbricada	123	5'-TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTA-3'	Pina et al, 1998
<b>nEnt2</b>	CV B4 (5'NTR)	547-567	PCR-Imbricada		5'-GAAACACGGACACCCCAAAGTA-3'	
<b>EP1</b>	5'NTR	64-83	RT-PCR	414	5'-CGGTACCTTTGTGCGCCTGT-3'	Gow et al, 1991
<b>EP4</b>	5'NTR	459-478	RT-PCR		5'-TTAGGATTAGCCGCATTCAG-3'	
<b>nEP1</b>	5'NTR	166-182	PCR-Imbricada	297	5'-AAGCACTTCTGTTTCCC-3'	Kuan, 1997
<b>nEP4</b>	5'NTR	447-463	PCR-Imbricada		5'-ATTCAGGGGCCGGAGGA-3'	
<b>UC<sub>53</sub></b>	5'NTR		RT-PCR	436	5'-TTGTCACCATAACCAGCCA-3'	Georgopoulou et al, 2000
<b>UG<sub>52</sub></b>	5'NTR		RT-PCR		5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	
<b>REOL3F</b>	Reovirus (gen L3)	3164-3183	RT-PCR	320	5'-CAGTCGACACATTTGTGGTC-3'	Spinner i Di Giovanni, 2001
<b>REOL3R</b>	Reovirus (gen L3)	3464-3483	RT-PCR		5'-GCGTACTGACGTGGATCATA-3'	

#### 4.2.4.2 RFLP i seqüenciació d'amplificats de genoma viral per a la identificació d'enterovirus

L'ADN amplificat s'analitzà seguint dues aproximacions: anàlisi de fragments de restricció i seqüenciació.

##### 4.2.4.2.1 Caracterització de regions amplifcades de genomes d'enterovirus per RFLP

Per a l'anàlisi dels fragments de restricció es digeriren fraccions de l'ADN amplificat utilitzant tres enzims de restricció diferents: *Bgl I*, *Sty I* i *Xmn I* (Taula 4.2.4.2.1.1) basant-nos en el procediment descrit per Kuan (1997) però, utilitzant la informació de patrons de restricció que s'obtingué a partir de les seqüències de genomes virals dipositades al banc de dades. Es localitzaren els fragments dels genomes dels diferents enterovirus que podien amplificar-se amb els cebadors utilitzats, disponibles al banc de dades de seqüències nucleotídiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Es seguí el procediment de comparació de seqüències dels dos cebadors (EP1 i EP4), el directe i el revers, utilitzant el recurs informàtic *nucleotide-nucleotide BLAST* de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Seguidament, es localitzà el fragment teòricament amplificat per la reacció de RT-PCR dins els genomes dels diferents enterovirus.

Es realitzà la restricció a partir de l'amplificat per RT-PCR. S'analitzaren els fragments mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 3%. Els patrons RFLP que s'obtingueren es compararen amb els patrons teòrics que s'obtenien de la digestió dels mateixos fragments de genoma viral dipositats al banc de dades de seqüències nucleotídiques per als diferents enterovirus. Per tal d'obtenir aquests patrons RFLP s'utilitzà el programa informàtic Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>), que permet la localització de les dianes de restricció dels enzims seleccionats en una seqüència nucleotídica determinada. Els patrons RFLP que s'obtenen es mostren a la taula 4.2.4.2.1.2.

Si es consideren els patrons de restricció que proporciona l'article de Kuan (1997) hi ha 5 patrons del total d'onze patrons complets, que no coincideixen amb els que s'obtenen del banc de dades. Concretament els patrons de poliovirus 1, coxsackievirus B2, coxsackievirus B3, coxsackievirus B5 i coxsackievirus B6. En total, a Kuan (1997) es consideren 16 patrons (11 complets i 5 incomplets per 1 o 2 dels enzims) mentre que a

partir del banc de dades, es pot obtenir la informació completa de 24 patrons RFLP d'enterovirus.

Les primeres valoracions de la capacitat de diferenciar els patrons de RFLP a partir de Kuan (1997) o de patrons RFLP del banc de dades es realitzà amb virus coneguts disponibles al laboratori (poliovirus 1 (Sabin), coxsackievirus B4 i coxsackievirus B5). Al comparar els patrons RFLP reals d'aquests tres virus, la coincidència s'establí correctament per als tres virus, amb els patrons que provenien de les seqüències dipositades al banc de dades. Pels motius exposats, doncs, es decidí basar la identificació posterior dels aïllaments virals obtinguts a partir de mostres ambientals, en els patrons RFLP que s'obtingueren a partir del banc de dades.

Analitzant els patrons RFLP que provenien de les seqüències nucleotídiques del banc de dades s'observà que, determinats patrons de virus diferents coincidien. Les coincidències es produïen entre:

- poliovirus 2 i echovirus 7
- poliovirus 3 i echovirus 11
- coxsackievirus B2, coxsackievirus B3, echovirus 1 i echovirus 5
- coxsackievirus B4 i echovirus 4
- coxsackievirus B5, echovirus 8, echovirus 9 i coxsackievirus B3 (Woodruf)
- echovirus 6 (kh 7/92) i echovirus 30

Per tal d'intentar avançar en la identificació dels patrons coincidents, en el cas d'echovirus 11 i poliovirus 3 s'utilitzà un enzim addicional. Així, el fragment d'ADN amplificat a partir dels genomes virals utilitzant els primers EP1 i EP4, es digerí addicionalment amb *Alu I*, per tal de permetre la diferenciació entre echovirus 11 i poliovirus 3.

Per a la diferenciació de soques de poliovirus 1, l'amplificació amb els cebadors UC53 i UG52 es seguí realitzant la digestió del fragment amplificat de 440 pb corresponent a la regió 5'NTR dels enterovirus, amb *Ava I* per tal de determinar si, per al fragment amplificat, els aïllaments corresponien a soques de poliovirus 1 vacunals (Sabin) o salvatges (Mahoney) segons Georgopoulou et al (2000).

**Taula 4.2.4.2.1.1.** Enzims de restricció i seqüències de reconeixement.

Enzim de restricció	Diana de restricció
<b><i>Bgl I</i></b>	5'...GCCN NNN▼NGGC...3' 3'...CGGN▲NNN NCCG...5'
<b><i>Sty I</i></b>	5'...C▼C(A/T)(T/A)G G...3' 3'...G G(T/A)(A/T)C▲C...5'
<b><i>Xmn I</i></b>	5'...GAANN▼NNTTC...3' 3'...CTTNN▲NNAAG...5'
<b><i>Alu I</i></b>	5'...AG▼CT...3' 3'...TC▲GA...5'
<b><i>Ava I</i></b>	5'...G▼(T/C)CG(A/G)G...3' 3'...C (A/G)GC(T/C)▲C...5'

**Taula 4.2.4.2.1.2.** Patrons de RFLP obtinguts a partir de les seqüències dipositades al banc de dades NCBI corresponents al fragment teòric del genoma d'enterovirus amplificat amb els cebadors EP1-EP4. S'indiquen els fragments que s'obtenen per a cada digestió enzimàtica per a cadascun dels virus.

	Fragments (pb) que s'obtenen amb cadascuna de les endonucleases		
	<b><i>Bgl I</i></b>	<b><i>Sty I</i></b>	<b><i>Xmn I</i></b>
<b>Poliovirus 1</b>	414	334 80	414
<b>Poliovirus 2</b>	414	215 199	414
<b>Poliovirus 3</b>	414	414	414
<b>Coxsackievirus B1</b>	414	209 205	251 163
<b>Coxsackievirus B2</b>	414	317 85 12	251 163
<b>Coxsackievirus B3</b>	414	314 88 12	251 163
<b>Coxsackievirus B3 (Woodruf)</b>	414	414	251 163

**Taula 4.2.4.2.1.2.** Patrons de RFLP obtinguts a partir de les seqüències dipositades al banc de dades NCBI corresponents al fragment teòric del genoma d'enterovirus amplificat amb els cebadors EP1-EP4. (Continuació)

	Fragments (pb) que s'obtenen amb cadascuna de les endonucleases		
	<i>Bgl I</i>	<i>Sty I</i>	<i>Xmn I</i>
<b>Coxsackievirus B4</b>	321	414	249
	93		165
<b>Coxsackievirus B5</b>	414	414	247
			167
<b>Coxsackievirus B5 (Faulkner)</b>	321	207	414
	94	110	
		86	
		12	
<b>Coxsackievirus B6</b>	172	316	250
	148	85	164
	94	13	
<b>Coxsackievirus A9</b>	320	414	250
	94		164
<b>Echovirus 1 (Farouk ATCC VR-1038)</b>	414	317	250
		86	164
		12	
<b>Echovirus 4</b>	319	414	251
	96		163
<b>Echovirus 5</b>	414	317	249
		85	165
		12	
<b>Echovirus 6</b>	319	327	251
	95	87	163
<b>Echovirus 6 (kh 7/92)</b>	320	316	251
	94	87	163
		12	
<b>Echovirus 7 (Wallace)</b>	414	209	414
		205	
<b>Echovirus 8</b>	414	414	251
			163
<b>Echovirus 9</b>	414	414	251
			163



**Taula 4.2.4.2.1.2.** Patrons de RFLP obtinguts a partir de les seqüències dipositades al banc de dades NCBI corresponents al fragment teòric del genoma d'enterovirus amplificat amb els cebadors EP1-EP4. (Continuació)

	Fragments (pb) que s'obtenen amb cadascuna de les endonucleases		
	<i>Bgl I</i>	<i>Sty I</i>	<i>Xmn I</i>
<b>Echovirus 11</b>	414	414	414
<b>Echovirus 11 (Metcalf)</b>	414	204	414
		110	
		89	
		12	
<b>Echovirus 12</b>	414	315	414
		87	
		12	
<b>Echovirus 30</b>	322	318	248
	93	85	166
		12	
<b>Enterovirus Yambian 96-83 csf</b>	326	211	186
	88	203	169
			59

Per a la diferenciació dels fragments de genoma amplificats amb els cebadors EP1-EP4 corresponents a poliovirus 3 i echovirus 11 s'utilitzà l'enzim *Alu I* i els patrons que s'obtenien per a cadascun d'aquests virus són els següents:

Poliovirus 3: 186+122+63+43 pb

Echovirus 11: 353+61 pb

Per a la diferenciació entre soques de poliovirus 1 vacunals i no vacunals (Georgopoulou et al, 2000), els fragments de genoma amplificats utilitzant els cebadors UC53 i UG52 digerits amb l'enzim *Ava I* proporcionaven els patrons següents:

Poliovirus 1 Sabin: 315+121 pb

Poliovirus 1 Mahoney: 436 pb

#### **4.2.4.2.2 Caracterització de regions amplificades de genomes d'enterovirus per seqüenciació**

Per als casos en que el patró de fragments de restricció obtingut no correspongué amb cap dels patrons del banc de dades, es va recórrer a la caracterització mitjançant el procediment de seqüenciació. Per tal de realitzar la reacció de seqüenciació s'empraren els cebadors EP1 i EP4 i es compararen les seqüències resultants amb les dipositades al banc de dades. En aquests casos s'utilitzà un procediment de seqüenciació basat en un kit comercial (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 2.0, Abiprism, Perkin-Elmer Biosystems) i precipitació amb etanol del producte de seqüenciació com es descriu a l'Annex I. Per a l'obtenció de les seqüències, les mostres es processaren en un seqüenciador d'ADN per electroforesi capil·lar ABI Prism 3730 Applied Biosystems/Hitachi (48 capil·lars) dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

---

## 4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

### 4.3.1 COMPARACIÓ DE MÈTODES

#### 4.3.1.1 Suspensions de cultius purs de soques víriques de referència

##### 4.3.1.1.1 Comparació de mètodes de quantificació de virus

A la taula 4.3.1.1.1 es mostren els resultats que corresponen als experiments de comparació de mètodes de quantificació, realitzats amb suspensions de cultius purs de virus.

El mètode de doble capa apareix com el mètode més eficient per la quantificació dels enterovirus a estudi, en comparació amb els mètodes de monocapa i Viraden. L'increment respecte al mètode de monocapa pel que fa a al recompte d'echovirus 6 pot arribar a ésser de 15,2 vegades més quan s'utilitza el mètode de doble capa. Els mètodes de doble capa i de Viraden permeten recuperacions significativament majors (ANOVA,  $P < 0,05$ ) que el mètode de monocapa, per als diferents enterovirus assajats. I el mètode de doble capa permet recuperacions més grans, estadísticament significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ) que el mètode Viraden.

La modificació del mètode de doble capa que permet un període d'adsorció dels virus a les cèl·lules a 37°C durant 30 minuts no suposa en aquest cas un increment en els recomptes d'enterovirus, fins i tot s'observa l'efecte contrari en alguns casos. Aquesta mateixa condició és necessària en l'aplicació de l'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió,.

D'altra banda, l'addició d'IDU a les cèl·lules que formen la monocapa durant el període de creixement, també produeix per al mètode de doble capa, l'augment de recuperació viral esperat, descrit ja per als altres mètodes. Amb l'addició d'IDU al cultiu, els recomptes d'enterovirus aplicant el mètode de doble capa queden multiplicats per un factor d'entre 1,5 i 2.

**Taula 4.3.1.1.1.1.** Comparació dels valors obtinguts en el recompte de diferents enterovirus utilitzant la línia BGM emprant diferents mètodes de quantificació. Valors mitjans dels coeficients de recomptes entre els diferents mètodes especificats (desv. estàndard) corresponents al nombre de rèpliques experimentals indicat en cada cas com a n.

Mètodes	Poliovirus 1 (Sabin)	Coxsackievirus B5	Coxsackievirus B4	Echovirus 6	Echovirus (Patró 1)
Viraden versus Monocapa	3,19 (1,49) n=7	5,49 (1,6) n=25	7,11 (3,72) n=20	6,65 (2,30) n=7	1,85 (0,39) n=4
Doble capa versus Monocapa	12,12 (6,33) n=23	8,80 (2,47) n=6	8,75 (2,03) n=20	15,22 (4,84) n=7	2,54 (0,28) n=4
Doble capa versus Viraden	3,34 (0,9) n=19	2,19 (0,33) n=16	1,29 (0,12) n=9	2,25 (0,56) n=17	2,19 (1,05) n=14
Cèl·lules en suspensió versus monocapa	2,1 (0,64) n=22	nd	nd	nd	nd
Doble capa <sup>a</sup> 37°C versus Doble capa	1,04 (0,27) n=7	0,96 (0,17) n=6	nd	0,92 (0,12) n=7	0,48 (0,15) n=4
Doble capa + IDU <sup>b</sup> versus Doble capa	1,6 (0,29) n=6	2,22 (0,64) n=6	nd	2,01 (0,69) n=6	1,38 (0,67) n=4

<sup>a</sup> Mètode de doble capa modificat per incubació de la barreja de suspensió cel·lular i suspensió viral a 37°C en agitació durant 30 minuts.

<sup>b</sup> Mètode de doble capa modificat per addició d'IDU a les cèl·lules BGM en creixement a la monocapa.

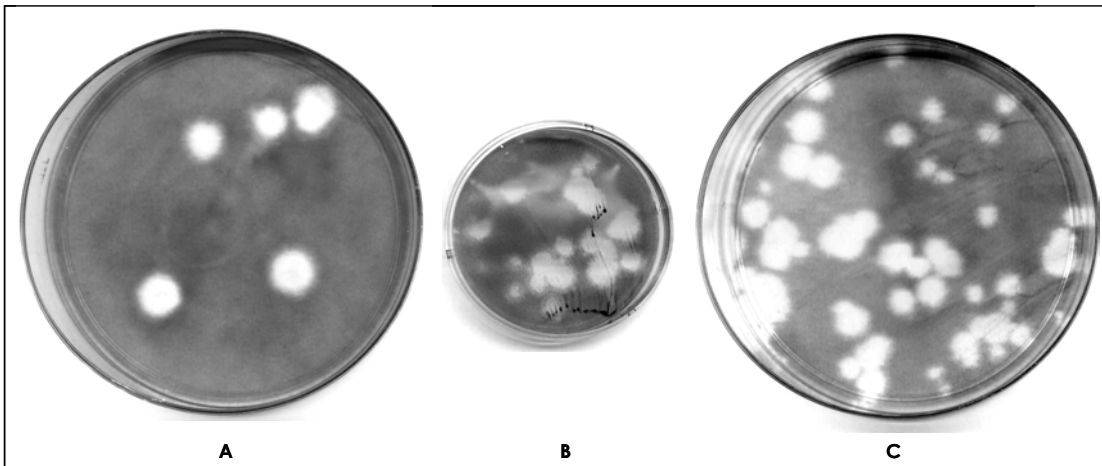
nd: no determinat

El mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió presenta recuperacions significativament superiors (*Student's Test*,  $P < 0,05$ ) de poliovirus 1 (Sabin) que el mètode de monocapa. Tot i això, els resultats que s'obtenen són inferiors als que obtenia Papageorgiou (2000) en estudis de comparació de mètodes on titulava la mateixa soca de poliovirus 1 (Sabin) sobre BGM emprant aquests dos mètodes de quantificació

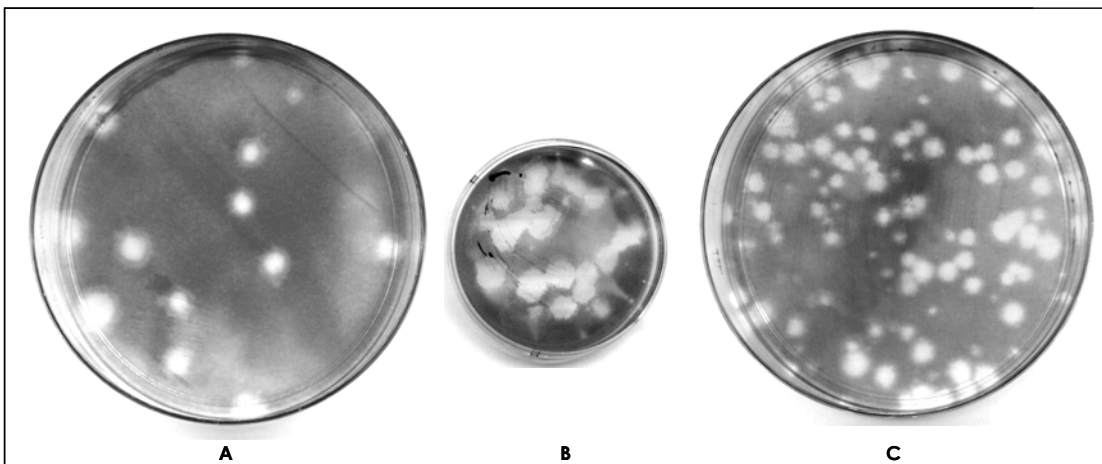
i diferents variants del mètode Viraden. També són inferiors als increments de 4,6 i 5,3 descrits a la bibliografia per a poliovirus 1. Com ja s'ha comentat anteriorment, les clapes amb el mètode d'assaig amb cèl·lules en suspensió són difícils d'identificar. Aquest fet potser explicaria els recomptes inferiors en el nostre cas. A més de la dificultat per a la visualització de les clapes i la gran subjectivitat en la valoració dels resultats que aquest fet comporta, un dels inconvenients d'aquest mètode és la gran quantitat de cèl·lules que requereix per a la seva realització. Calen totes les cèl·lules d'un flascó de 175 cm<sup>2</sup> amb monocapa confluent per l'assaig en una placa de Petri de 90 mm de diàmetre. A més, val a dir que, a mida que va passant el temps post infecció, les clapes són més grans, es produeix solapament i incrementa la dificultat de diferenciar entre cèl·lules vives i mortes per contrast amb el colorant roig neutre. Si s'hi afegeix que, en el nostre cas, l'increment en el recompte de poliovirus 1 (Sabin) és inferior a l'obtingut emprant els mètodes Viraden i de doble capa, descartem completament la utilització d'aquest mètode per a les valoracions posteriors de virus en mostres ambientals.

D'altra banda, si es comparen els increments en els recomptes de poliovirus 1 (Sabin) respecte al mètode de monocapa, utilitzant els mètodes de doble capa (12,1) o d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió (2,1), el mètode de doble capa es mostra clarament més eficient que el mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió, en aquest cas.

Les figures 4.3.1.1.1 i 4.3.1.1.2 mostren alguns exemples de com s'observen les plaques de cultiu quan s'apliquen els diferents mètodes de quantificació. Corresponen a plaques de cultiu amb infeccions sobre cèl·lules BGM emprant els mètodes de monocapa, Viraden i de doble capa. S'observa la diferent densitat de clapes per als tres mètodes, especialment evident quan es comparen els mètodes de monocapa i de doble capa.



**Figura 4.3.1.1.1.1.** Clapes obtingudes a partir de la mateixa suspensió viral d'echovirus 6 utilitzant tres mètodes de quantificació diferents; el mètode de monocapa (A), el mètode Viraden (B) i el mètode de doble capa (C).



**Figura 4.3.1.1.1.2.** Clapes obtingudes a partir de la mateixa suspensió viral de coxsackievirus B5 utilitzant tres mètodes de quantificació diferents; el mètode de monocapa (A), el mètode Viraden (B) i el mètode de doble capa (C).

#### 4.3.1.1.2 Combinació de línies cel·lulars aplicant els mètodes Viraden i de doble capa.

A la taula 4.3.1.1.2.1 es mostren els resultats corresponents als experiments de comparació dels mètodes Viraden i de doble capa emprant dues línies cel·lulars diferents per a la formació de la capa superior. La monocapa es preparà en tots els casos amb la línia BGM mentre que la capa superior corresponia a cèl·lules BGM o CaCo-2 segons s'indica. Aquests resultats indiquen que les cèl·lules BGM permeten una

major recuperació dels 4 virus assajats, si es comparen amb les cèl·lules de la línia CaCo-2 emprades. Aquest fet es produeix independentment del mètode de quantificació utilitzat i estaria en contradicció amb observacions posteriors realitzades en aquest mateix treball de tesi, en les que, quan es comparen diferents línies cel·lulars per a l'enumeració i aïllament d'enterovirus presents en diferents tipus de mostres ambientals, la línia CaCo-2 presenta major eficiència. Una possible explicació per a aquest fet seria que les suspensions de cultius purs de virus utilitzades en l'experiment, es van obtenir totes a partir d'infeccions sobre la línia BGM. Potser una infecció de la línia CaCo-2 abans de l'experiment en l'obtenció de les suspensions virals, hauria proporcionat uns resultats diferents.

**Taula 4.3.1.1.2.1.** *Relació entre els diferents mètodes de quantificació d'enterovirus emprant diferents línies cel·lulars. Els mètodes són Viraden i doble capa utilitzant la línia BGM en la preparació de la monocapa i les línies BGM i CaCo-2 per a la preparació de la suspensió cel·lular segons s'indica. Valors mitjans de coeficients (desviació estàndard) corresponents a 10 rèpliques en cada cas.*

	<b>Poliovirus 1 (Sabin)</b>	<b>Coxsackievirus B5</b>	<b>Echovirus 6</b>	<b>Echovirus (Patró 1)</b>
Viraden-BGM				
<i>versus</i>	1,28 (0,19)	1,87 (0,51)	3,51 (1,11)	1,16 (0,09)
Viraden-CaCo-2				
Doble capa-BGM				
<i>versus</i>	2,75 (0,28)	5,24 (0,64)	6,28 (1,17)	20,99 (10,31)
Doble capa-CaCo-2				
Doble capa-CaCo-2				
<i>versus</i>	1,42 (0,23)	1,05 (0,23)	1,27 (0,52)	0,12 (0,05)
Viraden-CaCo-2				

### 4.3.1.2 Suspensions de virus obtingudes de mostres ambientals

#### 4.3.1.2.1 Aigua residual bruta

##### 4.3.1.2.1.1 Efecte dels dies d'incubació post-infecció

La taula 4.3.1.2.1.1.1 mostra els resultats corresponents a la recuperació de virus en aigua residual en funció dels dies post-infecció. L'increment en el recompte de virus en aigua residual quan es mantenen les plaques 4 dies després de la infecció respecte a si només són 3, és de 2,7 de mitjana. Quan les mostres presenten problemes de citotoxicitat generada per diferents substàncies, potser cal una lectura avançada de les plaques. En altres casos, sempre que sigui possible, es recomanaria allargar el període post-infecció ja que es demostra una major recuperació de virus a partir de mostres ambientals com més llarg sigui aquest període. Resultats puntuals obtinguts amb períodes d'incubació post-infecció de 5 dies (no mostrats) així ho indiquen. Cal però, trobar un consens entre la major recuperació de virus i el deteriorament del cultiu cel·lular que provoca la potencial pèrdua de resultats.

**Taula 4.3.1.2.1.1.1.** Efecte dels dies d'incubació post-infecció en la recuperació d'enterovirus a partir d'aigua residual bruta independentment del mètode de quantificació utilitzat.

	<b>3 dies</b>	<b>4 dies</b>	<b>Relació de nombre d'ufp als 4 dies versus als 3 dies<sup>a</sup></b>
Nombre de mostres	32	32	13 <sup>b</sup>
% positivitats	44	72	
		Mitjana	<b>2,7</b>
		Desv. Est.	1,7

<sup>a</sup> Relació calculada a partir de les mostres amb resultats positius als 3 i als 4 dies.

<sup>b</sup> Nombre de mostres amb resultats positius als 3 i als 4 dies de les quals es pot calcular la relació (nombre ufp als 4 dies versus nombre d'ufp als 3 dies).



#### 4.3.1.2.1.2 Comparació de mètodes de quantificació de virus en suspensions virals obtingudes a partir d'aigua residual bruta

Els coeficients entre els valors d'enterovirus obtinguts amb els diferents mètodes es calcularen en aquells casos en que el resultat d'ufp de virus per litre d'aigua residual era un valor positiu quantificable per ambdós mètodes a comparar. Els resultats (Taula 4.3.1.2.1.2.1) mostren com, independentment de la línia cel·lular utilitzada en la capa superior, s'obtenen majors recuperacions de virus cultivables a partir d'aigua residual bruta quan s'utilitza el mètode de doble capa respecte als mètodes Viraden i de monocapa. Pel que fa a la quantificació de virus en aigua residual bruta amb la línia cel·lular BGM, emprant els diferents mètodes, s'observen majors recuperacions de virus cultivables quan s'utilitzen els mètodes de doble capa i Viraden respecte al mètode de monocapa (Taula 4.3.1.2.1.2.1) amb diferències estadísticament significatives (ANOVA,  $P < 0,01$ ). I de nou, el mètode de doble capa ofereix major recuperació de virus cultivables en aigua residual que el mètode Viraden (ANOVA,  $P < 0,01$ ). Així, la recuperació d'aquests mètodes de virus cultivables en aigua residual segueix la tendència ja indicada per a les suspensions virals de cultius purs: doble capa > Viraden > monocapa.

**Taula 4.3.1.2.1.2.1.** Relació entre els valors d'enterovirus en aigua residual bruta detectats emprant els diferents mètodes de quantificació en funció de la línia cel·lular utilitzada. Monocapa (MC), Viraden (VIR) i doble capa (DC).

	BGM			CaCo-2	PLC/PRF/5
	VIR versus MC	DC versus MC	DC versus VIR	DC versus VIR	DC versus VIR
<b>Mitjana</b>	2,5	7,7	4,5	5,8	4,6
<b>Desv. Est.</b>	1,9	4,0	2,8	4,4	4,4
<b>n</b>	23	9	17	13	9
<b>Coefficient<sup>a</sup> &gt; 1</b>	18	9	17	13	8

<sup>a</sup> Nombre de coeficients amb resultat superior a la unitat

Les desviacions estàndard resulten elevades pel fet de tractar-se de mostres ambientals on hi ha pocs virus i poca homogeneïtat pel que fa al nombre d'enterovirus. El volum total de mostra analitzada depenia del mètode de quantificació utilitzat, essent de 22 mL per al mètode Viraden i de 15 mL per als mètodes de monocapa i de doble capa, volums relativament petits de mostra.

Quan es comparen els diferents mètodes de quantificació d'enterovirus en funció de la línia cel·lular utilitzada, es realitzen diferents anàlisi i només un percentatge determinat dóna valors quantificables (o positius). Aquests resultats es mostren a la taula 4.3.1.2.1.2.2. Els majors percentatges de positivitat s'obtenen de nou quan s'aplica el mètode de doble capa per a la determinació d'enterovirus en aigua residual. Pel que fa a les línies cel·lulars, la línia CaCo-2 és la que permet la detecció d'enterovirus en un major nombre de mostres.

**Taula 4.3.1.2.1.2.2.** Percentatge d'anàlisi que resulten en valor de recompte d'enterovirus positiu (quantificable) amb els volums analitzats, utilitzant les diferents línies cel·lulars en les mateixes mostres d'aigua residual bruta.

	BGM			CaCo-2		PLC/PRF/5	
	Monocapa	Viraden	Doble capa	Viraden	Doble capa	Viraden	Doble capa
<b>Nombre total d'anàlisi</b>	28	26	26	19	21	20	18
<b>% positius</b>	32	73	77	89	90	55	72

4.3.1.2.1.3 Efecte de l'addició d'IDU al cultiu en l'enumeració d'enterovirus en aigua residual bruta

Els resultats corresponents a la valoració de l'efecte de l'addició d'IDU al cultiu pel que fa a l'increment de recuperació d'enterovirus a partir d'aigua residual bruta es recullen a la taula 4.3.1.2.1.3.1. Aquests es presenten en funció de la línia cel·lular emprada en l'enumeració de virus independentment del mètode de quantificació utilitzat (monocapa, Viraden o doble capa). Els percentatges de positivitat de detecció d'enterovirus a les diferents mostres augmenten amb l'addició d'IDU. I a més, incrementa el nombre de virus que s'aïllen d'aquestes en un factor de 2

aproximadament, per a totes les línies cel·lulars utilitzades, essent la diferència estadísticament significativa ( $P < 0,05$ )

Aquests resultats pel que fa a l'increment del recompte de virus amb addició d'IDU al cultiu, coincideixen amb els realitzats amb suspensions de cultius purs de virus i, amb els descrits a la bibliografia.

**Taula 4.3.1.2.1.3.1.** Efecte de l'addició d'IDU al cultiu en l'enumeració d'enterovirus en aigua residual bruta. Resultats en funció de la línia cel·lular emprada independentment del mètode utilitzat.

	BGM		CaCo-2		PLC/PRF/5	
	sense IDU	amb IDU	sense IDU	amb IDU	sense IDU	amb IDU
<b>n</b>	21	20	15	14	12	12
<b>% positivitat</b>	62	80	93	100	67	75
<b>Mitjana del coeficient</b>	2,3		2,3		1,9	
<b>Desv. Est.</b>	1,2		1,5		0,8	

#### 4.3.1.2.1.4 Efecte de la combinació de diferents línies cel·lulars en l'enumeració d'enterovirus en aigua residual bruta

Utilitzant els mètodes Viraden i de doble capa es pot combinar l'ús de diferents línies cel·lulars. La taula 4.3.1.2.1.4.1 presenta els resultats corresponents a la comparació de la utilització de diferents línies cel·lulars per a la preparació de la suspensió cel·lular que formarà la capa superior, necessària en l'aplicació dels dos mètodes citats abans. La línia cel·lular emprada en la formació de la monocapa fou de nou, en tots els casos, la línia BGM.

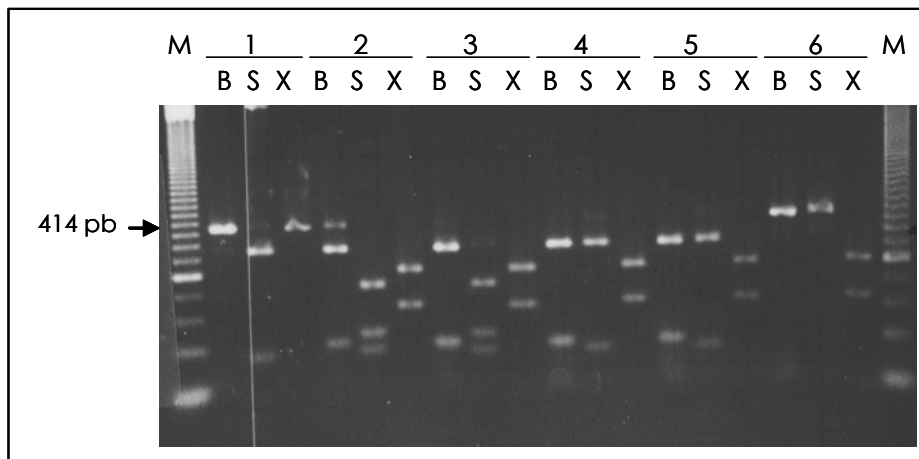
Els coeficients es calcularen quan el resultat d'ufp de virus per litre d'aigua residual era un valor positiu quantificable en ambdós casos a comparar, per les dues línies cel·lulars en qüestió. Quan es comparen les diferents línies cel·lulars independentment del mètode de quantificació utilitzat, d'un total de 59 anàlisi amb la línia cel·lular BGM, un 73% eren positives; d'un total de 49 anàlisi amb la línia cel·lular CaCo-2, un 86% eren positives i, d'un total de 45 anàlisi amb la línia cel·lular PLC/PRF/5, un 64% eren positives.

**Taula 4.3.1.2.1.4.1.** Relació entre els valors d'ufp detectats amb les diferents línies cel·lulars emprades per a la titulació d'enterovirus en aigua residual bruta independentment del mètode de quantificació utilitzat.

	CaCo-2 versus BGM	PLC/PRF/5 versus BGM	CaCo-2 versus PLC/PRF/5
n	30	28	28
Mitjana	3,35	1,17	3,63
Desv. Est.	2,29	0,58	1,79

4.3.1.2.1.5 Efecte de la combinació de diferents línies cel·lulars en la identitat dels enterovirus aïllats d'aigua residual bruta

A més de l'enumeració d'enterovirus, es va realitzar un estudi d'identificació dels aïllaments virals procedents d'aigua residual bruta, obtinguts amb les diferents línies cel·lulars. Es volia determinar si les diferències, a més de quantitatives, afectaven a la identitat dels virus aïllats en aquest tipus de mostra. Es realitzà la identificació per RT-PCR i RFLP dels diferents aïllaments virals i s'obtingueren resultats com els que es mostren a la Figura 4.3.1.2.1.5.1.



**Figura 4.3.1.2.1.5.1.** Gel d'electroforesi d'agarosa 3% que mostra diferents patrons RFLP d'enterovirus aïllats de mostres d'aigua residual. B: Bgl I; S: Sty I; X: Xmn I. M: marcador de pes molecular (50 pb ladder). **1:** poliovirus 1. **2 i 3:** echovirus 30. **4 i 5:** echovirus 6. **6:** coxsackievirus B5.

Els patrons que s'obtenien a partir dels aïllaments de virus d'aigua residual, juntament amb els que provenien de mostres d'aigua de riu i de mar, i que no corresponien amb els patrons RFLP dels enterovirus ben definits, obtinguts a partir de les seqüències nucleotídiques del banc de dades NCBI, s'anomenaren Patró 1, Patró 7, Patró 9, Patró 10 i Patró 11. Els resultats dels patrons RFLP per a cadascun d'ells es mostren a la taula 4.3.1.2.1.5.1.

Per tal d'intentar una identificació es procedí amb la caracterització per seqüenciació del fragment del genoma viral amplificat per RT-PCR i, en dos casos, es podria dir que es va trobar l'enterovirus corresponent. Aquests són el Patró 1, el qual correspondria amb echovirus 25 amb 92% d'homologia i el Patró 7, el qual correspondria amb echovirus 19 amb 94% homologia. A les taules de resultats es segueixen indicant però com a Patró X, considerant només el patró RFLP.

Els resultats de les identificacions per RFLP dels diferents aïllaments d'enterovirus a partir d'aigua residual bruta, en funció de la línia cel·lular utilitzada a la capa superior, es recullen a la taula 4.3.1.2.1.5.2. Aquests resultats mostren que la línia CaCo-2 permet l'aïllament d'un major nombre d'enterovirus diferents, respecte les altres dues línies cel·lulars utilitzades, BGM i PLC/PRF/5.

**Taula 4.3.1.2.1.5.1.** Patrons RFLP obtinguts d'aïllaments virals que no coincideixen amb patrons d'enterovirus teòrics obtinguts a partir de les seqüències dipositades al banc de dades NCBI.

	<b>Fragments (pb) que s'obtenen amb cadascuna de les endonucleases</b>		
	<b>Bgl I</b>	<b>Sly I</b>	<b>Xmn I</b>
<b>Patró 1</b>	320	200	184
	94	144	170
		70	60
<b>Patró 7</b>	414	320	249
		94	165
<b>Patró 9</b>	250	414	204
	164		120
			90
<b>Patró 10</b>	160	294	251
	150	120	163
	110		
<b>Patró 11</b>	274	324	414
	140	90	

La identificació d'enterovirus pot realitzar-se utilitzant diferents mètodes. Depenent del mètode escollit, s'obtenen resultats amb més o menys èxit en la identificació dels diferents enterovirus. A partir de les dades obtingudes i de les observacions a diferents treballs es pot afirmar que la identificació d'enterovirus és un tema no del tot resolt actualment. Manayani et al (2002) comparen la identificació de 28 aïllaments d'enterovirus utilitzant els anticossos neutralitzants de Lim-Benyesh-Melnick (LBM), l'anàlisi per PCR-RFLP i per seqüenciació indicant que aquesta última apareix com una bona alternativa per al tipatge LBM, mentre que l'anàlisi per PCR-RFLP no sembla adient. Per a l'estudi es basen en Kuan (1997) per a la identificació per RFLP. I els patrons que s'obtenen en aquest últim estudi no coincideixen en tots els casos amb els que s'obtenen fent la digestió a partir de les seqüències d'enterovirus dipositades al banc de dades (GeneBank) i en algun cas són incomplets. És per aquest fet que creiem que els estudis d'identificació d'enterovirus basats en els patrons RFLP de Kuan (1997) no es poden considerar del tot correctes. En el nostre cas, els patrons que s'obtenen no coincideixen amb gairebé cap dels que obtenen en l'estudi citat. En canvi, considerem que la identificació per RT-PCR i RFLP tal com s'ha realitzat en aquest treball de tesi és una eina útil que proporciona informació sobre la presència d'enterovirus a l'ambient, tot i que en alguns casos els patrons RFLP tampoc coincideixen amb els del banc de dades i caldrien estudis més enllà per conèixer realment els virus presents en aigua residual i altres tipus de mostres ambientals (veure Capítol 5).

Pel que fa a la identificació dels enterovirus a partir de les seqüències del genoma ARN, en el nostre cas han estat basades en l'amplificació i caracterització de la regió 5'NTR, considerada una regió estable. Potser per aquest fet no s'ha aconseguit un major percentatge d'homologia de seqüències amb les anàlisi realitzades. Amb els resultats es poden atribuir noms d'enterovirus als aïllaments corresponents als patrons RFLP 1 i 7 del treball, però amb la regió analitzada no es pot la certesa que ho siguin. D'altra banda, en el cas de la identificació d'enterovirus per seqüenciació, les dificultats poden venir provocades per les elevades taxes de mutació i pel fet que aquests virus presenten el fenomen de la recombinació viral. Hi ha evidències que es produeix recombinació entre els diferents enterovirus (Santti et al, 1999). Es localitzen punts de recombinació situats a totes les regions del genoma excepte a la regió que codifica per les proteïnes de la càpside. La recombinació s'entén com un mecanisme significatiu i relativament freqüent en l'evolució dels enterovirus. A més de la recombinació intertípica es produeixen fenòmens de recombinació intratípica, amb

una freqüència aproximada en el cas de poliovirus del 15%. La recombinació intertípica es considera que té una freqüència 100 vegades inferior (Santti et al, 1999).

**Taula 4.3.1.2.1.5.2.** Percentatges d'enterovirus en aigua residual en funció de la línia cel·lular utilitzada en l'aïllament d'aquests (56 aïllaments amb cadascuna distribuïts equitativament en 17 mostres recollides regularment dins el període d'un any).

Enterovirus	Percentatge d'enterovirus		
	BGM	CaCo-2	PLC/PRF/5
Patró 1	19,6	4	
Patró 9		2	
Poliovirus 1	14,3	8	7,1
Poliovirus 2-Echovirus 7		6	7,1
Poliovirus 3	1,8		1,8
Coxsackievirus B1			3,6
Coxsackievirus B2-B3, Echovirus 1, Echovirus 5	1,8	8,9	
Coxsackievirus B4 - Echovirus 4		2	
Coxsackievirus B5 (Faulkner)			5,4
Coxsackievirus B6	1,8		
Echovirus 6	60,7	36	37,5
Echovirus 11 (Metcalf)		26	21,4
Echovirus 12		2	
Echovirus 30		4	16,1
Tipus diferents d'enterovirus	6	10	8

Pel que fa a la capacitat de les diferents línies cel·lulars per a l'aïllament dels enterovirus, diversos estudis consideren que la línia BGM mostra bona sensibilitat per a la detecció de coxsackievirus B però relativament poca per a la detecció d'echovirus (Chonmaitree et al, 1988; Dagan i Menegus, 1986). En canvi, en el nostre estudi la línia BGM és la que detecta un major percentatge d'echovirus 6 (el virus aïllat majoritàriament en aquest tipus de mostres d'aigua residual bruta) en contraposició, doncs, amb les dades publicades. És sabut que la sensibilitat de les cèl·lules varia depenent de si es titulen suspensions de cultius purs de virus o si es titulen mostres d'aigua residual (Dahling i Wright, 1986b).

A partir dels resultats dels diferents patrons de RFLP obtinguts amb les diferents línies cel·lulars, es calculà l'índex de diversitat de Simpson. L'índex de diversitat (Di) de

Simpson és un paràmetre que, aplicat a poblacions, indica el grau de diversitat d'aquestes. Com més alt és el valor de  $D_i$ , més diversitat presenta la població. En el nostre cas, les poblacions foren el conjunt de virus aïllats amb cadascuna de les línies cel·lulars a partir de diferents mostres d'aigua residual bruta. Els resultats (Taula 4.3.1.2.1.5.3) mostren que l'índex de diversitat de Simpson és més alt quan s'utilitzen les cèl·lules CaCo-2. Per tant, es podria pensar que les cèl·lules que permeten una major diversitat en els aïllaments virals, les que aïllen més virus diferents, són les cèl·lules CaCo-2, seguides de les PLC/PRF/5 i finalment les de la línia BGM. Aquest fet, afegit a diverses observacions anteriors de diferents autors, indica que cal escollir acuradament la línia o línies cel·lulars a utilitzar en un assaig viral, per evitar un possible risc de selecció de virus que dificulti l'obtenció del resultat final correcte i s'obtingui, una visió esbiaixada de la realitat.

**Taula 4.3.1.2.1.5.3.** Índex de diversitat de Simpson per a les diferents línies cel·lulars pel que fa a la detecció d'enterovirus en aigua residual bruta.

Línia cel·lular	Índex de diversitat ( $D_i$ ) de Simpson
BGM	0,56
CaCo-2	0,82
PLC/PRF/5	0,72

#### 4.3.1.2.1.6 Enumeració d'enterovirus en aigua residual utilitzant el mètode de NMP

Un dels mètodes que es descriuen com a més sensibles per a la detecció d'enterovirus és el mètode de Nombre Més Probable d'Unitats Citopàtiques (NMPUC). Els resultats de la taula 4.3.1.2.1.6.1 mostren la comparació d'aquest mètode amb els mètodes Viraden i de doble capa pel que fa a la recuperació d'enterovirus a partir d'aigua residual bruta. El rendiment del mètode de NMPUC es situa, per a la majoria de mostres analitzades, entre el mètode Viraden, i el mètode de doble capa. A partir de les anàlisi estadístiques només es detecten diferències significatives (ANOVA,  $P < 0,05$ ) quan es comparen els mètodes de quantificació de Viraden i de doble capa. No s'observen en canvi, diferències significatives de cap d'aquests dos amb el mètode de NMPUC, pel que fa a la determinació de virus en aigua residual bruta.



**Taula 4.3.1.2.1.6.1.** Enumeració d'enterovirus cultivables en aigua residual bruta (ufp per 100 mL) emprant la línia cel·lular BGM. Comparació dels mètodes Viraden, doble capa i càlcul de NMP.

Mostra	Viraden	Doble capa	NMP
1	43,3	570	<43
2	168,8	950	<43
3	83,3	150	132
4	25	60	43
5	32,1	166,7	87
6	10	16,7	<43
7	13,7	71,4	273
8	31,8	167	87
9	200	200	132
10	36,4	150	132
<b>Mitjana</b>	<b>64,4</b>	<b>250,2</b>	<b>101,5</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>66,7</b>	<b>288,9</b>	<b>71,7</b>

#### 4.3.1.2.1.7 Detecció d'enterovirus en aigua residual bruta per RT-PCR

A més de les determinacions quantitatives d'enterovirus en aigua residual, es feren valoracions de detecció d'enterovirus per RT-PCR i PCR imbricada. Els resultats d'aquestes determinacions (Taula 4.3.1.2.1.7.1) es comparen amb el nombre d'ufp de cada mostra, obtingudes aplicant el mètode de doble capa.

No s'observa una relació aparent pel que fa a la detecció molecular i quantitativa de virus. No necessàriament les mostres amb valors més alts de nombre de virus són les que produeixen un resultat positiu per RT-PCR.

Considerant els resultats del nombre de mostres positives de detecció d'enterovirus per RT-PCR, s'obté resultat positiu pel que fa a presència d'ARN d'enterovirus en un 35% dels casos. En el nostre cas, s'analitzen volums de 200 µL de mostra inicials i el resultat de la RT-PCR equival a la presència d'ARN viral en 40 µL d'aigua residual bruta. Altres estudis, emprant altres mètodes de detecció d'enterovirus per RT-PCR en aigua residual de diferents orígens obtenen percentatges variables pel que fa al nombre de mostres positives per PCR imbricada. Algun exemple; l'anàlisi de volums de 50 µL

d'aigua residual produeix 8 mostres positives de 13 (61%) (Schvoerer et al, 2001). D'altres analitzen 100 mL i obtenen un 50% de mostres positives per a presència d'enterovirus (Vantarakis i Papapetropoulou, 1999). En el nostre entorn, percentatges del 40% de positivitat en volums equivalents de 2 mL (Formiga, 2003) i 4 mL (Pina et al, 1998).

El càlcul del percentatge de mostres positives de detecció d'enterovirus cultivables (infecciosos) pel mètode de doble capa, produeix un 88% de positivitat per a les mateixes mostres de les que es realitzà l'anàlisi molecular. Val a dir que un dels avantatges de les tècniques de cultiu cel·lular és la possibilitat de detecció de virus diferents, incloent-hi virus que no s'esperen a les mostres en el moment de la infecció. Aquest fet no pot aconseguir-se amb tècniques moleculars, les quals van dirigides a la detecció concreta d'un tipus de virus.

Amb la mitjana dels valors d'enterovirus cultivables per litre, es poden estimar quantes ufp (virus infecciosos) s'esperen en els 40 µL d'aigua residual bruta analitzats mitjançant tècniques moleculars. El resultat és 0,1 ufp en 40 µL d'aigua residual. Si la tècnica de PCR imbricada permet detectar una molècula d'ARN, la diferència entre molècules d'ARN detectables i ufp quantificades pel mètode de doble capa en aigua residual bruta, és en aquest cas d'un logaritme decimal. La quantificació pel mètode de doble capa permet acostar els resultats de les tècniques de detecció d'enterovirus per cultiu cel·lular en mostres d'aigua residual bruta a les tècniques moleculars de RT-PCR.

Es pot realitzar una segona aproximació que consideri els resultats positius i negatius de les anàlisi moleculars. A partir dels resultats i aplicant la fórmula de Thomas (1942) per calcular el NMP quan s'infecten rèpliques d'un cultiu cel·lular amb una única dilució, es pot estimar el NMP de molècules ARN en 40 µL d'aigua residual bruta a les que equivalen els resultats per RT-PCR i PCR imbricada obtinguts. Aquest valor és de 0,44 NMP en 40 µL d'aigua residual bruta, valor més proper encara al de 0,1 ufp en 40 µL calculat a partir dels resultats de quantificació de virus cultivables (infecciosos) pel mètode de doble capa.

**Taula 4.3.1.2.1.7.1.** Valors d'enterovirus cultivables i detecció d'ARN d'enterovirus (cebadors Ent1 i Ent2) en mostres d'aigua residual bruta.

Mostra	Enterovirus	
	RT-PCR i PCR imbricada	Mètode de doble capa (ufp litre <sup>-1</sup> )
1	-	1000
2	-	<500
3	+	1000
4	+	1500
5	+	<300
6	+	3333
7	+	1000
8	-	667
9	-	3750
10	-	2000
11	-	2750
12	-	1667
13	+	5700
14	-	9500
15	-	1500
16	-	600
17	-	1667

#### 4.3.1.2.2 Aigua residual tractada

Les mostres s'analitzaren per tal de poder realitzar la comparació dels recomptes d'enterovirus emprant diferents mètodes de quantificació (Viraden i doble capa) i diferents línies cel·lulars (BGM, CaCo-2 i PLC7PRF/5). Els resultats obtinguts es mostren a la taula 4.3.1.2.2.1.

Considerant els resultats, no es detecten diferències significatives quan es comparen els valors d'enterovirus en funció de la línia cel·lular utilitzada, independentment del mètode de quantificació utilitzat (ANOVA,  $P > 0,05$ ). I, de la mateixa manera, no es detecten diferències significatives (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ) pel que fa a la recuperació d'enterovirus en funció del mètode de quantificació utilitzat (Viraden o doble capa),

sense considerar la línia cel·lular utilitzada. Els valors més baixos d'enterovirus per litre en mostres d'aigua residual tractada respecte les mostres d'aigua residual bruta, podrien explicar el fet que, les diferències observades en el cas de l'aigua residual no es traslladin al cas de l'efluent secundari. Tot i això, amb el mètode de doble capa es comptabilitzen més mostres en les que es detecten enterovirus, major percentatge de positivitat i, els nombres d'ufp per litre són lleugerament superiors (amb alguna excepció) respecte als valors que s'obtenen amb el mètode Viraden, per a les tres línies cel·lulars utilitzades.

En aquest cas, per al mètode de doble capa no s'obtenen resultats superiors utilitzant cèl·lules de la línia CaCo-2 a la capa superior respecte a la utilització de cèl·lules BGM, al contrari que per a les mostres d'aigua residual bruta. Potser aquest fet es deu a la reduïda mida mostral (6 mostres) o al fet que realment les cèl·lules BGM presenten major susceptibilitat per als virus presents en aquest tipus de mostra. Tot i això, s'observen desviacions estàndards elevades i manca de diferències estadísticament significatives, causades probablement, pel fet de tractar-se de mostres amb menor nombre de virus que l'aigua residual bruta.

**Taula 4.3.1.2.2.1.** Enterovirus (ufp·L<sup>-1</sup>) en efluent secundari, emprant els mètodes Viraden (VIR) i de doble capa (DC) i les línies cel·lulars BGM, CaCo-2 i PLC/PRF/5.

	BGM		CaCo-2		PLC/PRF/5	
	VIR	DC	VIR	DC	VIR	DC
<b>Mitjana</b>	43	137,5	47,8	100	20	66,5
<b>Desv. Est.</b>	20,8	118,1	22,5	50	-	23,3
<b>Màxim</b>	75	300	60	150	20	83
<b>Mínim</b>	<14	50	14	50	<14	50
<b>n</b>	10	10	6	6	6	6
<b>% mostres positives</b>	55,6	88,9	100	50	25	50

#### 4.3.1.2.3 Aigua de riu

##### 4.3.1.2.3.1 Comparació de mètodes de quantificació d'enterovirus en concentrats virals

El baix nombre de virus en aigua de riu, fa necessària l'aplicació de mètodes de concentració primària i secundària. L'etapa de detecció, es resol aplicant el mètode de quantificació per monocapa. Amb el procediment de concentració d'aigües dels rius Ter i Llobregat emprat al laboratori, es comparen els mètodes de monocapa i de doble capa per a la quantificació d'enterovirus al concentrat final. Els resultats es recullen a la taula 4.3.1.2.3.1.1.

El mètode de doble capa es mostra significativament (*Student's T test*,  $P < 0,05$ ) més eficient que el mètode de monocapa per a la recuperació d'enterovirus en els concentrats d'aigua de riu. Amb el mètode de doble capa es detecten de mitjana 12,6 vegades més virus que amb el mètode de monocapa. Val a dir que, per al mètode de monocapa es titularen 20 mL de mostra en tots els casos, mentre que, quan s'aplicà el mètode de doble capa sovint no es disposava de 20 mL de mostra addicional i es realitzà l'enumeració d'enterovirus amb el volum de mostra disponible. Tot i això, quan s'enumeren els concentrats aplicant el mètode de monocapa s'obté un 21% de mostres positives pel que fa a presència d'enterovirus mentre que aquest percentatge s'eleva a 84% quan el mètode utilitzat és el de doble capa. A més, en un 63% de les mostres (12 de les 19) s'obtenen resultats de presència de partícules víriques infeccioses cultivables sobre BGM utilitzant el mètode de doble capa, quan el mètode de monocapa no és capaç de detectar-ne. El percentatge de mostres positives per a enterovirus cultivables en els concentrats d'aigua de riu quantificats pel mètode de doble capa, supera clarament els percentatges que s'obtenen al llarg dels anys en aquest mateix tipus de mostra enumerada per monocapa (Taula 4.3.1.2.3.1.2).

**Taula 4.3.1.2.3.1.1.** Enterovirus cultivables en concentrats d'aigua de riu emprant diferents mètodes de quantificació (ufp en 20 mL de concentrat) utilitzant la línia cel·lular BGM.

Mostra	Monocapa	Doble capa
1	0	<1,4
2	0	7,5
3	1	11,1
4	0	<2
5	0	3,3
6	0	1,4
7	0	7,5
8	0	2
9	0	4
10	0	27,5
11	0	<2,5
12	5	8
13	1	12,2
14	0	7,14
15	7	35
16	0	5
17	0	2
18	0	3
19	0	12
<b>Mitjana</b>	<b>0,7</b>	<b>9,3</b>
Desv. Est.	1,9	9,4

Amb els resultats es calcula el nombre d'enterovirus cultivables per litre d'aigua de riu obtenint-se valors mitjans de 0,09 ufp·L<sup>-1</sup> (mínim 0,025 i màxim 0,18) quantificant el concentrat pel mètode de monocapa i, valors mitjans de 0,2 ufp·L<sup>-1</sup> (mínim 0,025 i màxim 0,9) qual el mètode utilitzat és el de doble capa. Aquests valors poden comparar-se amb els que es troben a la bibliografia pel que fa a nombre d'enterovirus

cultivables en aquest mateix tram del riu Llobregat i, en els que s'han emprat els mateixos mètodes de concentració i quantificació per monocapa. Així, durant un any es detecten valors d'enterovirus cultivables que van de 0 a 0,93 ufp per 50 litres (Vidal et al, 1997). I valors mitjans de 0,01 ufp·L<sup>-1</sup> durant el període 1993-2003 (Taula 4.3.1.2.3.1.2)

Comparant els resultats obtinguts i presentats en aquest apartat del treball, pel que fa a la quantificació d'enterovirus, el mètode de doble capa ofereix una alternativa més òptima que el mètode de monocapa per a la quantificació de virus cultivables a partir de concentrats d'aigua de riu.

**Taula 4.3.1.2.3.1.2.** Enterovirus (ufp·L<sup>-1</sup>) en aigua del riu Llobregat al tram on es situa el punt de captació de l'ETAP Aigües Ter Llobregat al municipi d'Abrera. Dades corresponents al període 1993-2003 extretes dels informes anuals "Control virològic de les ETAPs del Ter i Llobregat" (ATLL, UB).

	Nombre de mostres anual	Percentatge positivitat (%)	Enterovirus (ufp L <sup>-1</sup> )
<b>Mitjana</b>	12	19,6	<b>0,01</b>
<b>Desv. Est.</b>		14,46	0,02
<b>Valor màxim</b>			0,2
<b>Valor mínim</b>			0

#### 4.3.1.2.3.2 Comparació de mètodes de concentració-enumeració d'enterovirus en aigua de riu

La comparació de mètodes de quantificació de virus en concentrats virals d'aigua de riu indicada en l'apartat anterior, produeix un major recompte de virus en aigua de riu quan el mètode utilitzat és el de doble capa. Les densitats d'enterovirus en l'aigua del riu Llobregat detectats pel mètode de doble capa (0,2 ufp·L<sup>-1</sup>) i els baixos rendiments en aigües tèrboles descrits per als mètodes de concentració primaris de virus utilitzats, feren pensar en la possibilitat de realitzar el recompte d'enterovirus cultivables en volums de mostra d'un litre, evitant el procediment de concentració primària per filtració amb suports electropositius. D'aquesta manera es compararen dos mètodes de concentració i enumeració d'enterovirus cultivables en mostres d'aigua de riu. Els resultats que s'obtingueren (taula 4.3.1.2.3.2.1) comparant el mètode Viraden i el mètode de concentració per flocculació orgànica seguit de quantificació

per doble capa, no mostren diferències estadísticament significatives (*Student's T test*,  $P > 0,05$ ). El mètode de concentració per floculació orgànica aplicat al laboratori per a volums de mostra de fins a 1 litre (Katzenelson et al, 1976) es considera un dels més eficients per a la recuperació de virus a partir de mostres de terbolesa variable. Els resultats de recuperació de virus cultivables obtinguts amb el mètode Viraden aplicat a aigua de riu són equivalents als resultats que s'obtenen amb el mètode de floculació orgànica. L'avantatge de la floculació orgànica és que no es veu limitada per la terbolesa de la mostra, mentre que aquest sí és un factor que afecta l'aplicabilitat del mètode Viraden.

Ambdós mètodes descrits serien aplicables a la determinació d'enterovirus en aigua de riu i ambdós presenten una major facilitat d'aplicació i un menor cost econòmic que el mètode tradicional de concentració primària, elució i concentració secundària. Encara que el volum de mostra d'aigua de riu hagués d'eleva-se fins als 5 o 10 litres de mostra crua, el mètode Viraden permetria una aproximació més ràpida, senzilla i econòmica per l'anàlisi de mostres de rius contaminats.

Però, quan la terbolesa de les mostres és elevada hi ha major dificultat en l'aplicació del mètode Viraden. Tot i la clarificació prèvia de la mostra crua per filtració a través de filtres de  $0,65 \mu\text{m}$  PVDF, al filtrat queden restes de sòlids en suspensió i/o dissolts que interfereixen en la lectura de les plaques fent que apareguin zones de citotoxicitat sobre el cultiu cel·lular emprat com a hoste. Aquesta interferència es suma al possible efecte de la matèria orgànica com a bloquejant dels llocs d'unió dels virus al filtre de membrana d'èsters de cel·lulosa.

Amb els valors mitjans d'enterovirus cultivables per litre d'aigua de riu de l'apartat anterior, es pot calcular l'eficiència del mètode de concentració primària. Si es prenen conjuntament els valors quantificables (positius) de virus en aigua de riu que s'obtenen emprant els mètodes Viraden i de floculació orgànica més doble capa, s'obtenen els següents percentatges de recuperació per concentració primària amb filtres electropositius: 5,6% (desv. est. 2,9) si el mètode de quantificació final és el de monocapa i, 12,5% (desv. est. 6,6) si el mètode de quantificació final és el de doble capa. Aquests percentatges corresponen doncs, a la recuperació de virus cultivables per concentració de 100 litres d'aigua de riu per filtres electropositius MK. Així, aplicant els mètodes Viraden o de floculació orgànica seguit de quantificació per doble capa, s'obtenen valors de virus cultivables per litre més propers als valors de contaminació real de les aigües de riu analitzades.



**Taula 4.3.1.2.3.2.1.** Enumeració de virus cultivables (ufp per litre) en aigua de riu emprant el mètode de concentració-enumeració Viraden i la concentració per floculació orgànica seguida de quantificació per doble capa.

Mostra	Terbolesa (NTU)	Viraden	Floculació orgànica + doble capa
1	430	0	0
2	-	0	1
3	30	1,5	0
4	1,2	0	0
5	0,6	0	0
6	15,3	0	9
7	18,5	1	1
8	22,4	3	2
9	25	2	1
10	26,1	4	2
<b>Mitjana</b>		<b>1,15</b>	<b>1,6</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>1,45</b>	<b>2,7</b>
<b>% positivitat</b>		<b>50</b>	<b>60</b>

Al riu Llobregat, emprant aquestes dues metodologies, s'obtenen resultats de valors d'enterovirus per litre que superen clarament als que obtenen Vidal et al (1997) i als que s'obtenen del programa de control virològic anual que es realitza en aquest mateix tram de riu que utilitzen mètodes de concentració per filtres electropositius (Taula 4.3.1.2.3.1.2). Així, aplicant una metodologia més senzilla, més ràpida i menys costosa es poden obtenir valoracions més acurades de la presència de virus cultivables per al riu i trams d'aquest estudiats.

#### 4.3.1.2.4 Aigua de mar

##### 4.3.1.2.4.1 Comparació de mètodes de concentració-enumeració d'enterovirus en aigua de mar

El control virològic en aigua de mar implica l'anàlisi de volums grans de mostra. La Directiva 76/160/CEE per a aigües de bany indica que ha de demostrar-se absència d'enterovirus en 10 litres d'aigua de mar. Així, es compararen tres metodologies per valorar la seva aplicabilitat per a la determinació d'enterovirus cultivables en aigua de mar. Els mètodes assajats foren, la concentració per pols de vidre amb quantificació del concentrat pels mètodes de monocapa i de doble capa i, la concentració per Viraden emprant filtres de 90 mm de diàmetre (Viraden – 90). Els resultats (Taula 4.3.1.2.4.1.1) mostren que, quan s'utilitza el mètode de concentració de virus per adsorció-elució a pols de vidre i el mètode de quantificació per monocapa, només 2 de les 10 mostres (20%) donen resultat positiu per a la presència d'enterovirus cultivables en aigua de mar. En el cas de l'enumeració utilitzant el mètode de doble capa a partir d'un eluat procedent del mateix sistema de concentració, aquest nombre incrementa a 5 mostres positives del total d'11 mostres analitzades (45%). Aquest fet del major recompte a partir de concentrats virals de mostres ambientals s'observa també en el cas dels concentrats d'aigua de riu, per tant, el mètode de quantificació de doble capa, es pot dir que, es mostra més eficient per a la recuperació d'enterovirus cultivables a partir de concentrats de mostres ambientals que es caracteritzen per tenir densitats de virus baixes.

Quan el mètode de concentració-enumeració utilitzat és el mètode Viraden, arriben a detectar-se virus en 8 de les 11 mostres (73%) d'aigua de mar a nivell de platja. Així doncs, amb aquest mètode s'obté el major percentatge de positivitat pel que fa a la presència d'enterovirus en aigua de mar, si es compara amb els altres dos mètodes utilitzats en l'estudi.

El mètode de concentració de virus en aigua de mar utilitzant pols de vidre com a suport s'havia utilitzat anteriorment per a l'anàlisi virològica de mostres del mateix entorn geogràfic amb notable èxit (Finance et al, 1982; Lucena et al, 1982; Lucena et al, 1985; Lucena et al, 1986). El mètode Viraden aplicant les membranes de 90 mm de diàmetre es considera doncs, com a un bon mètode per a la determinació d'enterovirus en aigua de mar.

**Taula 4.3.1.2.4.1.1.** Enumeració d'enterovirus cultivables (ufp per 10 litres) en aigua de mar a nivell de platja utilitzant diferents mètodes de concentració i quantificació.

<b>Data de la mostra</b>	<b>Pols de vidre + monocapa</b>	<b>Pols de vidre + doble capa</b>	<b>Viraden – 90*</b>
25/4/2002	-	4	10
13/5/2002	0	1	1
15/5/2002	0	0	1
22/5/2002	2	6	129
22/5/2002	4	26	187
5/6/2002	0	0	4
5/6/2002	0	0	5
12/6/2002	0	0	0
12/6/2002	0	0	0
3/7/2002	0	1	1
3/7/2002	0	0	0

\* Mètode Viraden aplicat amb filtres d'èsters de cel·lulosa de 90 mm de diàmetre.

#### 4.3.1.2.4.2 Comparació de línies cel·lulars.

Un cop escollit el mètode de concentració enumeració d'enterovirus en aigua de mar més eficient, es compararen dues línies cel·lulars, la línia BGM i la línia CaCo-2, per tal de determinar si es podia aconseguir més sensibilitat aplicant una o altra línia cel·lular a la capa superior. A l'afegir el factor de la línia cel·lular al mètode Viraden, els resultats (Taula 4.3.1.2.4.2.1) foren els següents; quan s'utilitzen cèl·lules de la línia BGM en la monocapa i a les cèl·lules que constitueixen la fracció de la capa superior, s'obtenen 4 de les 10 mostres (40%) amb resultat positiu. Quan s'utilitzen cèl·lules BGM a la monocapa i cèl·lules de la línia CaCo-2 a la capa superior, el nombre de mostres amb resultat positiu s'eleva a 6 (60%). Tot i les diferències, aquestes no són estadísticament significatives. Cal insistir en el fet de la importància en l'elecció del mètode i la línia cel·lular més adients per a la detecció dels virus a l'ambient.

Per a aquestes mostres, el percentatge de positivitat és lleugerament inferior al de les mostres analitzades en l'apartat anterior utilitzant el mètode Viraden. Val a dir que,

determinades èpoques de l'any, hi ha una menor presència d'enterovirus en aigua residual (veure Capítol 5) a la que cal sumar una major inactivació. Aquests mesos de menor aportació poden determinar-se, a partir de les anàlisi realitzades, com els mesos que van de l'estiu a la tardor. Aquest fet podria haver influenciat els resultats d'enterovirus en aigua de mar d'aquesta secció, lleugerament inferiors als de l'apartat anterior.

**Taula 4.3.1.2.4.2.1.** Enumeració d'enterovirus cultivables (ufp per 10 litres) en aigua de mar a nivell de platja utilitzant el mètode Viraden en placa de 90 mm i combinant diferents línies cel·lulars.

<b>Data de la mostra</b>	<b>BGM/BGM</b>	<b>CaCo-2/BGM<sup>a</sup></b>
10/7/2002	0	1
10/7/2002	0	0
10/7/2002	0	0
17/7/2002	0	1
17/7/2002	1	0
17/7/2002	0	1
16/10/2002	4	3
16/10/2002	3	4
23/10/2002	0	1
23/10/2002	1	0

<sup>a</sup>Línia cel·lular BGM a la monocapa i línia CaCo-2 per a la suspensió cel·lular.

## 4.4 CONCLUSIONS

---

El mètode de doble capa és el mètode més eficient entre els assajats per a la quantificació de virus en suspensions virals de cultius purs incloent l'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió per a la determinació de poliovirus 1 (Sabin), el mètode considerat més eficient fins a l'actualitat.

El mètode de doble capa és un mètode més eficient que el de monocapa, el mètode Viraden i el mètode de NMPUC per a l'enumeració de virus cultivables en aigua residual bruta.

El mètode de doble capa és un mètode més eficient que Viraden per a l'enumeració de virus cultivables en aigua residual tractada.

La comparació entre virus cultivables (infecciosos) quantificats pel mètode de doble capa en aigua residual bruta i la detecció de genomes d'enterovirus per RT-PCR, s'estableix amb una diferència màxima d'un logaritme a favor de la tècnica molecular.

Amb els mètodes Viraden i de doble capa poden combinar-se diferents línies cel·lulars per a la determinació de virus. La utilització de la línia cel·lular CaCo-2 a la capa superior permet l'obtenció de major nombre d'enterovirus i de major tipus d'enterovirus diferents, a partir de mostres d'aigua residual bruta, si es compara amb les línies BGM i PLC/PRF/5.

El mètode Viraden i la floculació orgànica amb enumeració pel mètode de doble capa, són mètodes vàlids per a la detecció d'enterovirus cultivables en aigua de riu que presenti densitats d'enterovirus mínimes d'1 ufp per litre.

El mètode Viraden aplicat amb membranes de 90 mm de diàmetre apareix com el mètode més adient per a la detecció d'enterovirus cultivables en aigua de mar.

## ANNEX CAPÍTOL 4

### CONSERVACIÓ DE CÈL·LULES A 4°C DURANT PERÍODES CURTS DE TEMPS

#### A.4.1 Introducció

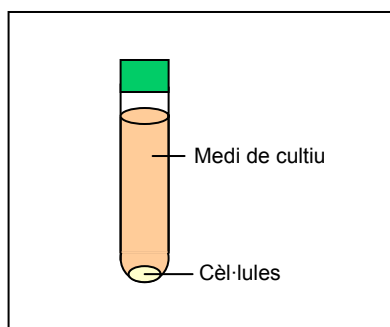
Per a l'aplicació dels mètodes Viraden i de doble capa s'utilitza una suspensió preparada a partir de cèl·lules que creixen en flascons de cultiu cel·lular. Es volia saber si aquesta suspensió havia de preparar-se cada vegada immediatament abans de la seva utilització com es venia fent fins al moment, o si es podien mantenir les cèl·lules refrigerades i durant quin període de temps, un cop preparada la suspensió, sense pèrdua en l'eficiència de recuperació de virus.

#### A.4.2 Material i Mètodes

Per tal de procedir amb aquests experiments es prepararen diferents tubs amb suspensió cel·lular que provenia de cèl·lules de les línies BGM i CaCo-2. S'escolliren dues línies cel·lulars contínues, una de les quals, la línia CaCo-2 està constituïda per cèl·lules que presenten un fenomen de polarització que es manifesta en el cultiu a partir dels 6 o 7 dies de creixement. Les cèl·lules es polaritzen simulant cèl·lules de l'epiteli

intestinal amb presència de microvellositats. Les cèl·lules BGM provenien de cultius amb 4 a 6 dies de creixement que formaven monocapes confluents i les cèl·lules CaCo-2 provenien de cultius amb de 6 a 7 dies de creixement que formaven igualment monocapes confluents característiques d'aquesta línia cel·lular.

La suspensió cel·lular es preparà com es descriu a l'Annex II: "Preparació de la suspensió cel·lular per ser emprada en els mètodes Viraden i de doble capa", amb el medi suplementat amb antibiòtics indicat per aquest procediment. Breument, a partir dels flascons amb monocapa confluent es procedí a la separació de les cèl·lules per tripsinització i es recolliren 2/3 del cultiu per a les cèl·lules BGM i 1/2 del cultiu per a les cèl·lules CaCo-2 en tubs estèrils de 10 mL de capacitat. Seguidament es centrifugaren les suspensions cel·lulars a 2000 xg durant 10 minuts i els tubs que s'obtingueren amb el sediment format per les cèl·lules (Figura A.4.2.1) es mantingueren a  $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$  amb tot el medi utilitzat per a la preparació de la suspensió (10 mL) fins al moment d'ésser emprats per a la titulació i per a la sembra en flascons per a l'avaluació del control del creixement.



**Figura A.4.2.1.** Exemple de tubs amb suspensió cel·lular preparada per a l'avaluació de la conservació de cèl·lules a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

#### **A.4.2.1 Efecte de la conservació a $4^\circ\text{C}$ de cèl·lules BGM i CaCo-2 en la capacitat per a la titulació de diferents enterovirus emprant el mètode Viraden**

D'una banda es valorà la capacitat de recuperació de virus per part de les cèl·lules de les línies BGM i CaCo-2 conservades a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Es procedí enumerant suspensions virals (materials de referència) prèviament preparades i controlades. Les enumeracions es feren amb les cèl·lules conservades a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  durant els temps indicats.

El mètode emprat per a la quantificació dels diferents virus amb les cèl·lules refrigerades fou el mètode Viraden. Es realitzaren determinacions de cadascun dels virus amb ambdues línies assajades, per triplicat. La titulació es realitzà com es descriu a continuació.

En el moment abans de la titulació es retirà un tub amb cèl·lules del refrigerador i es procedí a concentrar les cèl·lules (un factor de deu vegades) seguint el procediment descrit a l'Annex II. La

concentració cel·lular necessària és de  $1,5 \cdot 10^7$  a  $2 \cdot 10^7$  cèl·lules·mL<sup>-1</sup>. Breument,

- es descartaren els 10 mL de sobrenedant i
- es recuperà el sediment (cèl·lules) en 1 mL del mateix medi utilitzat per a la preparació prèvia de la suspensió cel·lular.

El control del nombre de virus a temps zero (moment d'obtenció de les cèl·lules) es realitzà procedint amb una titulació inicial de virus presents en suspensions virals de poliovirus 1 (Sabin), echovirus 6, echovirus-AR51101.1 (Patró 1 de RFLP) i coxsackievirus B5, emprant ambdues línies cel·lulars.

Les determinacions del títol de les suspensions virals amb les cèl·lules conservades, es realitzaren a les 24 hores, 48 hores, 72 hores, 96 hores i 192 hores (7 dies) per a la línia BGM i durant els mateixos intervals fins a les 96 hores per a la línia CaCo-2. D'aquesta manera, a les 24 hores es titularen suspensions virals amb cèl·lules que s'havien mantingut durant 24 hores a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  i així successivament. Es realitzaren tres determinacions de cadascun dels virus amb cadascuna de les línies cel·lulars per cada interval de temps.

Per a cadascuna de les suspensions virals utilitzades es disposà de la carta control, elaborada prèviament, la qual establia els límits superior i inferior d'acció a partir dels quals el títol obtingut amb les cèl·lules conservades durant aquell període de temps a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  ja no es considerava correcte.

#### **A.4.2.2 Efecte en la capacitat de creixement de les cèl·lules BGM i CaCo-2 conservades a 4°C**

Per a l'avaluació de la conservació de la capacitat de creixement en cultiu sobre superfícies de cultiu cel·lular (flascons), els cultius mantinguts a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  es sembraren en flascons de  $25\text{cm}^2$  per a cultiu cel·lular. El nombre de cèl·lules que es sembrà fou aproximadament, el mateix nombre de cèl·lules necessàries per al subcultiu de cadascuna de les línies (de  $2 \cdot 10^4$  a  $6 \cdot 10^4$  cèl·lules· $\text{mL}^{-1}$ ). D'aquesta manera s'avaluà si les cèl·lules conservades en aquestes condicions, eren capaces de créixer de nou i formar monocapes confluents en períodes de temps considerats habituals. Per tal de valorar aquest fet es procedí com es descriu a continuació.

- Un cop concentrades les cèl·lules (recuperades en 1 mL de medi) es diposità el volum de suspensió cel·lular necessari per obtenir una densitat final de  $2 \cdot 10^4$  a  $6 \cdot 10^4$  cèl·lules per mL (adient per al cultiu de les línies cel·lulars contínues) en cadascun dels flascons de  $25\text{cm}^2$ .
- S'afegiren 10 mL de medi de cultiu per al creixement cel·lular, l'indicat per a cada línia cel·lular.
- S'incubaren els flascons a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  tancats.
- Es procedí amb l'observació diària d'aquests per tal de seguir l'evolució dels cultius.

En paral·lel, amb cada sembra de les cèl·lules conservades a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ , es realitzà un control del creixement de les línies cel·lulars BGM i CaCo-2 per poder valorar possibles influències externes. Aquest control es feu sembrant a l'hora, en cada període de temps, flascons amb cèl·lules BGM i CaCo-2 que procedien d'un subcultiu, realitzat en aquell mateix moment a partir de monocapes confluents.

### **A.4.3 Resultats**

#### **A.4.3.1 Efecte de la conservació a 4°C de cèl·lules BGM i CaCo-2 en la capacitat per a la titulació de diferents enterovirus emprant el mètode Viraden**

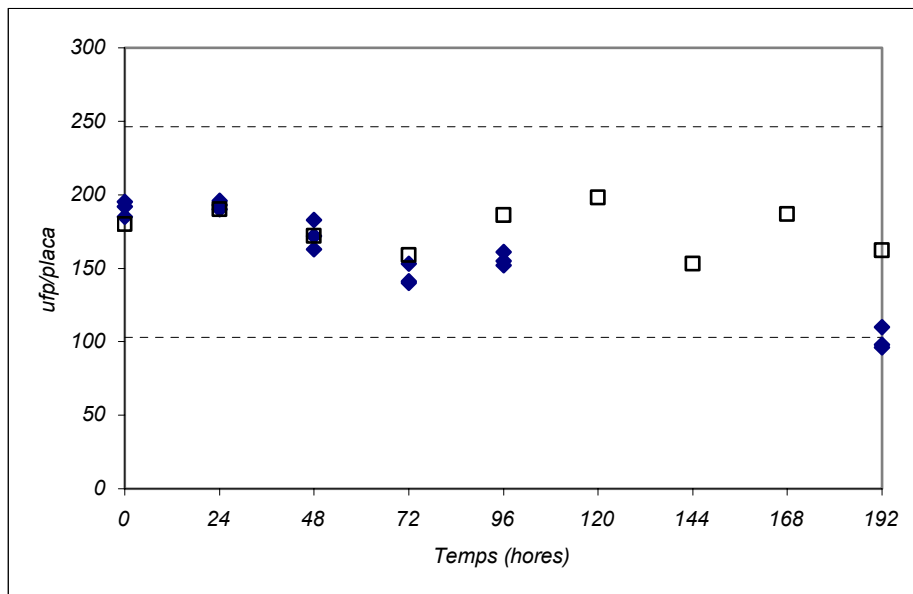
Els resultats (figures A.4.3.1.1 a A.4.3.1.8) mostren mínimes diferències en funció del virus a estudi. En el cas de poliovirus 1 (Sabin), els recomptes obtinguts amb les cèl·lules BGM conservades a  $4^\circ\text{C}$  (Figura A.4.3.1.1), es troben dins els límits de la carta control com a mínim fins a les 96 hores de conservació. Per a echovirus 6, els recomptes obtinguts amb les cèl·lules BGM conservades a  $4^\circ\text{C}$  (Figura A.4.3.1.2) es troben dins els límits de la carta control entre les 72 i les 96 hores de conservació. Aquest és el virus per al qual es perd abans la capacitat d'infecció de les cèl·lules BGM conservades a  $4^\circ\text{C}$ . Així, comparant aquests resultats amb els obtinguts amb la resta del virus es podria pensar que els echovirus 6 quan infecten les cèl·lules BGM



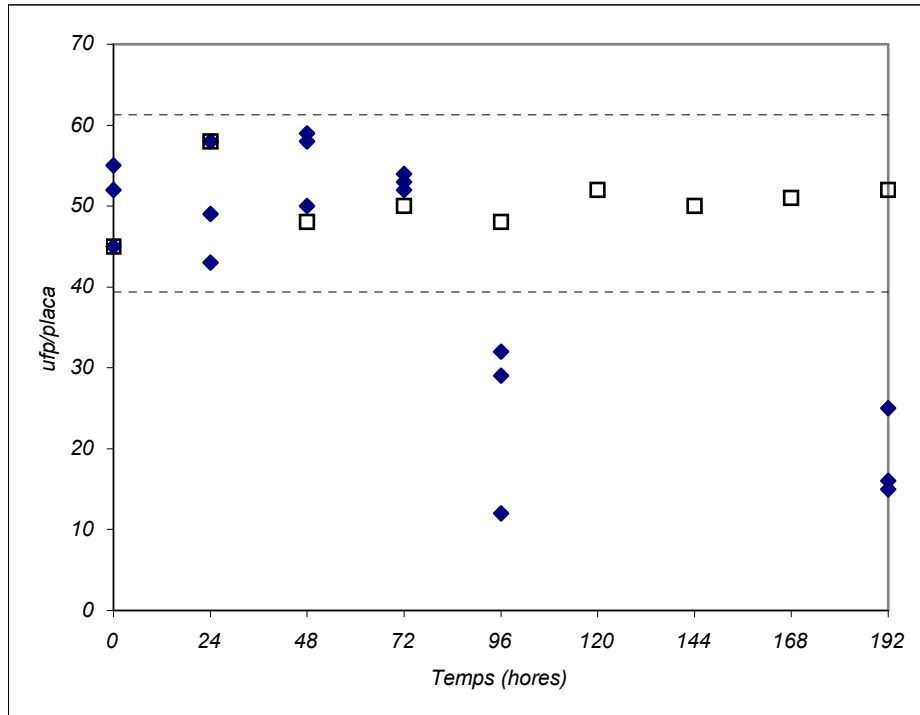
utilitzen un receptor o funció cel·lular que desapareix abans en el temps.

De nou, per a l'enterovirus AR51101.1 els recomptes d'ufp es mantenen dins els límits de la carta control fins a les 96 hores de conservació (Figura A.4.3.1.3). I el mateix resultat s'observa per a coxsackievirus B5 (Figura A.4.3.1.4).

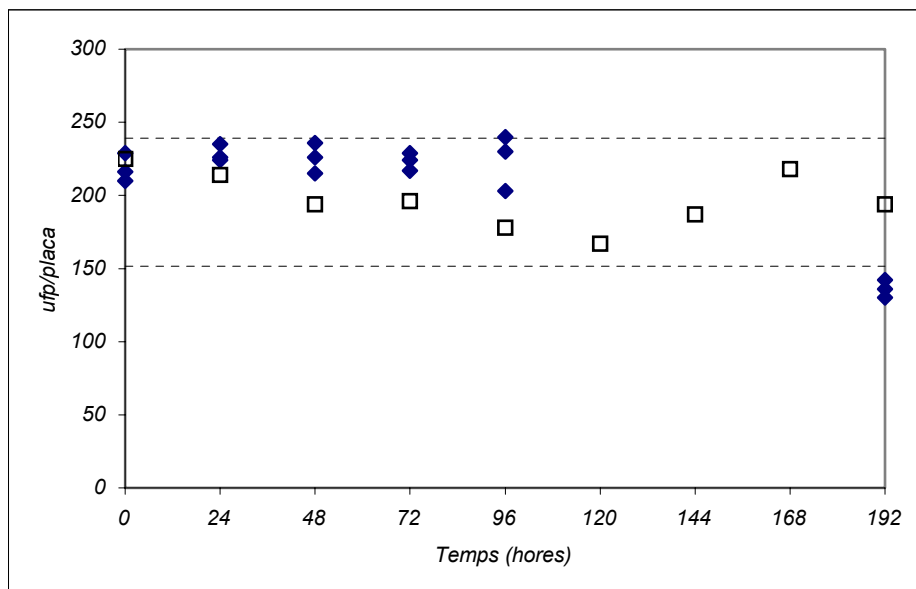
Per a les altres cèl·lules provades, les de la línia CaCo-2, els recomptes dels enterovirus analitzats es mantenen, per a tots ells, per damunt els límits inferiors d'acció de les cartes de control de cadascun d'aquests, fins a les 96 hores de conservació (Figures A.4.3.1.5, A.4.3.1.6, A.4.3.1.7 i A.4.3.1.8).



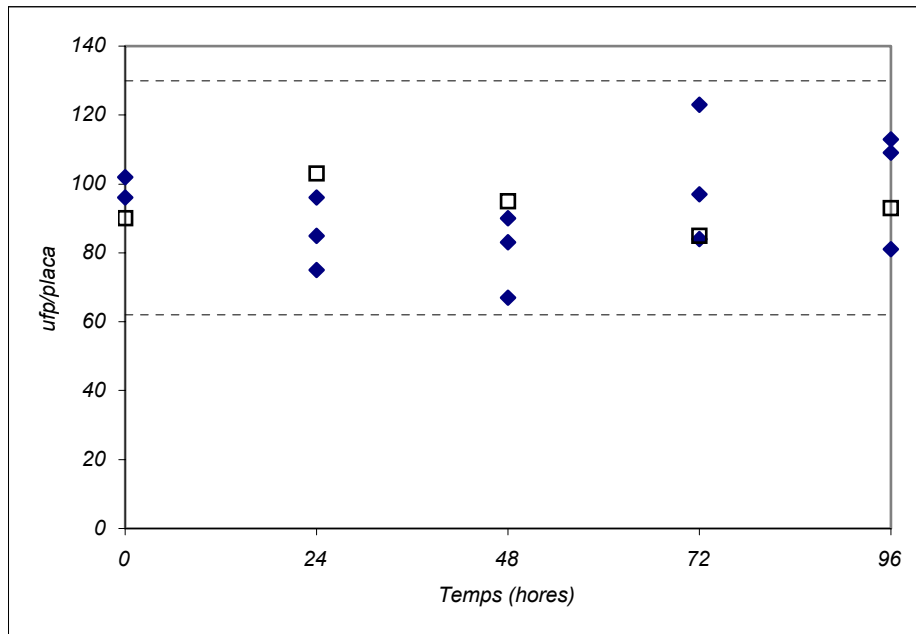
**Figura A.4.3.1.1.** *Recomptes de poliovirus 1 (Sabin) obtinguts amb cèl·lules BGM conservades a 4°C durant els períodes de temps indicats a la gràfica. Recomptes (♦) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.*



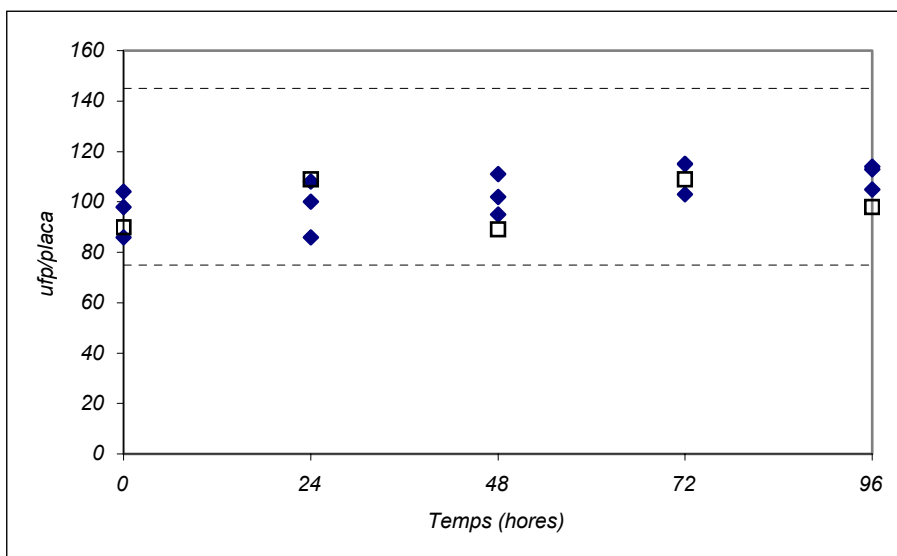
**Figura A.4.3.1.2.** Recomptes d'echovirus 6 obtinguts amb cèl·lules BGM conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



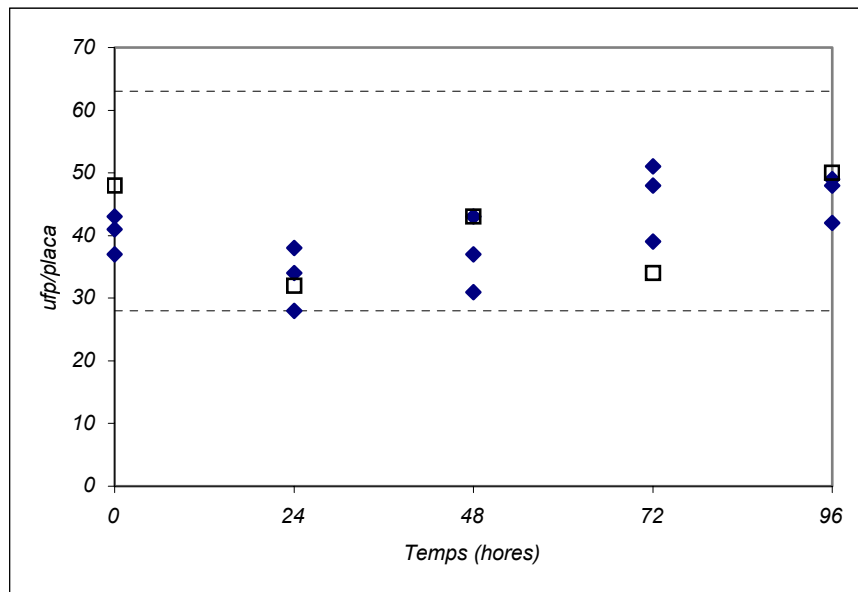
**Figura A.4.3.1.3.** Recomptes d'enterovirus AR51101.1 obtinguts amb cèl·lules BGM conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



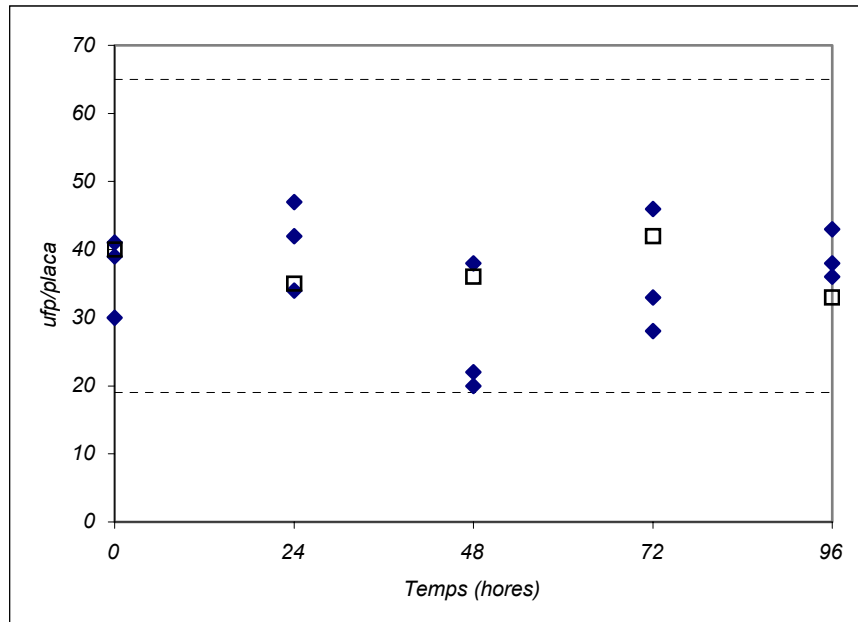
**Figura A4.3.1.4.** Recomptes de coxsackievirus B5 obtinguts amb cèl·lules BGM conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



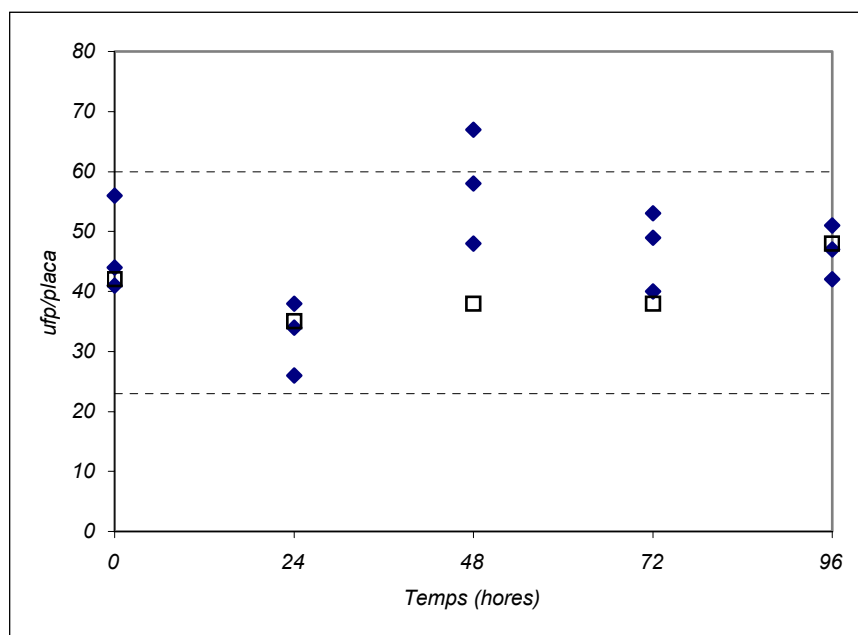
**Figura A4.3.1.5.** Recomptes de poliovirus 1 (Sabin) obtinguts amb cèl·lules CaCo-2 conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



**Figura A.4.3.1.6.** Recomptes d'echovirus 6 obtinguts amb cèl·lules CaCo-2 conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



**Figura A4.3.1.7** Recomptes d'AR51101.1 (echovirus) obtinguts amb cèl·lules CaCo-2 conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.



**Figura A.4.3.1.8.** Recomptes de coxsackievirus B5 obtinguts amb cèl·lules CaCo-2 conservades a 4°C durant els períodes indicats a la gràfica. Recomptes (◆) d'ufp durant l'experiment i recomptes utilitzats per a la realització de la carta control (□). Les dues línies horitzontals marquen els límits superior i inferior d'acció de la carta control.

#### **A.4.3.2 Efecte en la capacitat de creixement de les cèl·lules BGM i CaCo-2 conservades a 4°C**

Les observacions es realitzaren cada 24 hores al microscopi invertit, comparant cadascuna de les condicions experimentals amb el control de creixement cel·lular realitzat per a cadascun dels casos. Aquestes observacions es mostren a la taula A.4.3.2.1 a manera de resum.

Fins a les 48 hores de conservació, l'aspecte de les cèl·lules que s'havien sembrat a partir de les suspensions que es mantenien refrigerades era idèntic al control de cèl·lules subcultivades en el moment de sembrar-les. Aquest període coincideix amb el que passa de divendres a dilluns, fet que podria ésser molt útil per

molta gent que fa experimentació amb cultiu cel·lular.

Altres mètodes de conservar cèl·lules en cultiu són el canvi a medi empobrit (amb percentatge de sèrum fetal boví inferior al que s'utilitza per al creixement), o conservar les cèl·lules a temperatures més baixes que les necessàries per al creixement. Aquests sistemes però, impliquen sempre tornar a subcultivar (ressemar) abans de poder utilitzar de nou les cèl·lules. Quan les cèl·lules es mantenen en aquestes condicions no es poden utilitzar directament per realitzar els assaigs i, aquest fet implica pèrdues de temps i una despesa de material addicional.

**Taula A.4.3.2.1.** Conservació de cèl·lules a 4°C i efecte en la capacitat de creixement.

Línia cel·lular	Temps a 4°C (h)	Aspecte de les cèl·lules <i>versus</i> el control	Creixement cel·lular a les 24 h	Creixement cel·lular a les 48-72 h	Creixement cel·lular als 4-5 dies	Cèl·lules en suspensió <sup>a</sup>
<b>BGM</b>	24	Idèntic	++	+++	+++	-
	48	Idèntic	++	+++	+++	-
	72	Semblant	++	+++	+++	+
	96	Semblant	+	++	+++	+
	192	Semblant	+	++	+++	+
<b>CaCo-2</b>	24	Idèntic	++	++	+++	-
	48	Idèntic	++	++	+++	-
	72	Semblant	+	++	+++	+
	96	Semblant	+	++	+++	+

+++ : creixement confluent

++ : creixement pràcticament confluent

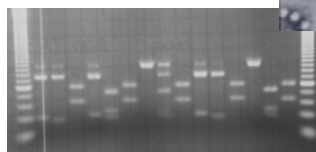
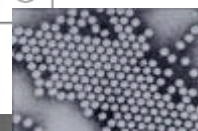
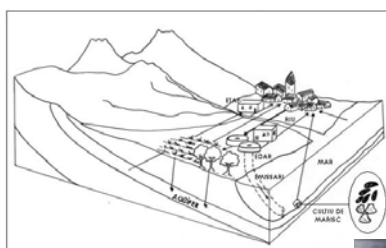
+ : cèl·lules adherides i creixement iniciat

<sup>a</sup> - : absència de cèl·lules en suspensió; + : presència de cèl·lules en suspensió

En aquest cas, la conservació a 4°C fins a les 96 hores, per a les dues línies cel·lulars assajades, permet la seva utilització directament per a l'enumeració de la majoria de virus provats, amb l'excepció de l'enumeració d'echovirus 6 a partir de les 72 hores de conservació de la línia BGM.

Així, doncs, creiem que el mètode descrit aquí, ofereix una alternativa de conservació de cèl·lules a curt termini, útil per al treball en laboratori. Les cèl·lules animals de les línies BGM i CaCo-2 es poden mantenir refrigerades durant un temps prudencial sense perdre la capacitat de susceptibilitat d'infecció ni de formació de monocapes.

Aquest fet és d'especial interès ja que a més de la quantificació de virus, els cultius cel·lulars tenen moltes altres aplicacions com a models per anàlisi bioquímiques i cel·lulars. Per a cadascuna de les situacions, cal que les cèl·lules es trobin en un punt de creixement determinat, amb un metabolisme concret. I de vegades, les cèl·lules no estan totalment a punt quan es necessiten. Considerem que seria de gran interès per als investigadors poder conèixer si les observacions fetes en aquest treball poden extrapolar-se a altres usos.



## CAPÍTOL 5. DETERMINACIÓ D'ENTEROVIRUS EN MOSTRES AMBIENTALS



---

## 5.1 INTRODUCCIÓ

---

### 5.1.1 DENSITATS D'ENTEROVIRUS EN MOSTRES AMBIENTALS

L'avaluació de la contaminació viral a l'ambient, incloent-hi l'anàlisi d'enterovirus, està sotmesa a moltes variacions inherents a la metodologia d'anàlisi. Les variacions poden venir tant de les tècniques utilitzades per a la concentració i detecció de virus com, del tipus de material víric analitzat (partícules infeccioses o genoma viral). Quan la detecció es centra en els virus infecciosos o del genoma viral per tècniques de biologia molecular (RT-PCR), els resultats per a la mateixa mostra d'aigua poden diferir substancialment (Puig et al, 1994).

Tot i que l'aigua residual constitueix el receptacle natural de les femtes, mostrant una concentració molt alta d'enterovirus, cal considerar que la densitat dels enterovirus en aquesta matriu varia en funció de factors geogràfics, socio-econòmics, estacionals i sanitaris. Comunitats amb poca higiene i una elevada proporció de població infantil, produeixen aigües residuals especialment riques en enterovirus. De fet, els nens són un hoste preferencial per aquests virus. Dahling et al (1989) observaren que el nivell d'enterovirus en aigua residual era més alt a Puerto Rico (una regió amb una elevada densitat de població i un nivell socioeconòmic baix) amb pics de concentració d'enterovirus de més de  $10^5$  ufp per litre, que en diversos estats del USA. A Israel, el valor màxim enregistrat a l'aigua residual fou de  $10^6$  ufp·L<sup>-1</sup> (Buras, 1976) amb nombres d'enterovirus dins un rang molt ampli entre  $6 \cdot 10^3$  i  $1 \cdot 10^6$  ufp·L<sup>-1</sup>.

Després del tractament de depuració encara es detecten enterovirus a l'aigua residual tractada. La quantitat de virus presents en aquest tipus d'aigua depèn del nivell de contaminació de l'aigua residual bruta i del tipus de tractament que s'hi apliqui. Morris i Sharp (1984) troben valors màxims de virus en aigua residual tractada de fins a 4381 ufp·L<sup>-1</sup>.

Pel que fa a l'estacionalitat, s'observa certa distribució estacional dels enterovirus amb els valors màxims durant els mesos d'estiu (Sedmak et al, 2003). A aquesta estacionalitat cal afegir que hi ha enterovirus amb patrons d'aïllament amb anys epidèmics periòdics; és el cas de coxsackievirus B5 (Hamby et al, 1987). A més de l'estacionalitat en els aïllaments d'enterovirus, s'estableix una estacionalitat pel que fa als casos declarats de poliomièlitis. Dowell (2001) descriu que aquesta es pot establir en funció de la latitud; a mida que augmenta la distància a l'equador, es fa evident una elevada proporció de casos a l'estiu i a la tardor.

A les taules 5.1.1.1 i 5.1.1.2 es recullen algunes de les dades publicades referents als nombres de virus entèrics en aigua residual bruta i tractada i, dades dels diferents tipus d'enterovirus identificats en aquests tipus de mostres. Cal assenyalar que és difícil establir connexions o comparacions amb els valors de virus en aigua residual, ja que no es disposa de mètodes de concentració i detecció estandarditzats amb un ús generalitzat d'aquests. Els valors que s'han recollit a partir de les referències bibliogràfiques són potser massa dependents de les metodologies.

Les aigües superficials que reben els efluents de depuradora, també solen contenir enterovirus. Els rius europeus mostren valors d'enterovirus per litre variables. El riu Tàmesi es va trobar que contenia 100 enterovirus per litre aproximadament (Morris i Waite, 1980). Al mateix Regne Unit, Morris i Sharp (1984) troben valors d'enterovirus en aigua de riu de fins a 647 ufp·L<sup>-1</sup>. En el nostre entorn, es detectaren valors d'enterovirus (NMPUC·L<sup>-1</sup>) de 0,2 a 4,6 (mitjana: 0,36) en un punt de captació d'aigua del riu Llobregat de l'ETAP (Estació de Tractament d'Aigües Potables) del Consorci Aigües Ter Llobregat ubicada a Abrera en el curs baix d'aquest riu i, de 0,15 a 1,2 (mitjana: 0,28) en un segon punt en aquest mateix riu (Lucena et al, 1988). Aquestes mostres comptaven amb valors de coliformes fecals de  $5,9 \cdot 10^4$  i  $6,5 \cdot 10^5$  respectivament. En altres anàlisi (Lucena et al, 1985) es troben valors d'enterovirus mitjans de 0,67 MPNCU·L<sup>-1</sup> en aquest mateix riu (màxim 4,65) i de 5,44 MPNCU·L<sup>-1</sup> (màxim 55) en el riu Besòs, ambdós de la província de Barcelona. Aquests i altres valors de virus entèrics en aigua de riu i altres tipus d'aigua superficial trobats a la bibliografia, es recullen a la taula 5.1.1.3.

L'aigua de riu contaminada comporta un risc quan es destina a usos que poden conduir els virus entèrics a entrar en contacte amb els humans, com el lleure, el reg i la potabilització. Les densitats d'enterovirus en aigua de riu i la importància que puguin tenir aquests i altres virus en la salut pública no s'ha avaluat totalment, per la manca de mètodes de concentració i quantificació de virus prou eficients per aquest tipus d'aigua.

Taula 5.1.1.1. Presència d' enterovirus o virus entèrics en aigua residual.

Mostra	Origen de l'aigua	Tipus de virus	Quantitat de virus	Percentatge de mostres positives	Serotips diferents d'enterovirus	Referència	
Aigua residual bruta	Israel	Enterovirus	$6 \cdot 10^3 - 10^6$ ufp $\cdot L^{-1}$			Buras, 1976	
	USA (Califòrnia)	Enterovirus		60	9	Schmidt et al, 1978	
	Canadà	Enterovirus		90,5		Payment et al, 1979	
		Enterovirus		61,8		Sekla et al, 1980	
	USA (Florida)	Enterovirus	87 ufp $\cdot L^{-1}$ [6,2-2250]	100		Hejkal et al, 1981	
	Austràlia	Enterovirus		100		Irving i Smith, 1981	
	Regne Unit	Enterovirus	200-81600 ufp $\cdot L^{-1}$	100		Morris, 1984	
	Espanya	Enterovirus		90	14	Lucena et al, 1985	
	Espanya	Enterovirus	4885 ufp $\cdot L^{-1}$ [400-14000] (no conc.)	93 (no concentrades-3 mL)			Bosch et al, 1986
		Rotavirus	5407 loci $\cdot L^{-1}$ [1000-8000] (no conc.)				
		Enterovirus	267 ufp $\cdot L^{-1}$ [32-708] (conc.)				
		Rotavirus	237 loci $\cdot L^{-1}$ [35-480] (conc.)				
	Canadà	Enterovirus	95,5 mpniu $\cdot L^{-1}$ [0,2-995]	100	9	Payment et al, 1986	
		Enterovirus		100	13	Krikelis et al, 1988	
	Puerto Rico	Enterovirus	100 a 242500 ufp $\cdot L^{-1}$	100		Dahling et al, 1989	
		Reovirus	0-1247 ufp $\cdot L^{-1}$	60			
Espanya	Enterovirus		31		Puig et al, 1994		
			75 (genomes)				
Itàlia	Enterovirus		58		Carducci et al, 1995		

Taula 5.1.1.1. Presència d' enterovirus o virus entèrics en aigua residual. (Continuació)

Mostra	Origen de l'aigua	Tipus de virus	Quantitat de virus	Percentatge de mostres positives	Serotips diferents d'enterovirus	Referència	
Aigua residual bruta	Espanya	Enterovirus		40 (genomes)		Pina et al, 1998	
		HAV		27 (genomes)			
		Adenovirus		93 (genomes)			
	Nova Zelanda	Enterovirus	233-2667 ufp ·L <sup>-1</sup>	100		Green i Lewis, 1999	
	Grècia	Enterovirus		50 (genomes)		Vantarakis i Papapetropoulou, 1999	
		Adenovirus		58,3 (genomes)			
Canadà	Virus entèrics	962 NMPUC ·L <sup>-1</sup> [4-12516]				Payment et al, 2001	
Espanya Egipte	Rotavirus			66,9 (genomes)		Villena et al, 2003	
				85,7 (genomes)			
USA (Wisconsin)	Enterovirus	237 mpniu ·L <sup>-1</sup> – 3347 mpniu ·L <sup>-1</sup>		88	24	Sedmak et al, 2003	
Aigua residual sedimentada	Austràlia	Enterovirus		100		Irving i Smith, 1981	
	Espanya	Enterovirus	4 ufp ·L <sup>-1</sup> [1-12]	87		Bosch et al, 1986	
			10 loci ·L <sup>-1</sup> [5-30]	75			
Canadà	Enterovirus	23,3 mpniu ·L <sup>-1</sup> [0,3-90,3]		100	9	Payment et al, 1986	
Aigua residual tractada	USA (Califòrnia)	Enterovirus		9,4		Schmidt et al, 1978	
					21		
	USA (Florida)	Enterovirus	7,4 ufp ·L <sup>-1</sup> [0,8->36]		100		Hejkal et al, 1981
	Austràlia	Enterovirus			46		Irving i Smith, 1981
	Regne Unit	Enterovirus	400-75800 ufp ·L <sup>-1</sup>		100		Morris, 1984
	Regne Unit	Enterovirus		4381 ufp ·L <sup>-1</sup>	86		Morris i Sharp, 1984
			409 ufp ·L <sup>-1</sup>	81			
			800 ufp ·L <sup>-1</sup>	32	8		
			1000 ufp ·L <sup>-1</sup>	43			
			100 ufp ·L <sup>-1</sup>	37			

**Taula 5.1.1.1.** Presència d' enterovirus o virus entèrics en aigua residual. (Continuació)

Mostra	Origen de l'aigua	Tipus de virus	Quantitat de virus	Percentatge de mostres positives	Serotips diferents d'enterovirus	Referència
Aigua residual tractada	Espanya	Enterovirus	0,6 ufp ·L <sup>-1</sup> 6,7 loci ·L <sup>-1</sup>	29 50		Bosch et al, 1986
	Canadà	Enterovirus	1,4 mpniu ·L <sup>-1</sup> [0-12,2]	79	4	Payment et al, 1986
	Puerto Rico	Enterovirus Reovirus	1-24000 ufp ·L <sup>-1</sup> 0-21 ufp ·L <sup>-1</sup>	100 53	2	Dahling et al, 1989
	USA (Califòrnia)	Virus entèrics	185 pv ·100 L <sup>-1</sup>	75		Asano et al, 1992
			2 pv ·100 L <sup>-1</sup>	50		
			200 pv ·100 L <sup>-1</sup>	79		
			6 pv ·100 L <sup>-1</sup> 2 pv ·100 L <sup>-1</sup>	45 87		
	França	Enterovirus		48 (genoma-llana de vidre) 72 (genoma-pols de vidre)		Gantzer et al, 1997
	França	Enterovirus	1,5-22,5 NMPUC ·L <sup>-1</sup>	10		Gantzer et al, 1998
		Enterovirus	Genoma	19		
Nova Zelanda	Enterovirus	<6-276 ufp ·L <sup>-1</sup>	50		Green i Lewis, 1999	
Grècia	Enterovirus		0 (genomes)		Vantarakis i Papapetropoulou, 1999	
Canadà	Virus entèrics	972 NMPUC ·L <sup>-1</sup>			Payment et al, 2001	

**Taula 5.1.1.2.** Percentatge de diferents enterovirus en aigua residual bruta i tractada.

	Polio 1	Polio 1 vac	Polio 2	Polio 2 vac	Polio 3	Polio 3 vac	Cox B1	Cox B2	Cox B3	Cox B4	Cox B5	Cox B6	Cox A	Echo 3	Echo 5	Echo 6	Echo 7	Echo 9	Echo 11	Echo 12	Echo 13	Echo 14	Echo 17	Echo 22	Echo 25	Echo 30	Reovirus	NI	Referència			
Aigua residual bruta	98,5						8																						2,5	Payment et al, 1979		
	2,9		23,5		8,8			11,8	2,9	8,8	20,6	5,9					2,9											11,7		Schmidt et al, 1978		
	100																												Lucena et al, 1985			
	5,7		5,2		4,2		0,3		1,6	25,7	0,4													0,4			56,5		Payment et al, 1986			
	16							0,2			83																			Dahling et al, 1989		
							3,5	11,1	7,8	18,7	17,3		0,6	2,6		15,2	0,8	0,4	16,6					2,7	0,9	1,3		<5		Hovi et al, 1996		
	11,5																												Manor et al, 1999			
							0,7	2,5	1,3	27,3	10,5	0	0,2	4,9	0	17,7	10,4	1,9	20,1	0,6	4,2	0,2	1,5	0,6	3,7	5,7				Sedmak et al, 2003		
Aigua residual sedimentada	10,1		23,2		22,1		2,7			15,4	6,4			2,3													2,3		15,4		Payment et al, 1986	
Aigua residual tractada							29,1																						Nestor i Costin, 1976			
	3,7			3,7				3,7	11,1	3,7	3,7	3,7	11,1		3,7	7,4				11,1	3,7	3,7	3,7	7,4			7,4		3,7		Vaughn et al, 1979	
	43		43		14				14																						Chang et al, 1981	
	12,5		6,3							56,3																		25			Payment et al, 1986	
	25										75																					Dahling et al, 1989
Fang activat	41						25														25							28		Wullenweber i Agbalika, 1984		

Polio 1: poliovirus 1 soca no vacunal (Mahoney); Polio 2: poliovirus 2 soca no vacunal (MEF); Polio 3: poliovirus 3 soca no vacunal (Saukett); Polio 1 vac: poliovirus 1 soca vacunal (Sabin tipus 1); Polio 2 vac: poliovirus 2 soca vacunal (Sabin tipus 2); Polio 3 vac: poliovirus 3 soca vacunal (Sabin tipus 3); Cox B1-B6: coxsackievirus B1-B6; Echo 3-30: echovirus 3-30; NI: no identificats.

**Taula 5.1.1.3.** Presència d' enterovirus o virus entèrics en aigües superficials.

Tipus i origen de la mostra	Tipus de virus	Quantitat	Percentatge mostres positives	Serotips diferents d'enterovirus	Referència
Riu			17,5		Nestor et al, 1978
Riu			3		Sekla et al, 1980
Rius (Japó)	Reovirus Adenovirus Enterovirus	8 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-19] <sup>a</sup> 0,3 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-2] 7,3 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-45]	25 95 95	9	Matsuura et al, 1984
Riu (Regne Unit)		647 ufp ·L <sup>-1</sup> 74 ufp ·L <sup>-1</sup>	18,8-72,4		Morris i Sharp, 1984
			66		van Olphen et al, 1984
Riu (Espanya)	Enterovirus	0,67 ufp ·L <sup>-1</sup> [0,3-4,65] 5,44 ufp ·L <sup>-1</sup> [0,15-55]	80 92	10	Lucena et al, 1985
Riu (Espanya)	Enterovirus	0,9 NMPUC ·L <sup>-1</sup> [ $<1,5-120$ ] 1,5 NMPUC ·L <sup>-1</sup> [ $<1,5-120$ ] 1,6 NMPUC ·L <sup>-1</sup> [ $<1,5-215$ ] 1,6 NMPUC ·L <sup>-1</sup> [ $<1,5-120$ ]	67 68 67 87		Bosch et al, 1986b
Riu (Espanya)	Enterovirus	0,2-4,7 NMPUC ·L <sup>-1</sup> 0,2-1,2 NMPUC ·L <sup>-1</sup>	44 47		Lucena et al, 1988
(Canadà)			13 a 71		Payment et al, 1988a
(Canadà)	Virus entèrics	17,5 (±19) NMPUC ·L <sup>-1</sup>			Payment et al, 1988b
Riu (Andorra)	Enterovirus Rotavirus	86,7 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-4200] 4,6 loci ·L <sup>-1</sup> [0-92]	40 80		Bosch et al, 1991
Llac (Holanda)	Enterovirus		10		Van Olphen et al, 1991
Llac (Venezuela)	Enterovirus		50		Botero et al, 1992
Rius i llacs (Suïssa)	Enterovirus		17,5 (genoma)		Gilgen et al, 1995
Riu Safo (Japó)	Enterovirus Reovirus	40,6 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-190] 56,2 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-356]			Tani et al, 1995
Llac (Itàlia)	Enterovirus		12		Aulicino et al, 1996
Riu (Espanya)	Enterovirus	0,29 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-2] 0,93 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-10] 0,52 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-8] 0,83 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-4] 1,5 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-7] 0,08 ufp ·L <sup>-1</sup> [0-1]	14,28 21,4 18 41,66 50 7,69		Vidal et al, 1997
Riu (Espanya)	Enterovirus HAV Adenovirus		22 (genomes) 43 (genomes) 65 (genomes)		Pina et al, 1998

<sup>a</sup> [valor mínim – valor màxim]

**Taula 5.1.1.3.** Presència d'enterovirus o virus entèrics en aigües superficials. (Continuació).

Tipus i origen de la mostra	Tipus de virus	Quantitat	Percentatge mostres positives	Serotips diferents d'enterovirus	Referència
Aigües subterrànies (USA)	Enterovirus	Infecciosos	8,7		Abbaszadegan et al, 1999
	Enterovirus	Genoma	30,1		
	HAV	Genoma	8,6		
	Rotavirus	Genoma	13,8		
Aigües superficials	Enterovirus	Genoma (ICC-PCR)	17,2		Chapron et al, 2000
Riu (Korea del Sud)	Enterovirus	0,02 a 0,84 NMPUC ·L <sup>-1</sup>	75		Cho et al, 2000
	Enterovirus Adenovirus		69 (genomes) 87,5 (genomes)		
Llacs Florida (USA)	Enterovirus		40		Quintero-Betancourt et al, 2000
			6		Grabow et al, 2001
Superficials			60 (genomes)	3	Donaldson et al, 2002
Aigua de beguda			6,7		Sekla et al, 1980

Pel que fa al tipus de virus que s'aïllen a partir d'aigua de riu (Taula 5.1.1.4), s'identifiquen poliovirus, coxsackievirus A i B i echovirus. Cal destacar l'elevat percentatge de presència de poliovirus i el fet que, dins d'aquests aïllaments s'identifiquen soques vacunals i salvatges (Lucena et al, 1985).

**Taula 5.1.1.4.** Distribució d'enterovirus en aigua de riu.

Tipus d'enterovirus			No identificats	Origen	Referència
Poliovirus	Coxsackie B	Echovirus			
	14,7		85,3		Nestor i Costin, 1976
33,5	15,5	2,8	48,2	Rius (Japó)	Matsuura et al, 1984
88,9	5,5	3,7	1,9	Riu Besòs	Lucena et al, 1985
63,7	24,2	12,1	0	Riu Llobregat	Lucena et al, 1985
19,5	56	24,53	0	Riu Safo (Japó)	Tani et al, 1995

La tercera de les matrius a estudi, l'aigua de mar, rep contaminants de la descàrrega d'aigües residuals brutes o tractades a través dels emissaris submarins, de les deposicions dels fangs de depuradora i de diversos contaminants abocats als rius que desemboquen al mar. El material de rebuig i l'aigua residual descarregats des dels



vaixells s'afegeix al total de la contaminació. Aquesta aigua de mar contaminada doncs, comporta un risc per als banyistes i per als consumidors de productes marins, principalment, marisc. Com en el cas comentat anteriorment de l'aigua de riu, les densitats d'enterovirus en aigua de mar i la importància que poden tenir aquests i altres virus entèrics humans en la salut pública, tampoc s'ha avaluat totalment per la manca de mètodes de concentració i quantificació de virus prou eficients/sensibles per aquest tipus de matriu aquosa.

Només alguns valors d'enterovirus a l'ambient marí trobats a la bibliografia. Rao et al (1984), quantifiquen enterovirus cultivables (recompte obtingut pel mètode de monocapa) en diferents mostres de l'ambient marí i obtenen els següents resultats; 3-12 ufp/379 litres en aigua de mar; 4-40 ufp/379 litres en els sòlids suspesos; 39-398 ufp/379 litres en el sediment no compactat i 7-10 ufp/kg en el sediment. Fleisher et al (1996) troben valors d'enterovirus de  $3,52 \text{ ufp} \cdot 10\text{L}^{-1}$  dins un rang que va de 0 a  $1419 \text{ ufp} \cdot 10\text{L}^{-1}$  en aigua de mar al Regne Unit. Les taules 5.1.1.5 i 5.1.1.6 contenen alguns dels valors de virus entèrics i dels diferents tipus d'enterovirus, que recullen diferents treballs anteriors, els quals tracten la determinació de virus entèrics en aigua de mar.

**Taula 5.1.1.5.** Presència d' enterovirus o virus entèrics en aigua de mar.

Mostra	Tipus de virus	Percentatge de mostres positives	Serotips d'enterovirus diferents	Referència
Mar	Enterovirus	14	7	Rao et al, 1984
Sediment	Enterovirus	5, 47 i 72		Rao et al, 1984
Platja (Espanya)	Enterovirus	17, 17 i 8	5	Lucena et al, 1985
Sediment (Espanya)	Enterovirus	55		Bosch et al, 1988
Emissari (Grècia)	Virus entèrics	87,5		Krikelis et al, 1988
Platja (Irlanda)		8,7		
Aigües recreacionals dolces (Irlanda)	Enterovirus	45,8 84,6		Hughes et al, 1992
(Itàlia)	Enterovirus	82 (genomes)		Muscillo et al, 1994
Platges (Anglaterra)	Enterovirus	0 80 (genomes)		Pallin et al, 1997
Mar (Espanya)	Enterovirus HAV Adenovirus	44 (genomes) 33 (genomes) 78 (genomes)		Pina et al, 1998
Badia (Hawai)	Enterovirus	8		Reynolds et al, 1998
Mar Adriàtic (Itàlia)	Enterovirus Reovirus	32,6 49,3	8	Pianetti et al, 2000

**Taula 5.1.1.6.** Distribució dels diferents enterovirus identificats a partir d'aïllaments en aigua de mar.

Tipus d'enterovirus										Referència
Polio 1	Polio 2	Polio 3	Cox B3	Cox B4	Cox B5	Echo 7	Echo 11	Echo 22	Echo 29	
20	40						20	20		Vaughn et al, 1979
18	39	3	10	14		7				Rao et al, 1984
	74									Lucena et al, 1986
6,4	10,6	6,4	17	27,6	19		10,6			Pianetti et al, 2000

Polio 1-3: poliovirus 1-3; Cox B3-B5: coxsackievirus B3-B5; Echo 7-29: echovirus 7-29

Per la proximitat geogràfica, ressaltar els diferents estudis que s'han realitzat històricament, prenent com a base mostres d'aigua de mar de l'àrea metropolitana de Barcelona. Breument, els resultats que s'obtingueren pel que fa a nivells d'enterovirus, mostres positives i tipus d'enterovirus identificats, es mostren a les taules 5.1.1.7 i 5.1.1.8.

**Taula 5.1.1.7.** Estudi de platges de la província de Barcelona (concentració per pols de vidre i enumeració per NMP). Juny de 1979. (Finance et al, 1982).

Platja	% mostres positives	Intervals de valors d'enterovirus NMPUC L <sup>-1</sup>	Tipus de virus aïllats
Castelldefels	50	0,12 a 0,92	Polio 1 salvatge Polio 2 salvatge Polio 3 salvatge Polio 3 vacunal Coxsackie B5
Barceloneta	100	0,12 a 1,72	Polio 2 vacunal Polio 3 vacunal Polio 1 salvatge Coxsackie B5 Polio 2 salvatge Polio 3 salvatge
Badalona	50	0,12 a 1,6	Polio 3 vacunal Coxsackie B5 Coxsackie B2

**Taula 5.1.1.8.** Aïllaments en aigua de mar de platges de Barcelona (Lucena et al, 1985).

Platja	Soques virals
Barceloneta	Echovirus 11 Poliovirus 3 vacunal
Badalona	Poliovirus 1 salvatge Poliovirus 3 vacunal
Gavà	Poliovirus 2 salvatge Poliovirus 3 salvatge

## 5.1.2 INDICADORS MICROBIOLÒGICS DE QUALITAT DE L'AIGUA

Per la dificultat de detectar directament els patògens en mostres ambientals, la qualitat microbiològica de les aigües s'ha mesurat clàssicament amb l'anàlisi de microorganismes indicadors. Els bacteriòfags s'han proposat des de fa temps com a indicadors del comportament de virus. Guélin (1952) va ésser el primer en proposar la utilització de bacteriòfags com a indicadors de bacteris entèrics i virus. I més tard, Kott et al, (1974) postulen els colifags somàtics com indicadors de contaminació viral humana a l'ambient. A la dècada dels 80 es proposen tres grups de bacteriòfags com possibles microorganismes model de la contaminació viral de les aigües: els colifags somàtics (IAWPRC, 1991), els fags F-específics ARN (Havelaar i Hogeboom, 1984) i els fags que infecten *Bacteroides fragilis* (Jofre et al, 1986; IAWPRC, 1991).

Pel que fa a la utilització d'un virus animal com a indicador, es proposà la utilització de la soca vacunal de poliovirus 1. Però estudis realitzats des de mitjans dels anys 70, constaten la no utilitat de poliovirus 1 (Sabin) com a indicador de la qualitat virològica de l'aigua ja que no es troba en moltes mostres d'aigua residual. Per exemple, poliovirus 1 (Sabin) no es detectà en el 50% de les mostres d'aigua residual, tot i l'administració rutinària de la vacuna OPV (atenuada) als infants (Katzenelson i Kedmi, 1979). En aquestes aigües residuals els valors d'enterovirus cultivables per litre es trobaven en el rang de  $10^2$  a  $10^4$  ufp·L<sup>-1</sup>.

Els microorganismes indicadors doncs, han de trobar-se als tipus d'aigua a analitzar per tal que puguin acomplir amb el seu propòsit. Les taules 5.1.2.1, 5.1.2.2 i 5.1.2.3 recullen valors d'alguns d'aquests microorganismes en diferents tipus de mostres ambientals.

**Taula 5.1.2.1.** Concentració de microorganismes presents en aigües residuals europees que s'utilitzen com a indicadors de contaminació fecal. Adaptat de Contreras-Coll et al (2002).

Microorganisme Indicador	Concentració en aigua residual (uog ·100 mL <sup>-1</sup> )
Coliformes totals	7-9
Coliformes fecals	6-8
Enterococs	5-7
<i>E. coli</i>	6-8
Espores de clostridis sulfito-reductors	4
Colifags somàtics	6-8
Bacteriòfags F-específics d'ARN	5-7
Bacteriòfags que infecten <i>Bact. fragilis</i>	4-6

**Taula 5.1.2.2.** Concentracions de microorganismes indicadors en aigües de bany d'Europa. Les platges foren seleccionades per tal que presentessin valors d'*E. coli* entre 10 i 1000 ufc ·100 mL<sup>-1</sup>. Adaptat de Contreras-Coll et al (2002).

Microorganisme Indicador	Concentració en aigües de bany (uog ·100 mL <sup>-1</sup> )
<i>E. coli</i>	1-3
Enterococs	1-3
Colifags somàtics	2-4
Bacteriòfags F-específics d'ARN	0-1
Bacteriòfags que infecten <i>Bact. Fragilis</i> RYC 2056	0-1

**Taula 5.1.2.3.** Concentracions de microorganismes indicadors en aigua de rius d'Europa i Sud Amèrica. Adaptat de Lucena et al (2003).

Microorganisme Indicador	Concentració en aigua de riu (uog ·100 mL <sup>-1</sup> )
Coliformes fecals	3,5-4
Enterococs	3
Colifags somàtics	3,5-4
Bacteriòfags F-específics d'ARN	2,5
Bacteriòfags que infecten <i>Bact. fragilis</i>	1,5
Espores de clostridis sulfito-reductors	2,5

Com a **objectius** del present capítol es plantejà:

- Conèixer si els mètodes de quantificació i detecció desenvolupats proporcionaven un quadre de nombre i diversitat d'enterovirus en aigües contaminades del nostre entorn diferent del que es tenia.
- Comprovar si aquests mateixos mètodes permeten una apreciació diferent dels resultats d'eliminació d'enterovirus en EDARs.
- Comparar els valors d'enterovirus amb els de diferents indicadors per als que es disposa de mètodes estandarditzats, en diferents tipus d'aigües.
- Comprovar si amb les noves tècniques més acurades de quantificació de virus poden establir-se relacions entre els enterovirus i els indicadors microbiològics.

---

## 5.2 MATERIAL I MÈTODES

---

### 5.2.1 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA RESIDUAL. QUANTIFICACIÓ I IDENTIFICACIÓ D'ENTEROVIRUS

#### 5.2.1.1 Mostres

Les mostres d'aigua residual bruta i tractada es prengueren de dues estacions depuradores d'aigua residual (EDARs) de la província de Barcelona; EDAR Gavà-Viladecans i EDAR Sant Adrià de Besòs. Les característiques de funcionament d'ambdues EDAR es descriuen al Capítol 2 d'aquesta memòria de tesi. Breument, a l'EDAR Gavà-Viladecans s'aplica un tractament biològic a l'aigua residual principalment urbana mentre que a l'EDAR Sant Adrià de Besòs el tractament és físico-químic. L'elecció de mostres, a més de l'obtenció de valors, va permetre estimar la distribució temporal d'enterovirus i càlculs de reducció de virus cultivables en aigua residual pel tractament secundari en l'EDAR biològica.

#### 5.2.1.2 Quantificació i identificació de virus cultivables

Totes les mostres d'aigua residual bruta i tractada segueixen el mateix procediment per a la determinació d'enterovirus des del moment de la seva arribada al laboratori.

- Es descontaminaren per filtració a través de filtres esterilitzants de 0,22 µm de PVDF *-polyvinylidene fluoride-* (Sterivex-GV, SVGV B1010, Millipore) o de 0,22 µm de PES *-polyethersulfone-* (Sterivex-GP, SVGP B1010, Millipore) ambdós caracteritzats per ésser filtres de baixa adsorció proteica.
- Seguidament es condicionaren les mostres amb MgCl<sub>2</sub> fins obtenir una concentració final de 0,05 M.
- Finalment, l'enumeració d'enterovirus cultivables es realitzà utilitzant els diferents procediments de quantificació descrits; el mètode de monocapa (Annex I: "Inoculació de mostres en medi sòlid. Mètode de Monocapa"), el mètode Viraden (Capítol 1) i el mètode de doble capa (Capítol 4). Els volums

de mostra assajats amb cadascun dels mètodes es recullen a la taula 5.2.1.2.1.

**Taula 5.2.1.2.1.** Volums analitzats per a les determinacions de virus cultivables en aigua residual bruta i tractada utilitzant els mètodes de quantificació de monocapa, Viraden i de doble capa.

Tipus de mostra	Monocapa		Viraden		Doble Capa	
	Plaques <sup>a</sup>	Volum <sup>b</sup>	Plaques	Volum	Plaques	Volum
<b>Aigua residual bruta</b>	10	2 mL	2	1 mL	5	1 mL
			2	10 mL	5	2 mL
<b>Aigua residual tractada</b>			2	20 mL	10	2 mL
			2	50 mL		

<sup>a</sup> Nombre de plaques per cada determinació

<sup>b</sup> Volum de mostra en cada placa

## 5.2.2 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA DE RIU

### 5.2.2.1 Mostres

Les mostres d'aigua de riu es recolliren al punt de captació de l'Estació de Tractament d'Aigües Potables (ETAP) del Consorci Aigües Ter Llobregat ubicada al municipi d'Abrera, al curs baix del riu Llobregat.

### 5.2.2.2 Determinació d'indicadors

Es realitzaren les anàlisi corresponents per a l'enumeració de diferents microorganismes; els coliformes fecals, els colifags somàtics, els fags F-específics d'ARN de *Salmonella typhimurium* WG49, els bacteriòfags que infecten la soca RYC2056 de *Bacteroides fragilis* i els bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

#### **5.2.2.2.1 Determinació de coliformes fecals**

A partir de la mostra d'aigua de riu es procedí enumerant bacteris coliformes fecals emprant la tècnica de filtració en membrana i utilitzant com a medi de cultiu el medi m FC com es descriu a l'Annex I. Es realitzà la filtració de volums de 0,1 mL, 1 mL i 10 mL per duplicat. Els resultats del recompte d'unitats formadores de colònies es referiren a volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.2.2.2 Determinació de colifags somàtics**

Per a la determinació dels bacteriòfags, les mostres d'aigua de riu es descontaminaren per filtració a través de filtres de 0,22 µm de PVDF i seguidament es procedí a l'enumeració dels colifags somàtics seguint el mètode de quantificació de bacteriòfags per doble capa d'agar, emprant com a bacteri hoste *E. coli* WG5 segons normativa ISO 10705-2 (Anònim, 2000).

Es titularen 5 mL de mostra en total, aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre. Els resultats del recompte d'unitats formadores de clapes es referiren a volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.2.2.3 Determinació de bacteriòfags F-específics d'ARN**

Amb la mostra d'aigua de riu es procedí descontaminant per filtració i titulant els bacteriòfags seguint normativa ISO 10705-1 (Anònim, 1995). S'analitzaren volums de mostra de 5 mL per placa de Petri de 140 mm de diàmetre. L'anàlisi es realitzà per duplicat emprant plaques amb medi semisòlid amb i sense ARNasa. Amb el recompte de clapes en ambdues plaques es calculà el nombre de bacteriòfags F-específics amb genoma ARN.

#### **5.2.2.2.4 Determinació de bacteriòfags que infecten la soca RYC2056 de Bacteroides fragilis**

Es procedí concentrant 25 mL d'aigua de riu i descontaminant l'el·luït per filtració. A partir d'aquí, es titulà directament seguint normativa ISO 10705-4 (Anònim,



2001) emprant la soca RYC2056 de *Bacteroides fragilis*, titulant tot el volum de l'elúit aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre.

#### **5.2.2.2.5 Determinació de bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de Bacteroides thetaiotaomicron**

A partir de la mostra d'aigua de riu descontaminada per filtració a través de filtres de 0,22 µm de PVDF es procedí a l'enumeració dels bacteriòfags presents a la mostra capaços d'infectar la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* seguint el mateix procediment que marca la ISO 10705-4 per a l'enumeració de bacteriòfags que infecten *Bacteroides fragilis* (Anònim, 2001) però utilitzant en aquest cas la soca GA-17 com a bacteri hoste. Els medis de cultiu foren els mateixos.

La soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* s'aïllà al laboratori a partir d'aigua residual i es seleccionà d'entre centenars de soques ja que mostrà recomptes de bacteriòfags en aigua residual superiors als que s'obtenien amb les soques de *Bacteroides fragilis* emprades fins llavors (*Bact. fragilis* HSP40 i *Bact. fragilis* RYC2056). L'aïllament i caracterització de la soca fou dut a terme per la Dra. Maite Muniesa.

Per a l'estudi es realitzà la titulació dels bacteriòfags a partir de cultius de la soca GA-17 de tota la nit que es reinocularen en medi BPRM fresc fent una dilució 1:100 i es feren créixer de nou fins obtenir valors de D.O. 620 nm que es situessin entre 0,3 i 0,5.

Es realitzà el recompte de 10 mL de mostra en total, titulant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre. Els resultats del recompte d'unitats formadores de clapes es referiren a volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.2.3 Determinació d'enterovirus**

Les mostres s'analitzaren en paral·lel aplicant el mètode Viraden i de doble capa a volums d'1 a 2 litres de mostra d'aigua de riu crua. Els resultats de la comparació dels mètodes es presenten al Capítol 4. Per a la comparació amb els valors dels diferents indicadors microbiològics o virològics s'utilitzà el valor d'enterovirus quantificable més alt, obtingut independentment del mètode de quantificació utilitzat.

## 5.2.3 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA DE MAR

### 5.2.3.1 Mostres

Les mostres emprades per a l'estudi de les densitats d'enterovirus en aigua de mar, es recolliren en dues platges de la zona metropolitana de Barcelona que es troben sota la influència dels emissaris corresponents a dues EDARs (concretament, les EDARs referides anteriorment en aquest mateix estudi).

Les mostres es varen recollir durant un període que va incloure mesos de primavera, estiu i tardor de 2002. Calgueren volums de 10 litres d'aigua de mar per a cadascuna de les anàlisi d'enterovirus i un volum addicional de 2 litres per a la resta de determinacions microbiològiques. Aquests volums de mostra es recolliren en bidons de 20 litres de capacitat que havien estat prèviament descontaminats per contacte amb una solució d'hipoclorit sòdic 0,1% durant 30 minuts. El clor residual es neutralitzà per contacte amb una solució de tiosulfat sòdic 0,05‰ (Annex II) durant 30 minuts. Les mostres es processaren immediatament a l'arribada al laboratori, procedint amb les determinacions microbiològiques que es descriuen a continuació.

### 5.2.3.2 Determinació d'indicadors

#### 5.2.3.2.1 Determinació d'Escherichia coli

Emprant la tècnica de filtració en membrana i utilitzant com a medi de cultiu el medi LMX Fluorocult aplicant el procediment descrit a l'Annex I, s'analitzaren volums de mostra de 10 i 100 mL per duplicat. El total de colònies crescudes damunt aquest medi correspongueren al recompte de coliformes fecals.

Es realitzaren determinacions d'*E. coli* en paral·lel a les mateixes mostres emprant una tècnica per al recompte d'*Escherichia coli* en aigües superficials i residuals basada en un micromètode de sembra en medi líquid anomenat MUG/EC METHOD (53782-53785, Bio-Rad). Aquest mètode, recomanat per a la determinació d'*E. coli* en aigua de mar, es basa en la determinació d'*Escherichia coli* mitjançant la detecció d'un enzim present en aquest bacteri ( $\beta$ -glucuronidasa) el substrat del qual (4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurònic, MUG) es troba deshidratat als pous de la microplaca. El substrat es rehidrata amb les dilucions de l'aigua a analitzar. En presència de l'enzim el substrat

allibera un compost fluorescent que es revela mitjançant llum ultravioleta. Un cop efectuada la lectura i el recompte dels pous que presenten fluorescència es pot estimar el nombre d'*E. coli* presents a la mostra basant-se en l'aplicació del NMP (Nombre Más Probable). La taula per al càlcul directe del nombre més probable a partir del nombre de pous que presenten fluorescència es recull a l'Annex I.

Per a aigües de mar a nivell de platja es recomana efectuar dues dilucions (1/2 i 1/20) de la mostra i inocular 64 i 32 pous respectivament amb cadascuna d'elles. En el nostre cas es realitzà només la dilució 1/2 i s'inocularen els 96 pous amb aquesta dilució procedint-se com es descriu a continuació.

- Es prepararen les dilucions 1/2 de les mostres utilitzant PBS 1x estèril com a diluent i seguidament es procedí a disposar l'inòcul als pous, treballant en condicions d'asèpsia. El volum de dilució de la mostra a cadascun dels pous fou de 200 µL.
- Un cop plens tots els pous, es tapà la microplaca amb una fulla de paper adhesiu transparent i s'incubaren les plaques un mínim de 36 hores a 44°C.
- Els pous que presentaren creixement a 44°C (sediment al fons del pou) i fluorescència blava quan s'irradiaven amb llum UV correspongueren al recompte positiu. La lectura es realitzà a les 36 hores aproximadament. Aquesta lectura pot eventualment aplaçar-se fins a un màxim de 72 hores.
- Per a la determinació del valor de NMP de microorganismes havent aplicat el mètode com s'ha descrit es disposà d'una taula que proporcionà directament el NMP de bacteris en 100 mL de mostra a partir del nombre de pous positius (Annex I; Taula A-I.6).

#### **5.2.3.2.2 Determinació d'enterococs fecals**

Emprant la tècnica de filtració en membrana i utilitzant com a medi de cultiu el medi mEnterococcus i confirmació sobre el medi de cultiu Bilis Esculina, aplicant el procediment descrit a l'Annex I, s'analitzaren volums de mostra de 10 i 100 mL per duplicat.

Es realitzaren determinacions d'enterococs en paral·lel a les mateixes mostres emprant la tècnica descrita a l'apartat anterior però en aquest cas emprant les microplaques indicades per al recompte d'enterococs en aigües superficials i residuals MUD/SF METHOD (53783-53786, Bio-Rad). El principi és el mateix que en el cas de la determinació d'*E. coli* però per als enterococs l'enzim que es detecta és la  $\beta$ -

glucosidasa present en tots els enterococs i, el substrat fluorogènic emprat és el MUD (4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucòsid).

Per a la determinació d'enterococs es realitzaren igualment les dilucions 1/2 de les mostres en PBS 1x estèril i es seguí el procediment descrit a l'apartat anterior.

Cal una microplaca per a cada mostra a analitzar.

#### **5.2.3.2.3 Determinació de colifags somàtics**

Aplicant el mateix procediment descrit per a la determinació de colifags somàtics en aigua de riu es procedí titulant 10 mL de mostra d'aigua de mar en total, aplicant 5 mL de mostra per placa de Petri de 140 mm de diàmetre. Els resultats del recompte d'unitats formadores de clapes es referiren a volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.3.2.4 Determinació de bacteriòfags F-específics i somàtics de Salmonella WG49 (F-totals) i de fags F-específics d'ARN**

Amb la mostra d'aigua de mar es procedí amb el protocol de concentració de bacteriòfags (Annex I) filtrant 200 mL de mostra. El volum escollit per a la concentració fou de 200 mL ja que es descriuen percentatges de recuperació de bacteriòfags emprant aquest mètode de concentració del 50% (Contreras-Coll et al, 2002). Al voler el resultat d'ufp per 100 mL de mostra, filtrant-ne 200 mL, es corregí el percentatge de recuperació descrit.

L'el·luït procedent de la concentració es descontaminà per filtració i es procedí directament amb la titulació dels bacteriòfags seguint normativa ISO 10705-1 (Anònim, 1995) titulant tot el volum de l'el·luït aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre emprant només el procediment per a la determinació per als bacteriòfags F-específics totals (és a dir utilitzant medi TYGAss sense ARNasa). La suma del recompte d'unitats formadores de clapes de totes les plaques correspongué directament al nombre de bacteriòfags en volums de 100 mL de mostra.

Quan es detectà la presència de clapes de bacteriòfags F-específics totals (amb genomes ADN i ARN), es procedí a l'aïllament d'aquestes (Annex I) i a la determinació del percentatge de fags F-específics d'ARN i al seu genotipatge segons el procediment establert per Schaper i Jofre (2001). Breument, un cop es disposà de la suspensió de bacteriòfags que provenia de cadascuna de les clapes, es realitzà un test

de la gota sobre la soca de *Salmonella typhimurium* WG49 emprant, en paral·lel, TYGAss amb i sense ARNasa per tal de determinar el nombre de bacteriòfags F-específics d'ARN i, a partir de les plaques on es realitzà el test de la gota sense ARNasa, es realitzà la transferència de l'àcid nucleic dels fags a membranes de niló i es seguí amb el procediment descrit per al genotipatge d'aquests (Schaper i Jofre, 2001).

#### **5.2.3.2.5 Determinació de bacteriòfags que infecten la soca RYC2056 de Bacteroides fragilis**

Es procedí com en el cas anterior, concentrant 200 mL d'aigua de mar i descontaminant l'eluí per filtració. A partir d'aquí, es titulà directament seguint normativa ISO 10705-4 (Anònim, 2001) emprant la soca RYC2056 de *Bacteroides fragilis*, titulant tot el volum de l'eluí aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre. La suma del recompte d'unitats formadores de clapes de totes les plaques correspongué directament al nombre de bacteriòfags en volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.3.2.6 Determinació de bacteriòfags que infecten la soca HSP40 de Bacteroides fragilis**

Es procedí com en els casos anteriors, concentrant 200 mL d'aigua de mar i descontaminant l'eluí per filtració. A partir d'aquí, es titulà directament seguint normativa ISO 10705-4 (Anònim, 2001) emprant la soca HSP40 de *Bacteroides fragilis*, titulant tot el volum de l'eluí aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre. La suma del recompte d'unitats formadores de clapes de totes les plaques correspongué directament al nombre de bacteriòfags en volums de 100 mL de mostra.

#### **5.2.3.2.7 Determinació de bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de Bacteroides thetaiotaomicron**

Com en els casos anteriors, es concentraren 200 mL d'aigua de mar i es descontaminà l'eluí per filtració. A partir d'aquest punt es procedí directament amb la titulació dels bacteriòfags seguint normativa ISO 10705-4 (Anònim, 2001) emprant la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*, titulant tot el volum de l'eluí aplicant 1 mL de mostra per placa de Petri de 90 mm de diàmetre. La suma del recompte

d'unitats formadores de clapes de totes les plaques correspongué directament al nombre de bacteriòfags en volums de 100 mL de mostra.

### **5.2.3.3 Determinació d'enterovirus**

#### **5.2.3.3.1 Determinació d'enterovirus cultivables**

Les determinacions d'enterovirus en aigua de mar es realitzaren utilitzant els mètodes de concentració per pols de vidre i enumeració per doble capa i el mètode de concentració enumeració Viraden en plaques de 90 mm de diàmetre com s'indica en el Capítol 4.

#### **5.2.3.3.2 Determinació de la presència d'ARN d'enterovirus per RT-PCR**

Es seguí el procediment descrit per Pina et al (1998) el qual consistí en la concentració de volums de 500 mL d'aigua de mar per tal de realitzar posteriorment l'anàlisi de la presència de genomes de virus per RT-PCR i PCR imbricada. El procediment que es seguí es descriu a continuació.

- Es filtraren volums de 500 mL de mostra per filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus d'èsters de cel·lulosa i 47 mm de diàmetre (GSWP 047 00, Millipore).
- Un cop filtrat tot el volum de mostra, es disposà el filtre dins una placa de Petri estèril de 50 mm de diàmetre i s'eluí mitjançant agitació orbital durant 30 minuts amb 2 mL de tampó glicina pH 10,5.
- Es recuperà l'eluí en un tub de 10 mL de capacitat estèril i s'afegiren 2 mL de PBS 2 x.
- El volum obtingut es filtrà emprant filtres Amicon® Ultra 100.000 (MWCO, UFC810096, Millipore) procedint amb la centrifugació d'aquests a 2000 xg fins que el volum final damunt el filtre fou de 100 a 150 µL aproximadament. En els casos en que no quedà volum de mostra damunt el filtre després de centrifugar, s'afegí un volum de 150 µL de PBS 1x estèril per tal de recuperar els virus disposats damunt el filtre.
- Es recuperà el volum de mostra restant i es procedí amb l'extracció d'ARN viral emprant el kit d'extracció QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) com es detalla a l'Annex I.

- S'amplificà el fragment dels genomes d'enterovirus mitjançant la reacció de RT-PCR i PCR imbricada (Annex I) emprant els cebadors EP1 i EP4 i nEP1 i nEP4 descrits al Capítol 4.

---

## 5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

### 5.3.1 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA RESIDUAL. QUANTIFICACIÓ I IDENTIFICACIÓ D'ENTEROVIRUS

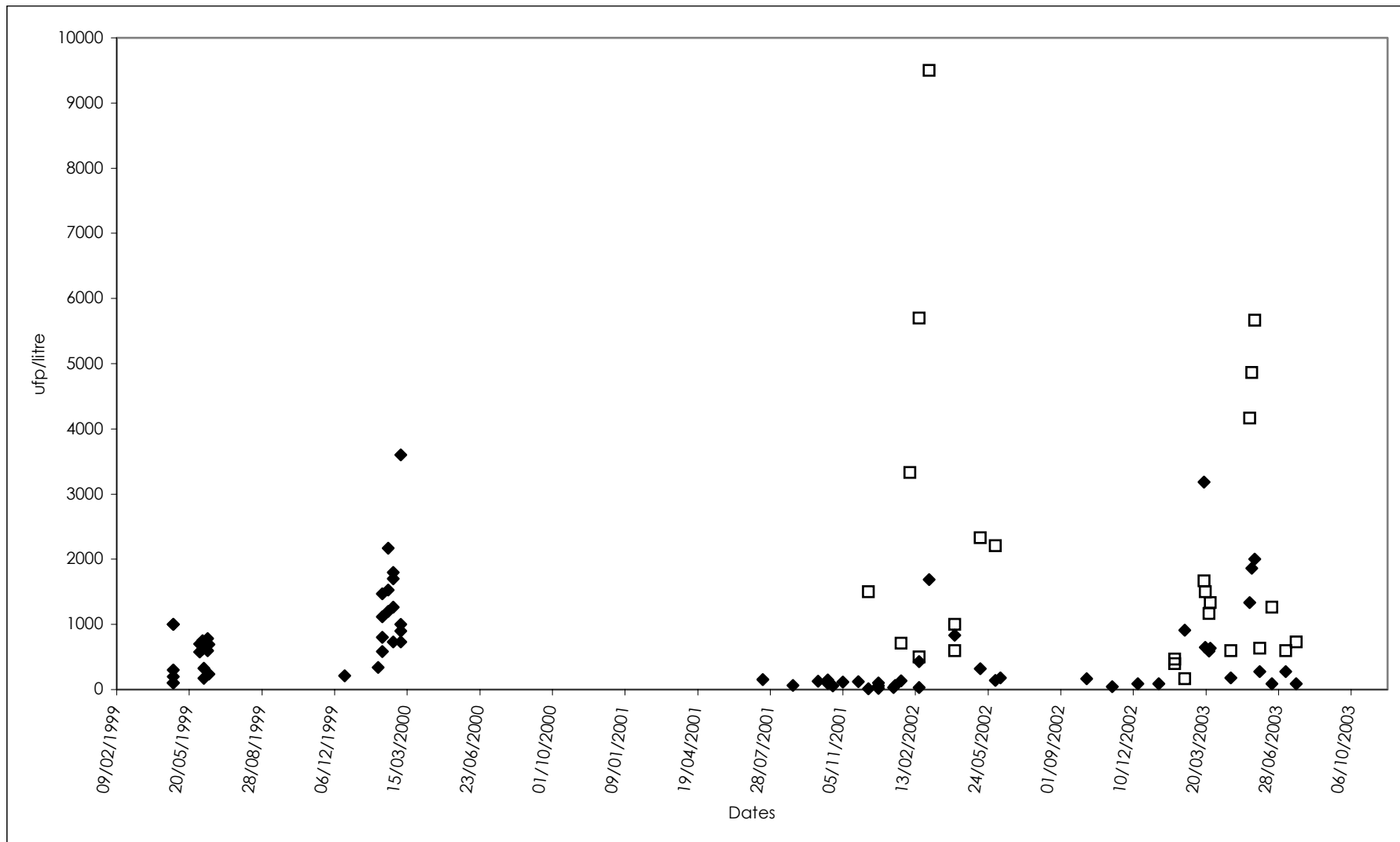
#### 5.3.1.1 Determinació de virus cultivables en aigua residual bruta

El percentatge de mostres (50 mL) d'aigua residual bruta en les que es detecten enterovirus per cultiu cel·lular, és 100% independentment del mètode de quantificació utilitzat, el mètode de monocapa, el mètode Viraden i el mètode de doble capa. Altres resultats del treball, amb volums de mostra analitzats inferiors mostren percentatges de mostres amb resultat positiu i quantificable d'enterovirus lleugerament inferiors.

Els valors d'enterovirus en les aigües residuals brutes estudiades poden variar des de  $5 \cdot 10^1$  a  $10^4$  ufp·L<sup>-1</sup> depenent principalment, del mètode de quantificació, de la línia cel·lular utilitzada per a l'aïllament i, com es veurà mes endavant, de l'època de l'any. No es realitzaren anàlisi de microorganismes indicadors per la gran informació que ja hi ha d'arreu del món i molt concretament de les aigües residuals estudiades (Taula 5.1.2.1).

La determinació més o menys continuada al llarg d'un període de 3 a 4 anys (1999–2003) ha permès observar una certa distribució estacional dels enterovirus presents en aigua residual bruta d'origen urbà en dues EDARs de l'àrea metropolitana de Barcelona.





**Figura 5.3.1.1.1.** Enterovirus en aigua residual bruta enumerats emprant el mètode Viraden (◆) o el mètode de doble capa (□).

Efectivament, a partir dels resultats (Figura 5.3.1.1.1) s'observa una estacionalitat en la magnitud de la contaminació per enterovirus, principalment amb els valors obtinguts per Viraden, els quals corresponen a períodes de seguiment més llargs. S'observen increments d'enterovirus en aigua residual bruta a partir del mes de març i fins a començaments d'estiu. Queden doncs, els pics lleugerament desplaçats respecte als períodes d'augment de presència d'enterovirus en aigua residual que es descriuen tradicionalment per als climes temperats, on els increments en el nombre d'enterovirus es localitzen a l'estiu i la tardor (Metcalf et al, 1995; Sedmak et al, 2003). D'altra banda estudis que detecten pics d'enterovirus a la tardor i l'hivern, tot i caracteritzar les zones de clima temperat, corresponen a zones situades a latituds més altes (Finlàndia). En diversos estudis realitzats a Europa (França i Regne Unit), els pics de virus en aigua residual es troben durant la primavera i l'estiu (Block et al, 1979; Morris, 1984). Altres estudis, (Nova Zelanda) informen de valors d'enterovirus més elevats a l'estiu i a l'hivern amb una distribució durant l'any que no segueix tant la tendència observada en el nostre cas (Green i Lewis, 1999).

### **5.3.1.2 Identificació d'enterovirus en aigua residual bruta**

En alguns casos, per a les mostres analitzades a partir de l'any 2001 i fins a finals de 2002, es realitzà un aïllament de virus a partir de les clapes obtingudes en l'enumeració de virus cultivables. Aquests aïllaments es caracteritzaren, després de l'obtenció de presumptes cultius purs de cadascun d'ells, emprant tècniques d'amplificació d'ARN per RT-PCR amb els cebadors EP1-EP4 i, de restricció de l'ADN amplificat i anàlisi per RFLP seguint els procediments descrits a l'Annex I i al Capítol 4 d'aquesta memòria. A partir dels resultats de totes les identificacions dels enterovirus aïllats de mostres d'aigua residual es construí la taula 5.3.1.2.1 que mostra els percentatges dels diferents enterovirus presents en aquest tipus de mostra. Cal notar que aquests resultats corresponen als aïllaments virals identificats sense considerar la línia cel·lular emprada en al determinació (BGM, CaCo-2 o PLC/PRF/5).

La identificació d'alguns dels aïllaments d'enterovirus no es pogué realitzar totalment per anàlisi de RFLP, quan els patrons no corresponien a aquells que s'obtenien a partir de les seqüències dels diferents enterovirus tipus i les seves diferents soques, com s'especifica al Capítol 4. En aquest cas se'ls aplica com a nom, un nombre de patró RFLP corresponent a un codi intern d'identificació d'aïllaments. D'aquesta manera, a

més dels enterovirus identificats, s'obtenen enterovirus amb patrons d'identificació 1, 7 i 9 la descripció dels quals es detalla a la taula 4.3.1.2.1.5.1.

**Taula 5.3.1.2.1.** Percentatge d'enterovirus en aigua residual bruta que es detecten independentment de la línia cel·lular emprada en l'aïllament (168 aïllaments corresponents a 17 mostres que es van prendre regularment en el període que va de novembre de 2001 fins al desembre de 2002).

<b>Enterovirus</b>	<b>Percentatge</b>
Patró 1	8
Patró 7	1,9
Patró 9	0,6
Poliovirus 1*	9,9
Poliovirus 2-Echovirus 7	2,5
Poliovirus 3*	1,2
Coxsackievirus B1	1,2
Coxsackievirus B2-B3, Echovirus 1, Echovirus 5	3,7
Coxsackievirus B4 - Echovirus 4	0,6
Coxsackievirus B5 (Faulkner)	1,9
Coxsackievirus B6	0,6
<b>Echovirus 6</b>	<b>45,1</b>
Echovirus 11 (Metcalf)	15,4
Echovirus 12	0,6
Echovirus 30	6,8

\*Els virus identificats com a poliovirus 1 i 3 poden incloure tipus vacunals, salvatges o VDPVs (Vaccine Derived Polioviruses)

Les identificacions realitzades per comparació i anàlisi de les seqüències nucleotídiques produeixen com a resultat per als patrons 1 i 7, la seva identificació com echovirus 25 i echovirus 19 respectivament, com s'ha dit anteriorment al Capítol 4.

Pel que fa als tipus d'enterovirus que es descriuen aïllats a partir d'aigua residual, Sellwood et al (1981) troben echovirus 6, 19 i 3 i coxsackievirus B4, B5 i A9 com a serotips d'enterovirus més comuns en aigua residual a Gran Bretanya. Tots els poliovirus aïllats corresponen a soques vacunals. I es detecta reovirus tipus 2 com a virus abundant. En el nostre cas els serotips més abundants també pertanyen a echovirus 6, mentre que no es detecten coxsackievirus B com a serotips abundants en aigua residual. Una

segona coincidència es trobaria si els aïllaments ambientals corresponents al patró 7 fossin realment echovirus 19 (94% d'homologia nucleotídica per al fragment analitzat), tot i que en el nostre cas, aquest no correspondria a un serotip majoritari. Els percentatges d'aïllaments en aigua residual d'echovirus 11, 12 i 30 i de coxsackievirus B1 i poliovirus 1, coincideixen amb els descrits a la bibliografia (Taula 5.1.1.2).

Prenent el cas de poliovirus, a la bibliografia es troben treballs en que s'aïllen els tres tipus de poliovirus (1, 2 i 3) a partir d'aigua residual a diverses zones geogràfiques. Els tipus de poliovirus que s'aïllen són salvatges i vacunals si es prenen totes les dades en conjunt (Taula 5.1.1.2). La presència de poliovirus en aigua residual entesa com el percentatge d'aïllaments identificats com a tal, és variable (Taula 5.1.1.2) podent arribar al 100% en determinades mostres (Lucena et al, 1985). En el nostre cas podem afirmar que s'aïlla poliovirus 1 i 3 ja que el patró RFLP de poliovirus 2 per a la regió analitzada coincideix amb echovirus 7.

En l'entorn en el que hem pres les mostres per a l'estudi s'aïllen tots els tipus (1-6) de coxsackievirus B tot i que no presenten percentatges d'aïllament tan alts com els descrits per altres autors (Taula 5.1.1.2).

Estudis basats en identificació d'enterovirus durant períodes llargs (diferents anys) conclouen que el tipus majoritari d'enterovirus en aigua residual varia d'any en any (Sedmak et al, 2003). Així, podem afirmar, que el serotip d'enterovirus majoritari durant l'any 2002 a l'aigua residual analitzada fou echovirus 6.

### **5.3.1.3 Determinació de virus cultivables en aigua residual tractada**

Amb les determinacions de virus cultivables en aigua residual bruta i tractada es calculen els percentatges d'eliminació de virus per tractament biològic en l'EDAR estudiada. Els resultats (Taula 5.3.1.3.1) mostren valors d'eliminació mitjans d'1,3 logaritmes decimals o del 94,1%.

Pel que fa al percentatge de mostres d'aigua residual tractada positives per la presència d'enterovirus cultivables, aquest és del 100% si no es considera el mètode de quantificació utilitzat.

**Taula 5.3.1.3.1.** Eliminació d'enterovirus cultivables en EDAR biològica utilitzant diferents mètodes de quantificació (Viraden i doble capa) i diferents línies cel·lulars (BGM, CaCo-2 i PLC/PRF/5).

	AR bruta (ufp/L)	AR tractada (ufp/L)	% eliminació
<b>Mitjana</b>	1572,6	93,1	94,1
<b>Desv. Est.</b>	1976,5	75,9	4,8
<b>Màxim</b>	8000	300	99,4
<b>Mínim</b>	91	20	50

La reducció d'enterovirus a l'EDAR biològica estudiada (94,1%) es troba dins els rangs de valors de reducció de virus descrits a la bibliografia (Taula 5.3.1.3.2). A més, coincideix amb els valors de reducció que s'obtenen per diferents indicadors microbiològics en aquesta mateixa EDAR (Duran, 2001).

**Taula 5.3.1.3.2.** Dades de percentatges de reducció d'enterovirus en EDARs.

Percentatge de reducció	Tipus de tractament de depuració	Referència
90,2*	Varis	Katzenelson i Kedmi, 1979
85 per adenovirus 28 per reovirus 93 per enterovirus	Fangs activats	Irving i Smith, 1981
91,5	Fangs activats	Hejkal et al, 1981
83	Fangs activats	Rolland et al, 1983
63 (±27) 26 (±28) 97 (±7)	Fangs activats Primari sense llacunes Primari + llacunes	Morris, 1984
99,8	Coagulació	Bosch et al, 1986
75 98	Sedimentació Biològic	Payment et al, 1986
92,2		Green i Lewis, 1999
0	Primari; físico-químic	Payment et al, 2001

\*Els valors dels percentatges de reducció en que no s'especifica el virus corresponen a enterovirus.

### 5.3.2 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA DE RIU

Els resultats corresponents a les diferents determinacions dels paràmetres microbiològics en aigua de riu es mostren a la taula 5.3.2.1 El valor d'enterovirus de les diferents mostres correspon al valor més alt obtingut independentment del mètode de quantificació utilitzat. I aquest és el valor que s'utilitza per al càlcul dels coeficients de correlació amb la resta de paràmetres (Taula 5.3.2.2).

El percentatge de mostres positives per la presència d'enterovirus cultivables varien depenent del mètode utilitzat per a la concentració-enumeració de virus, essent del 50% de mostres positives per al mètode Viraden i del 60% per a la combinació de mètodes de concentració per floculació orgànica i enumeració pel mètode de doble capa. Si es considera aquest percentatge independentment del mètode utilitzat per a la determinació, aquest s'eleva al 70%. En aquest cas cal considerar que el volum total de mostra analitzada seria de 3 litres.

**Taula 5.3.2.1.** Determinacions de microorganismes en aigua del riu Llobregat (punt de captació ETAP Abrera - ATLL).

Mostra	CF (ufc/100 mL)	SOMCPH (ufp/100 mL)	FRNAPH (ufp/100 mL)	BFPH RYC2056 (ufp/100 mL)	GA-17 PH (ufp/100 mL)	Enterovirus (ufp/L)
1	1·10 <sup>4</sup>	2,4·10 <sup>4</sup>	3,6·10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>1</sup>	1,6·10 <sup>3</sup>	0
2	3,4·10 <sup>3</sup>	1,3·10 <sup>4</sup>	8,6·10 <sup>2</sup>	4·10 <sup>1</sup>	1,9·10 <sup>3</sup>	1
3	5,1·10 <sup>3</sup>	1,6·10 <sup>4</sup>	2,4·10 <sup>2</sup>	4·10 <sup>1</sup>	1,2·10 <sup>3</sup>	1,5
4	1,5·10 <sup>4</sup>	1,7·10 <sup>4</sup>	6,8·10 <sup>2</sup>	1,2·10 <sup>2</sup>	1,1·10 <sup>3</sup>	0
5	2,7·10 <sup>3</sup>	1,9·10 <sup>4</sup>	1,8·10 <sup>3</sup>	4·10 <sup>1</sup>	9,5·10 <sup>2</sup>	0
6	6,4·10 <sup>4</sup>	5·10 <sup>4</sup>	1,6·10 <sup>3</sup>	1,4·10 <sup>2</sup>	1,4·10 <sup>4</sup>	9
7	3,7·10 <sup>3</sup>	7,7·10 <sup>3</sup>	8,2·10 <sup>2</sup>	6·10 <sup>1</sup>	1,9·10 <sup>2</sup>	1
8	4,6·10 <sup>3</sup>	8,3·10 <sup>3</sup>	7,9·10 <sup>2</sup>	4,4·10 <sup>1</sup>	1,2·10 <sup>2</sup>	3
9	4,3·10 <sup>3</sup>	7,5·10 <sup>3</sup>	1,4·10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>1</sup>	6,7·10 <sup>1</sup>	2
10	5,8·10 <sup>3</sup>	7,1·10 <sup>3</sup>	1,2·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>1</sup>	7,8·10 <sup>1</sup>	4

**CF:** coliformes fecals; **SOMCPH:** colifags somàtics; **FRNAPH:** fags F-específics amb genoma ARN; **BFPH RYC2056:** fags que infecten la soca RYC2056 de *Bacteroides fragilis*; **GA-17 PH:** bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

**Taula 5.3.2.2.** Coeficients de correlació entre els diferents paràmetres microbiològics en aigua del riu Llobregat.

	CF	SOMCPH	FRNAPH	BFPH RYC 2056	GA-17 PH	Enterovirus
CF	1					
SOMCPH	0,92					
FRNAPH	0,46	0,57				
BFPH RYC 2056	0,78	0,68	0,54			
GA-17 PH	0,97	0,93	0,55	0,73		
Enterovirus	0,82	0,62	0,25	0,45	0,82	1

Els resultats de les determinacions d'indicadors microbiològics (bacteris i fags) coincideixen amb els que es recullen anualment a les memòries "Control virològic de les ETAPs del Ter i Llobregat" elaborades per Aigües Ter Llobregat i la Universitat de Barcelona. Mentre que, per als enterovirus, els valors per litre d'aigua de riu són superiors als que recullen les memòries dels diferents anys, com ja s'ha avançat en el Capítol 4. Aquest fet pot deure's, molt possiblement, a la major sensibilitat de les noves metodologies de detecció emprades en aquest cas.

Amb els indicadors microbiològics estudiats s'estableixen correlacions entre ells i amb els enterovirus detectats amb els nous mètodes. I s'observa que els enterovirus presenten la màxima correlació amb coliformes fecals (0,82) i amb els fags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (0,82).

### 5.3.3 CARACTERITZACIÓ MICROBIOLÒGICA DE L'AIGUA DE MAR

Els resultats corresponents a les determinacions dels diferents paràmetres microbiològics en aigua de mar a les dues platges de la zona metropolitana de Barcelona analitzades, es mostren a la taula 5.3.3.1 El valor d'enterovirus a les diferents mostres correspon al valor més alt obtingut independentment del mètode de quantificació utilitzat. I aquest és el valor que s'utilitza per al càlcul dels coeficients de correlació amb la resta de paràmetres (Taula 5.3.3.2).

Pel que fa a la presència de virus cultivables, considerant les mostres d'aigua de mar analitzades, un 69% del total de mostres són positives independentment del mètode de quantificació utilitzat. En aquest cas, els resultats equivalen a volums de mostra de 20 litres i no a 10 litres (veure Capítol 4). Quan es consideren els diferents mètodes i les diferents línies cel·lulars emprades aquests percentatges són els següents: 20% per al



procediment de concentració per pols de vidre i enumeració per monocapa utilitzant cèl·lules BGM, 36% per al procediment de concentració per pols de vidre i enumeració pel mètode de doble capa utilitzant cèl·lules BGM, 57% per al mètode Viraden amb la línia cel·lular BGM i un 60% per al mètode Viraden amb la combinació de cèl·lules CaCo-2 i BGM. Clarament, el mètode Viraden és el que permet l'obtenció dels millors resultats en l'enumeració d'enterovirus cultivables en aigua de mar. Si es comparen els percentatges totals de positivitat (69%) per a volums de 20 litres (independentment del mètode de concentració i enumeració utilitzat) amb els que es poden localitzar a la bibliografia, en mostres d'aigua de mar a diferents països aquests percentatges van des del 8,7% al 45,8%. En el nostre cas el percentatge de mostres positives és superior. Comparant-lo amb mostres d'aigua de mar de platges de la província de Barcelona (Taula 5.1.1.7, Finance et al, 1982) corresponents a l'any 1979 amb percentatges que van del 50 al 100% de mostres positives, trobem els resultats obtinguts en aquest estudi dins d'aquest interval, si bé l'any 1979 el nivell de contaminació microbiològica de les mateixes platges era molt superior (Finance et al, 1982).

Pel que fa als diferents indicadors microbiològics cal fer diverses consideracions. D'una banda, dir que els valors d'*E. coli* i enterococs que es presenten a les taules de resultats corresponen als recomptes obtinguts pel mètode de NMP utilitzant microplaques ja que correspon al mètode recomanat en el borrador circulant de la Directiva pendent d'aprovar a la Unió Europea. Però, en aquelles mostres que resultaven en recomptes <10 per aquest mètode, s'inclou el valor real d'ufc·100 mL<sup>-1</sup> que s'obtenia concentrant 100 mL d'aigua de mar per filtració en membrana i enumeració amb els medis adients per a cadascun dels paràmetres. Havent comprovat que no existeixen diferències significatives entre els dos mètodes de determinació, es va creure oportú reflexar la informació d'aquesta manera.

A la taula 5.3.3.1 només es mostren els valors corresponents a fags que infecten la soca WG49 de *Salmonella typhimurium* (F-totals). Només es detectaren aquest tipus de bacteriòfags en 5 de 22 mostres (23% mostres positives), a partir de les quals es calcularen els percentatges de F-ARN del total de fags F-específics, els quals es situaren entre el 30% i el 80%. Aquests percentatges són inferiors als que s'obtenen en aigües residuals de diferents orígens (Schaper et al, 2002; De Bartolomeis i Cabelli, 1991) indicant que pot haver-se produït inactivació natural. A l'hora, només es detectaren dos genotips, el genotip I i el genotip II. I no es detectaren bacteriòfags F-específics d'ARN corresponents al genotip III, també característics d'origen de contaminació fecal humana. Aquestes dades coincideixen amb observacions publicades en que el genotip I i el genotip II (aquest segon en menor mesura) són els més resistents a la inactivació (Schaper et al, 2002; Cole et al, 2003).

Els bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* són més abundants a les diferents mostres d'aigua de mar que els fags que infecten la soca RYC2056 i la soca HSP40 de *Bacteroides fragilis*. I a més, són més abundants que els bacteriòfags F-específics i somàtics que infecten la soca WG49 de *Salmonella typhimurium* (F-totals).

Per al càlcul de les correlacions s'han utilitzat els paràmetres per als quals es disposava de valors positius (diferents de zero) per a la majoria de les mostres. Per tant, no s'han inclòs els resultats de bacteriòfags F-totals ni els de bacteriòfags que infecten les soques de *Bacteroides fragilis* HSP40 i RYC2056. Amb els càlculs es poden establir diferents correlacions i relacionar els paràmetres entre ells. Ens interessen els paràmetres que correlacionen amb major grau amb els enterovirus. Així, per a aigua de mar de la platja, els paràmetres que presenten major correlació amb enterovirus són els colifags somàtics (0,98) i els bacteriòfags que infecten *Bacteroides* GA-17 (0,80).

La correlació entre enterovirus cultivables i els enterococs a les mostres d'aigua de mar estudiades és de 0,63. Un estudi similar realitzat al Regne Unit, troba una correlació entre aquests mateixos paràmetres també en aigua de mar de 0,62 (Fleisher et al, 1996).

**Taula 5.3.3.1.** Caracterització microbiològica d'aigua de mar de dues platges de la zona metropolitana de Barcelona.

Mostra	CF	<i>E. coli</i>	Enterococs	SOMCPH	F-totals PH	BFPH HSP40	BFPH RYC2056	GA-17 PH	Enterovirus	
									ufp	RT-PCR
1	-	-	-	-	-	-	-	-	10	
2	60	0	30	110	0	0	0	4	1	-
3	<10	0	0	20	0	0	0	0	1	-
4*	-	632	32	11840	303	2	8	128	129	-
5*	-	780	10	12640	258	4	6	51	187	-
6	40	10	10	50	0	0	0	2	4	-
7	130	54	22	80	0	0	0	1	5	+
8	<10	0	10	11	0	0	0	1	0	-
9	60	0	0	9	0	0	0	1	0	-
10	120	0	3	70	0	0	1	1	1	-
11	140	32	1	90	0	0	0	2	0	-
12	-	900	32	1070	10	0	0	14	1	+
13	-	10	0	20	0	0	0	3	0	+

**Taula 5.3.3.1.** Caracterització microbiològica d'aigua de mar de dues platges de la zona metropolitana de Barcelona. (Continuació).

Mostra	CF	<i>E. coli</i>	Enterococs	SOMCPH	F-totals PH	BFPH HSP40	BFPH RYC2056	GA-17 PH	Enterovirus	
									ufp	RT-PCR
14	-	32	0	30	0	0	0	4	0	-
15	-	0	4	50	0	-	-	0	1	-
16	-	0	3	40	0	-	-	0	1	+
17	-	0	8	<10	0	-	-	0	1	-
18	-	22	10	70	0	-	-	1	tox.	-
19	-	32	38	80	0	-	-	0	tox.	-
20	-	194	84	730	2	-	-	6	4	-
21	-	194	86	700	5	-	-	9	4	-
22	-	10	19	80	0	-	-	1	1	-
23	-	10	10	40	0	-	-	0	1	-

**CF:** coliformes fecals (ufc·100 mL<sup>-1</sup>). **E. coli:** determinació d'*E. coli* emprant el mètode MUG-EC (NMP·100 mL<sup>-1</sup>) o el medi LMX-Fluorocult (ufc·100 mL<sup>-1</sup>). **Enterococs:** determinació d'enterococs emprant el mètode MUD/SF (NMP·100 mL<sup>-1</sup>) o els medis mEnterococcus agar i Bilis Esculina (ufc·100 mL<sup>-1</sup>). **SOMCPH:** colífags somàtics (ufp·100 mL<sup>-1</sup>). **F-totals:** fags somàtics i F-específics amb genomes d'ADN i ARN (ufp·100 mL<sup>-1</sup>). **BFPH HSP40:** fags que infecten la soca HSP40 de *Bacteroides fragilis*. **BFPH RYC2056:** fags que infecten la soca RYC2056 de *Bacteroides fragilis*. **GA-17 PH:** fags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*. **Enterovirus RT-PCR:** resultat de la PCR imbricada per a enterovirus (cebadors EP1-EP4).

\* A la zona d'on es prengueren les mostres 4 i 5 s'observà una taca marronosa en el moment de prendre les mostres. El valor de torbesa fou de 30 NTUs.

**Taula 5.3.3.2.** Coeficients de correlació entre els diferents paràmetres en aigua de mar (platja).

	<b><i>E. coli</i></b>	<b>CF</b>	<b>EF</b>	<b>SOMCPH</b>	<b>GA-17 PH</b>	<b>Enterovirus</b>
<b><i>E. coli</i></b>	1,00					
<b>CF</b>	0,82	1,00				
<b>EF</b>	0,52	-0,70	1,00			
<b>SOMCPH</b>	0,72	0,40	0,58	1,00		
<b>GA-17 PH</b>	0,63	-0,39	0,50	0,89	1,00	
<b>Enterovirus</b>	0,66	-0,04	0,63	<b>0,98</b>	<b>0,80</b>	1,00

Quan s'observen les relacions entre els nombres dels diferents indicadors a les mostres d'aigua de mar a nivell de platja, les relacions entre els colifags somàtics i els bacteris indicadors s'allunyen respecte les mostres d'aigua residual invertint-se les densitats de colifags somàtics respecte coliformes fecals i *E. coli*. Les relacions entre els diferents bacteriòfags, excepte amb els fags F-específics, es mantenen més properes entre elles. Pel que fa als enterovirus en aquest tipus de mostra, amb qui més es mantenen les relacions és amb colifags somàtics i amb fags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*. A l'hora, els coliformes fecals i *E. coli* són els paràmetres amb qui més s'allunyen les diferències, amb qui menys es mantenen les relacions dels enterovirus al llarg del temps.

Si es consideren les densitats dels diferents paràmetres microbiològics en aigües residuals i a l'aigua de mar estudiada i s'estimen a partir d'aquestes les reduccions logarítmiques dels diferents paràmetres (Taula 5.3.3.3), s'observa que els enterovirus cultivables en aigua de mar han patit una reducció logarítmica respecte als nivells en aigua residual semblant a la dels colifags somàtics i a la de bacteriòfags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Per a la realització d'aquests càlculs no es consideraren les mostres 4 i 5 (Taula 5.3.3.1) per tractar-se de mostres atípiques.

Aquestes observacions, sumades als coeficients de correlació en aigua de mar a nivell de platja dels diferents paràmetres microbiològics (Taula 5.3.3.2), permeten afirmar que el comportament dels enterovirus a l'ambient a partir d'un focus de contaminació pot seguir-se de manera més fidedigne amb la utilització de bacteriòfags (preferentment colifags somàtics) que amb la utilització de bacteris entèrics. Aquest fet afegeix dades sobre la utilitat dels bacteriòfags, especialment colifags somàtics, com a model per seguir el comportament dels enterovirus a

l'ambient, en aquest cas concret, en aigua de mar. Aquesta utilitat ja ha estat suggerida en estudis previs (Contreras-Coll et al, 2002).

**Taula 5.3.3.3.** Reduccions logarítmiques experimentades pels diferents paràmetres microbiològics calculades a partir de les concentracions mitjanes de cadascun d'ells en aigua residual i en les mostres d' aigua de mar estudiades.

Paràmetre	Reducció logarítmica estimada d'aigua residual a aigua de mar
Coliformes fecals	5-6
<i>E. coli</i>	5-6
Enterococs	4,5-5,5
Colifags somàtics	3,5-4
Fags F-específics	>5
Fags que infecten <i>Bacteroides fragilis</i>	>3,5
Fags que infecten <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA-17	3,5-4
Enterovirus	3,5-4

Quan s'aplicà la detecció d'enterovirus en aigua de mar per RT-PCR i PCR imbricada a partir de 500 mL de mostra, s'obtingué positivitat en un 18% de les 23 mostres d'aigua de mar a nivell de platja. Pina et al (1998) detectaren enterovirus per RT-PCR analitzant el mateix volum i tipus de mostra en un 44% de 9 mostres les quals contenien valors de coliformes fecals de l'ordre de  $10^2$  a  $10^4$  ufc · 100 mL<sup>-1</sup>. Ni en el nostre cas ni en Pina et al (1998) coincideixen resultats positius per RT-PCR amb valors d'indicadors o d'enterovirus més alts. Altres estudis de detecció d'enterovirus per RT-PCR en aigua de mar obtenen percentatges de mostres positives clarament superiors als nostres, al voltant del 80%, si bé concentren volums de mostra superiors als 500 mL (Muscillo et al, 1994; Pallin et al, 1997).

Pel que fa doncs, a la possibilitat de detectar enterovirus en aigua de mar concentrada, emprant tècniques de RT-PCR i PCR imbricada cal considerar que diferents factors (com volum i qualitat de la mostra) poden impedir l'aplicació de la metodologia amb èxit.

La qualitat exigible a les aigües de bany es recull a la Directiva 76/160/CEE del Consell, de 8 de desembre de 1975. S'entén com a aigües de bany, les aigües o part d'aquestes, continentals, corrents o estancades, així com l'aigua del mar en les que el bany està expressament autoritzat per les autoritats competents de cada Estat membre de la UE o, no estigui prohibit i es practiqui el bany habitualment per un nombre important de banyistes. Els paràmetres microbiològics contemplats en l'esmentada Directiva es detallen a la taula 5.3.3.4 i inclouen els enterovirus.

A la bibliografia es troben referenciats casos en que en àrees de bany en zones considerades amb qualitat microbiològica adequada pel que fa als indicadors bacterians, es detecta ARN viral en 14 de 16 mostres (Schvoerer et al, 2001). En aquest cas no es tracta de partícules infeccioses mentre que en el nostre cas, en platges que complien amb la Directiva 76/160/CEE quan als paràmetres bacteriològics es detecten enterovirus infecciosos cultivables sobre BGM en 10 litres d'aigua de mar. La identificació per RT-PCR dels aïllaments virals realitzats a partir de les plaques de cultiu, permet confirmar la presència de partícules víriques. Els resultats del treball permeten dir que els valors guia de coliformes fecals que marca la Directiva 76/160/CEE són útils i han de complir-se, però que calen paràmetres addicionals que garanteixin l'absència d'enterovirus. Quan una mostra d'aigua de mar no compleix amb les directrius deixa d'ésser apte per al bany, però el fet que les compleixi no garanteix la seguretat virològica. Paràmetres addicionals com l'enumeració de colifags somàtics es trobarien més a prop de la utilitat com a model per als enterovirus en aigua de bany. A més, l'anàlisi dels fags que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* afegiria informació sobre l'origen de la contaminació, indicant contaminació fecal d'origen humà (Blanch et al, 2004 en premsa).

**Taula 5.3.3.4.** Paràmetres microbiològics de qualitat que han de complir les aigües de bany segons la Directiva 76/160/CEE.

Paràmetre Microbiològic	Valor guia	Valor imperatiu
Coliformes totals/100 mL	500	10000
Coliformes fecals/100 mL	100	2000
Estreptococs fecals/100 mL	100	-
<i>Salmonella</i> /litre	-	0
Enterovirus (ufp/10 litres)	-	0

### 5.3.4. ENTEROVIRUS DETECTATS EN MOSTRES AMBIENTALS DE DIFERENTS ORIGENS

La taula 5.3.4.1 mostra els percentatges en els que s'aïllen diferents enterovirus sobre la línia cel·lular BGM a partir de mostres d'aigua residual bruta, tractada, aigua de riu i aigua de mar. Tots els aïllaments corresponen a virus obtinguts infectant cultius de cèl·lules BGM en medi sòlid emprant els mètodes Viraden i de doble capa.

**Taula 5.3.4.1.** Percentatges d'enterovirus que es detecten a les diferents mostres utilitzant la línia cel·lular BGM.

Enterovirus	AR bruta	AR tractada	Riu	Mar
Patró 1	19,6	-	-	-
Patró 7	-	-	2	-
Patró 11	-	-	2	-
Poliovirus 1	14,3	11,1	22	12,5
Poliovirus 1 Sabin	-	-	14	-
Poliovirus 1 Mahoney*	14,3	-	6	12,5
Poliovirus 3	1,8	16,6	2	-
Coxsackievirus B2-B3, Echovirus 1, Echovirus 5	1,8	-	2	5,2
Coxsackievirus B4 - Echovirus 4	-	-	-	1,7
Coxsackievirus B5	-	16,6	22	32,8
Coxsackievirus B5 (Faulkner)	-	5,5	-	5,2
Coxsackievirus B6	1,8	-	-	-
Echovirus 6	60,7	22,2	30	36,2
Echovirus 9	-	-	2	-
Echovirus 11 (Metcalf)	-	11,1	4	1,7
Echovirus 30	-	-	12	1,7
Enterovirus Yambian (96-83 csf)	-	5,5	-	-
<b>Nombre d'aïllaments identificats</b>	<b>56</b>	<b>18</b>	<b>50</b>	<b>58</b>

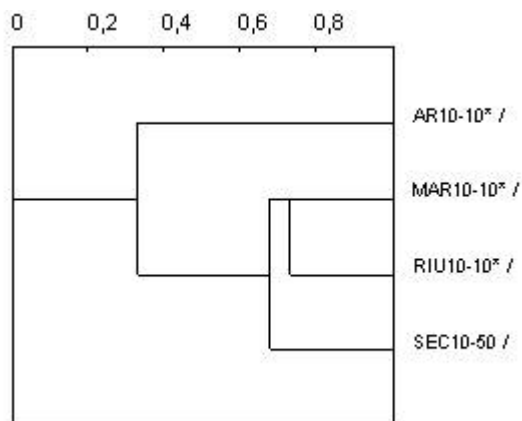
\*La categoria poliovirus 1 Mahoney pot incloure poliovirus del tipus salvatge o VDPVs

Amb les caracteritzacions dels diferents aïllaments virals als diferents tipus de mostra, aigua residual, mar i riu, es calcularen els índexs de diversitat de Simpson (Di) i els índexs de similitud de poblacions (Sp) segons Kühn et al (1991). Els índexs de diversitat de Simpson es calcularen per als quatre tipus de mostres considerant tots els aïllaments virals de cadascuna d'elles. Els resultats foren de 0,47 per a aigua residual i de 0,69 per a aigua de riu i aigua de mar. Aquests resultats indiquen que les poblacions



d'enterovirus en aigua de mar i aigua de riu presenten major diversitat que en aigua residual. Per a l'aigua dels decantadors secundaris (aigua residual tractada) la diversitat calculada és de 0,81 però cal prendre aquest resultat amb cura pel reduït nombre d'aïllaments virals estudiats en aquest cas.

L'índex de similitud de les poblacions ( $S_p$ ) es calculà considerant tots els aïllaments virals agrupats segons les mostres de les que provenien. Els resultats (Figura 5.3.4.1) indiquen que les poblacions virals de mar i riu són les més semblants, seguint les poblacions d'aigua residual tractada, amb valors superiors a 0,6. Aquestes tres poblacions s'agrupen i queden allunyades de les d'aigua residual bruta, amb les que presenten una similitud més baixa (0,3). Cal però de nou, interpretar amb cura els resultats corresponents a aigua residual tractada pel reduït nombre d'aïllaments identificats.



**Figura 5.3.4.1.** Similitud de poblacions de virus en aigua residual bruta (AR), aigua de mar (MAR) aigua de riu (RIU) i aigua residual tractada (SEC).

El fet que poblacions allunyades de la font de contaminació (aigua residual bruta), que han sofert processos de tractament i de depuració natural presentin major diversitat pel que fa al tipus de virus, amb els mètodes de detecció emprats, i major similitud entre elles, podria deure's al fet que es produís una inactivació diferencial entre els diferents virus, essent els que s'aïllen més freqüentment en aigua residual, els que patirien una major inactivació. En aquest sentit, destacar l'increment en els percentatges d'aïllaments de coxsackievirus B5 en aigua de mar respecte a aigua residual i notar el fet que aquest virus apareix sovint com l'enterovirus més resistent a les diferents condicions d'inactivació assajades durant el treball, que es recullen al Capítol 3 d'aquesta memòria.

Pel que fa als aïllaments d'enterovirus identificats en aigua de riu, un 22% són poliovirus i un 24% són coxsackievirus B. Comparant aquestes dades amb les trobades a la bibliografia (Taula 5.1.1.4), coincideixen en el percentatge de presència de coxsackievirus B que trobaren Lucena et al (1985) al riu Llobregat. Pel que fa a poliovirus, en tots els casos de detecció d'enterovirus en aigua de riu trobats a la bibliografia, apareixen com els virus majoritaris, mentre que en el nostre cas, els virus que s'aïllen en major percentatge són echovirus, amb el predomini d'echovirus 6 que s'aïlla a tots els tipus de mostra analitzats. El descens de la presència de poliovirus a l'ambient respecte anys passats (comptant 25 anys en darrera) podria tenir diverses explicacions. Entre d'altres, el fet que amb els anys s'ha produït un descens de natalitat i població infantil i, per tant, un descens en la vacunació amb OPV i a més, l'augment d'utilització de bolquers, que recullen les femtes dels nens en períodes d'excreció de poliovirus vacunal i d'aquesta manera es dirigeixen als abocadors orgànics, evitant l'excreció d'aquest virus a aigua residual.

Poliovirus 1 s'aïlla a partir de tots els tipus de matrius aquoses analitzades. Per a aquest virus, s'indiquen els percentatges totals d'aïllaments identificats com a tal i els que corresponen a les soques vacunals (poliovirus 1 Sabin) o no vacunals. Aquesta darrera categoria podria incloure soques salvatges (poliovirus 1 Mahoney) o soques revertents anomenades VDPVs (*Vaccine Derived Polioviruses*). La diferenciació entre soques vacunals i no vacunals s'ha realitzat segons Georgopoulou et al (2000) basada en l'anàlisi per RFLP de fragments amplificats de genoma de poliovirus, com s'especifica al Capítol 4 de la memòria. Hi ha però diferents metodologies descrites per tal de diferenciar soques de poliovirus salvatge i vacunal que no s'han explorat en aquest treball. A més de la detecció de poliovirus 1, es detecta poliovirus 3 en aigua residual bruta i tractada i en aigua de riu. En aquest cas, la metodologia de RFLP descrita per Georgopoulou et al (2000) no permet diferenciar soques vacunals o salvatges. Només s'ha analitzat un fragment de la regió 5'NTR i per tant, només es pot indicar que les diferents soques aïllades pertanyen a un o altre tipus, per la identificació de la regió analitzada. En qualsevol cas, tot i la coincidència dels patrons RFLP dels aïllaments amb poliovirus 1 (Mahoney), no es pot tenir la certesa de si es tracta de soques salvatges, de soques revertents originades a partir de la soca vacunal (VDPVs) o de soques recombinants. Sí es pot afirmar, que els aïllaments no corresponen a poliovirus 1 vacunal (Sabin), si més no, per a la fracció del genoma analitzada.

Amb les identificacions dels diferents aïllaments que corresponen a poliovirus a partir dels diferents tipus de mostra, cal considerar la polèmica generada al voltant de poliovirus i l'eradicació de la poliomièlitis i dels seus agents etiològics a nivell mundial.

Diferents autors preveuen aquesta eradicació com un final de joc perillós (Nathanson i Fine, 2002).

El 2003 es van informar 235 casos de poliomielitis en 7 països. Aquests nombres representen un avanç notable respecte l'any 1998 en que s'inicia el programa d'iniciativa global per a l'eliminació de la poliomielitis al món i en el que es van informar més de 350.000 casos de poliomielitis en 125 països.

La reducció dels casos de poliomielitis i dels països afectats pot fer preveure un final a la vora i produir un fals sentiment de seguretat. El virus ha d'eliminar-se dels pocs països en els que es manté encara ja que un únic cas pot provocar un brot que pot estendre's. La major font dels brots podria ésser la mateixa vacunació OPV. L'atenuació del virus es deu a un petit nombre de mutacions puntuals crítiques (Minor, 1992). Els individus vacunats poden produir fenotips revertents de poliovirus vacunals (VDPVs) que poden recuperar la neurovirulència. Aquests s'excreten a partir del 30% d'individus infectats (Dunn et al, 1990; Abraham et al, 1993) i podrien contagiar individus no vacunats, generant així, problemes (Butler, 2003). Es troben exemples d'episodis de poliomielitis en els que es demostrà l'existència de virus revertents i recombinants entre OPV tipus 1 i enterovirus salvatges i, com aquests virus, causaren més de 20 casos de poliomielitis paralítica (Kew et al, 2002).

La vigilància epidemiològica per controlar la circulació de poliovirus a l'ambient haurà de fer-se exhaustivament. Durant els darrers anys, s'han anat detectant soques virulentes de poliovirus en mostres ambientals. Del 1993 al 1995 al Japó es confirma la prevalença de soques VDPVs en aigua residual i aigua de riu (Yoshida et al, 2002). A Albània es confirma la circulació a l'ambient de soques de poliovirus recombinants (Divizia et al, 1999). En altres casos, al Japó, aïllaments de soques de poliovirus a partir d'aigua de riu i aigua residual corresponien en la seva totalitat a soques vacunals (Matsuura et al, 2000). A Egipte, durant l'any 2001 s'aïllà poliovirus 1 salvatge en aigua residual en un 57% de les mostres i en el 91% dels punts a estudi i s'informaren dos casos de poliomielitis paralítica durant aquell any (El Bassioni et al, 2003). Més a prop del nostre entorn, tot i que més lluny en el temps, Lucena et al (1986) detecten poliovirus salvatge en aigua de mar i de riu a la província de Barcelona durant els anys 1979 i 1980.

Des de 1984 no hi ha cap cas de poliomielitis notificat a Catalunya. Si es considera la totalitat del territori espanyol, des de 1998 fins al 2002, s'han declarat 2 casos de poliomielitis (1 d'ells, el 2001, associat a vacunació). La declaració de poliomielitis aguda com a causa de mort és una situació especial. Les regions de la OMS que ja han estat certificades com a lliures de poliovirus salvatge autòcton són Amèrica (1994), Pacífic Occidental (2000) i Europa (2002) (Smith et al, 2004). En d'altres regions, la

situació és diferent. A l'Índia s'ha detectat un increment de casos de poliovirus del 2002 (268 casos) al 2003 (1599 casos). Aquest fet fa que en aquesta regió no es pugui aconseguir el certificat d'eradicació com a mínim, fins al 2006. Així, la certificació d'eradicació de poliomièlitis i poliovirus a nivell mundial per al 2005 ja no és possible (Kerr, 2003).

A més de la importància de poliovirus, altres enterovirus s'identifiquen com agents causants de malalties que afecten l'home. La taula 5.3.4.2 recull els aïllaments clínics d'enterovirus identificats a Espanya els darrers anys. Els enterovirus no polio s'associen principalment a brots de meningitis asèptiques. A la taula 5.3.4.3 es detallen alguns dels brots d'arreu del món en els que s'han identificat diferents enterovirus com agents causants. Els enterovirus que s'aïllen més freqüentment a partir de les mostres clíniques coincideixen amb els enterovirus aïllats més freqüentment a partir de mostres ambientals en el nostre entorn (echovirus 6 i 30). Val a dir que quan es produeixen brots de meningitis asèptiques per enterovirus, els afectats poden sumar centenars de persones i que principalment afecten a la població infantil (menor de 12 anys) tot i que també es descriuen brots en adults.

**Taula 5.3.4.2.** Aïllaments d'enterovirus en mostres clíniques a Espanya en el període 1998-2002. Adaptat de Boletín Epidemiológico, Centro Nacional de Epidemiología, Ministerio de Sanidad y Consumo, España.

	1998	1999	2000	2001	2002
<b>Coxsackievirus</b>	1				1
<b>Coxsackievirus B</b>	2	101	19	13	13
<b>Coxsackievirus B1</b>	1				
<b>Coxsackievirus B5</b>				3	0
<b>Echovirus</b>	6	99	303	452	149
<b>Echovirus 6</b>				1	12
<b>Echovirus 30</b>				3	0
<b>Poliovirus 2</b>	0	1	0	1	

Els aïllaments d'echovirus 11 poden classificar-se en 4 genogrups (Oberste et al, 2003). Echovirus 30 causa brots de meningitis asèptica extensos en països de clima temperat (Palacios et al, 2002) i és un virus antigènicament heterogeni, per al qual es defineixen 3 grups antigènics tot i que les bases per a aquesta diferenciació no es coneixen. El seu patró d'evolució és clarament diferent del de la resta d'enterovirus. Presenta una epidemiologia molecular semblant a la del virus de la grip on soques

(l·linatges) prevalents desplacen els menys establerts per tal d'escapar al sistema immune de l'hoste. Echovirus 30 es caracteritza pel fet que, en un moment determinat apareix un l·linatge circulant a l'hora per tot el món.

Coxsackievirus B5 causa brots epidèmics, amb pics de malaltia durant uns anys i pocs casos durant els anys intermedis (Hamby et al, 1987).

**Taula 5.3.4.3.** Alguns dels brots de malalties causades per diferents enterovirus a nivell mundial les dues darreres dècades.

Malaltia	Regió afectada	Període	Agent causant (% casos)	Referència
Meningitis asèptica	Cape Town (Sudàfrica)	1981-9	Echovirus 4 (37,2) Echovirus 9 (7,2) Coxsackie A9 (3,4) No identif. -Echo 9?- (10,5)	McIntyre i Keen, 1993
Meningitis asèptica	Cuba	1990-1 1994 1995	Coxsackie A9 Echovirus 30 Coxsackie B5	Bello et al, 1997
Neuropatia òptica i perifèrica	Cuba	1991-3	Coxsackie A9 i altres enterovirus -Cox B4- (84)	Mas et al, 1997
Meningitis asèptica	Ankara i Antalya (Turquia)	Juny – Set 1999	Echovirus 30 (44)	Ozkaya et al, 2003
Meningitis asèptica	Espanya	2000	Echovirus 13	Avellón et al, 2003
Meningitis asèptica	Nova Zelanda	2000	Echovirus 33	Huang et al, 2003
Meningitis asèptica	França	2000	Echovirus 13 (41,3) Echovirus 30 (37,9) Echovirus 6 (20,7)	Chomel et al, 2003

**Taula 5.3.4.3.** Brots de malalties causades per diferents enterovirus a nivell mundial les dues darreres dècades. (Continuació).

Malaltia	Regió afectada	Període	Agent causant (% casos)	Referència
Meningitis asèptica	Bèlgica	Maig – Set 2000	Echovirus 30 (31,2)	Thoelen et al, 2003
			Echovirus 13 (23,8)	
			Echovirus 6 (20,5)	
			Coxsackie B5 (15,6)	
			Echovirus 16 (5,7)	
			Echovirus 18 (1,6)	
			Coxsackie B4 (0,8)	
Meningitis asèptica, gastroenteritis i herpangina	Japó	2001	Coxsackie B5 Faulkner (80)	Kitahori et al, 2003
			Echovirus 30 (79) Echovirus 6 (16)	
Meningitis asèptica	Taiwan	2001	Echovirus 30 (79) Echovirus 6 (16)	Kao et al, 2003
Meningitis asèptica	Alemanya		Echovirus 13 (18,6)	Bottner et al, 2002
			Echovirus 6 (2,9)	
			Echovirus 30 (1,4)	
			Coxsackie B5 (2,9)	
Meningitis asèptica	Estats Units	2003	Echovirus 9 Echovirus 30	CDC, 2003

Pel que fa a la importància sanitària que pot tenir el fet que els enterovirus infecciosos es trobin en mostres ambientals, cal considerar dos punts. Un d'ells és analitzar si els serotips aïllats de l'ambient coincideixen amb els que produeixen manifestacions clíniques a la població. I un segon punt és esbrinar si l'origen de les manifestacions clíniques es localitza en els enterovirus de l'ambient o si el flux de virus és a la inversa, és a dir, establir evidències d'infeccions víriques i manifestacions

clíniques causades per enterovirus, produïdes a partir de mostres contaminades, fet ja demostrat per a altres virus entèrics (virus de l'hepatitis A, norovirus). Pel que fa a la primera de les consideracions, diversos estudis informen de la similitud entre els enterovirus aïllats en aigua residual i en mostres clíniques (Sellwood et al, 1981; Sedmak et al, 2003). En aquest sentit, a partir dels resultats obtinguts i dels enterovirus identificats com agents causants de malalties arreu del món (Taula 5.3.4.3) s'observa que més del 50% de les manifestacions clíniques s'associen amb coxsackievirus B5, echovirus 6 o echovirus 30 com agent etiològic i que a l'hora, aquests són virus que s'aïllen a partir de les diferents matrius ambientals analitzades en percentatges més alts.

Per a la segona consideració, tot i que no hi ha evidències, l'estudi de Sedmak et al, (2003) apunta dues possibilitats en aquest sentit. D'una banda, habitualment els serotips detectats en aigua residual més freqüentment coincideixen amb els que produeixen més casos clínics i els mesos en que aquests són més abundants en aigua residual coincideixen amb els de màximes manifestacions clíniques (tot i que aquest fet no evidencia direccionalitat) i de l'altra, el fet que durant els mesos corresponents a la primavera, es detecten en aigua residual els serotips que produiran més manifestacions clíniques a la població durant l'estiu i la tardor següents. Per a cada any s'estableix pràcticament un únic serotip el qual s'aïlla més freqüentment en aigua residual i de casos clínics. I aquest enterovirus és diferent cada any. De nou, els enterovirus detectats amb més freqüència en aigua residual i com agents causants de les manifestacions clíniques són echovirus 6, echovirus 30, echovirus 11 i coxsackievirus B5 (Sedmak et al, 2003). A més, però, dels aïllaments que coincideixen, hi ha aïllaments en aigua residual que no produeixen manifestacions clíniques el mateix any i a la inversa.

Un factor que dificulta el control de poliovirus i dels enterovirus no polio és el fenomen de la recombinació que presenten aquests virus amb genoma ARN. L'avaluació d'individus vacunats mostra l'excreció de soques de poliovirus recombinants amb una taxa màxima a dia 14 després de la vacunació (Cuervo et al, 2001). A més es mostren evidències de recombinació amb intercanvi genètic entre poliovirus salvatge i vacunal (Guillot et al, 2000). Per a altres enterovirus, també es troben evidències de recombinació. Quan diferents genotips d'echovirus tenen l'oportunitat d'infectar el mateix individu, s'excreten una elevada proporció de virus amb genomes recombinants. Això és possible quan es troben múltiples soques epidèmiques circulant a la població simultàniament (Oprisan et al, 2002).

Així, la vigilància dels enterovirus en el medi aquàtic i altres tipus de mostres ambientals pot esdevenir una eina de coneixement i control útil per caracteritzar els

serotips d'enterovirus que produiran manifestacions clíniques a les poblacions receptores en el medi considerat. Per aconseguir el propòsit calen mecanismes sensibles de detecció que permetin el control ambiental dels enterovirus.



## 5.4 CONCLUSIONS

---

Els enterovirus presenten una certa distribució estacional en aigua residual amb valors més alts durant els mesos de primavera i estiu.

Els enterovirus resultat de les avaluacions aplicant el mètode Viraden en aigua de mar mantenen més les relacions de concentracions amb els bacteriòfags (especialment colifags somàtics) que amb els bacteris entèrics (coliformes fecals i *E. coli*).

En aigua de mar de platges que complirien amb els estàndards de qualitat bacteriològics marcats per la Directiva 76/160/CEE es detecten enterovirus en 10 litres de mostra.

Els valors d'enterovirus detectats actualment en aigua de mar amb la metodologia desenvolupada són més alts que els valors descrits anys en darrera amb els mètodes disponibles en aquells moments, quan els paràmetres bacteriològics han disminuït.

S'aïllen soques de poliovirus 1 vacunals i no vacunals a partir de mostres d'aigua residual, aigua de riu i aigua de mar en el nostre entorn geogràfic.

S'aïllen altres enterovirus a partir de mostres ambientals els quals s'han identificat com agents causants de brots de meningitis asèptica en diferents països arreu del món.

Durant l'any 2002 l'enterovirus més abundant en aigua residual del nostre entorn fou echovirus 6. En aigua de riu i de mar del nostre entorn, s'hi sumà coxsackievirus B5 també com a enterovirus més abundant.



---

## CONCLUSIONS FINALS

---

L'addició de tripsina-EDTA al medi overlay i l'addició d'IDU al cultiu cel·lular en creixement milloren l'eficiència del mètode Viraden.

Existeix un efecte del volum de mostra filtrat sobre el rendiment del mètode Viraden.

La hibridació i la immunodetecció permeten la detecció d'enterovirus que formen clapes sobre els filtres d'èsters de cel·lulosa.

La combinació de DGC i fenol amb la clarificació utilitzant prefiltrats permet descontaminar mostres per a ésser avaluades aplicant el mètode Viraden.

La disponibilitat de membranes de baixa adsorció proteica permet aplicar la descontaminació per filtració a mostres ambientals.

El mètode Viraden permet avaluar l'efecte de desinfectants i antisèptics sobre enterovirus adsorbits sense manipulacions d'aquests.

Els enterovirus adsorbits sobre els filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa presenten major resistència que els enterovirus en suspensió sotmesos a les mateixes condicions d'inactivació.

La humitat relativa té major efecte que la temperatura en la inactivació dels enterovirus.

Els diferents tipus d'enterovirus presenten una gran diversitat front als efectes de diferents condicions inactivants.

El mètode de doble capa esdevé un mètode més sensible que els mètodes d'enumeració d'enterovirus cultivables descrits fins al moment.

L'aplicació dels mètodes Viraden i de doble capa permet la combinació de línies cel·lulars diferents. La combinació de línies cel·lulars BGM i CaCo-2 és la que ofereix una recuperació d'enterovirus a partir d'aigua residual més gran que el nombre i diversitat d'aquests.

Els enterovirus en les aigües residuals estudiades presenten una distribució estacional amb els valors de densitat màxims a la primavera i començaments d'estiu.

Els mètodes de quantificació desenvolupats permeten recuperacions de nombres i tipus diferents d'enterovirus a les matrius aquàtiques del nostre entorn estudiades superiors a les que s'obtenien amb les metodologies anteriors.

Els nombres d'enterovirus trobats en aigua de riu i de mar amb les noves metodologies permeten establir correlacions amb indicadors vírics de contaminació fecal (bacteriòfags).

S'identifiquen aïllaments virals corresponents a soques de poliovirus 1 vacunals i no vacunals a partir de les matrius d'aigua residual, aigua de riu i aigua de mar estudiades.

---

## RESUM

---

Els tres primers capítols es dediquen al desenvolupament i aplicació del mètode Viraden. El mètode Viraden (*VIRus ADsorption ENumeration*) descrit per Papageorgiou et al (2000) consisteix en un mètode de concentració i enumeració de virus adsorbits sobre filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa. En el primer capítol es recullen les modificacions assajades per tal d'incrementar la recuperació d'enterovirus utilitzant aquest mètode. Les optimitzacions es basaren en la modificació del medi *overlay*, per addició d'ions polivalents i/o de tripsina-EDTA o en l'addició del compost 5-iode-2'-deoxiuridina (IDU) al cultiu cel·lular en creixement. La modificació del medi *overlay* no produí resultats estadísticament significatius mentre que l'addició d'IDU millorà significativament la recuperació d'enterovirus, amb valors d'increment equivalents als que es descriuen a la bibliografia.

A més es millorà l'adaptació del mètode Viraden per a la detecció de les clapes víriques damunt els filtres d'èsters de cel·lulosa emprant diferents tècniques moleculars, la hibridació amb sondes d'àcid nucleic i la immunodetecció amb anticossos comercials. Ambdues tècniques permeteren la detecció de les clapes víriques sobre els suports emprats però no permeteren la identificació de diferents enterovirus. No es trobaren sondes d'àcid nucleic prou específiques per a la diferenciació dels grups (ni serotips) d'enterovirus, ni anticossos comercials que permetessin una classificació ràpida sobre els suports de membrana d'èsters de cel·lulosa dels enterovirus analitzats.

Finalment es destaca l'adaptació del mètode Viraden, desenvolupat per a filtres de 47 mm de diàmetre, a filtres de 90 mm de diàmetre els quals permeteren una major aplicació del mètode per a diferents tipus de mostres ambientals, desenvolupada en capítols posteriors.

L'aplicació del mètode de concentració-enumeració Viraden a mostres d'aigua residual bruta i tractada implica la utilització de mètodes de clarificació i descontaminació de les mostres permetent una aproximació diferent a les tradicionals. Es desenvoluparen diferents sistemes de clarificació i descontaminació de matrius aquoses basats en agents químics i en membranes filtrants. Els agents químics s'assajaren per mostres d'aigua residual tractada per tal de poder aconseguir grans volums de mostra descontaminada. Aquests foren el digluconat de clorhexidina i el fenol. Per ambdós es feren proves d'inactivació de poliovirus 1 (Sabin) per comprovar la resistència d'aquest tipus de virus als agents químics, proves de reducció de microorganismes aerobis totals a les mostres d'efluent secundari i, finalment assaigs de

recuperació de poliovirus 1 (Sabin) afegit experimentalment a les mostres i de recuperació d'enterovirus naturalment presents en l'aigua residual tractada. Els resultats que s'obtingueren permeten dir que la descontaminació amb fenol combinada amb clarificació per filtració a través de filtres de baixa adsorció proteica (PVDF) de 0,65 µm de diàmetre de porus és un bon sistema per a la descontaminació de mostres d'efluent secundari quan s'aplica posteriorment l'enumeració de virus pel mètode Viraden. A més dels mètodes químics s'assajaren mètodes de descontaminació i clarificació per filtració, obtenint-se com a resultat que la filtració d'aigua residual bruta i tractada a través de filtres esterilitzants (0,22 µm) de baixa adsorció proteica (PVDF o PES) és un mètode vàlid per a l'obtenció de mostres descontaminades i a punt per a l'enumeració posterior de virus. Per a volums grans de mostres d'efluent secundari, riu i mar es recomana la clarificació per filtració a través de filtres de 0,65 µm PVDF prèvia a l'aplicació del mètode Viraden per a la concentració i enumeració de virus cultivables.

En el tercer capítol es valora la possibilitat d'aplicar el mètode Viraden per a la realització de test de desinfectants i antisèptics amb els virus adsorbits sobre un suport. El suport emprat fou el mateix filtre d'èsters de cel·lulosa on s'adsorbien els virus a analitzar i es comparà l'acció de diferents desinfectants i antisèptics (clor, iode i glutaraldehid) sobre els virus adsorbits i en suspensió. El mètode Viraden aplicat com es descriu va permetre mesurar l'activitat de desinfectants i antisèptics sobre virus adsorbits i aquesta es detectà de l'ordre de 2 logaritmes inferior si es comparava amb l'activitat sobre els virus en suspensió. La comparació entre virus adsorbits i en suspensió també s'establí per a l'assaig de la capacitat d'aquests de persistir a diferents temperatures (temperatura ambient, 4°C i -10°C). Els virus persistiren millor adsorbits que en suspensió a les diferents temperatures. A més, en el cas de tenir els virus adsorbits, es valorà quin era l'efecte de la humitat relativa (HR) sobre el manteniment de la infecciositat d'aquests i s'establí un ordre més o menys estable per als virus i condicions assajades en que els virus adsorbits amb HR alta (>85%) persistien més que els virus en suspensió i, aquests més que els virus adsorbits i mantinguts amb HR baixa (<50%).

El quart capítol descriu un nou mètode d'enumeració de virus cultivables que consisteix en la realització d'una doble capa. D'una banda calgué un cultiu confluent de cèl·lules sobre el que es disposà una barreja composta per la suspensió viral a analitzar, una suspensió cel·lular (igual o diferent a la de la monocapa) i el medi *overlay*, el qual contenia agar de manera que permetia la formació de clapes. El mètode es comparà amb altres mètodes d'enumeració de virus (mètode de monocapa, Viraden, NMP) i en tots els casos aparegué com el mètode que oferia una major recuperació de virus, tant en proves amb suspensions virals de cultius purs de

diferents enterovirus com en proves amb mostres ambientals de diferents tipus d'aigua. A més es realitzà una comparació de diferents línies cel·lulars per saber si hi havia diferències quantitatives i qualitatives en la capacitat d'aïllar virus a partir de mostres ambientals i, s'observà que quan s'utilitzava la línia cel·lular CaCo-2 per a la preparació de la suspensió cel·lular s'obtenien majors recomptes de virus a partir de mostres d'aigua residual bruta i el nombre de tipus de virus diferents que s'aïllava (diversitat) era major. Per les dificultats de cultiu d'aquesta línia es prepararen sempre les monocapes amb la línia cel·lular BGM i es combinaren ambdós tipus cel·lulars.

En el darrer capítol es valora la contaminació vírica d'algunes matrius ambientals aquoses en el nostre entorn. S'establiren les concentracions de virus cultivables sobre BGM en aigua residual bruta i es detectà una certa distribució estacional d'aquests, observant-se increments en les densitats de virus en aigua residual a partir dels mesos de març i abril i fins l'estiu. Les valoracions de reduccions de virus per depuració d'aigua residual mitjançant fangs activats mostren valors mitjans de prop del 95% els quals estan d'acord amb la bibliografia. Les caracteritzacions microbiològiques en aigua de riu permeteren establir correlacions entre els enterovirus i coliformes fecals (0,82) i fangs que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (0,82). Mentre que en aigua de mar les majors correlacions amb els enterovirus cultivables s'establiren amb colifangs somàtics (0,98) i fangs que infecten la soca GA-17 de *Bacteroides thetaiotaomicron* (0,80). En aquest cas, a més, la reducció logarítmica que experimentaren els enterovirus a partir de les densitats mitjanes en aigua residual coincidí amb les reduccions experimentades per aquests dos mateixos grups de bacteriòfags (3,5-4 logaritmes). En el cas d'aigua de mar cal destacar el fet que en diferents mostres d'aigua de platja que complien amb els paràmetres microbiològics de qualitat bacteriològics inclosos a la Directiva 76/160/CEE es detectaren enterovirus infecciosos en 10 litres.

A partir dels aïllaments d'enterovirus procedents de mostres ambientals es realitzà la caracterització mitjançant tècniques de RT-PCR i RFLP. Es detectaren diferents serotips d'enterovirus dels grups poliovirus, echovirus i coxsackievirus B. Es detectà una certa diferència en les poblacions d'enterovirus en funció del tipus de mostra. Les mostres d'aigua residual bruta presentaren menys diversitat de virus i s'allunyaren de les mostres de riu i de mar, les quals a més de tenir més similitud pel que fa a les poblacions de virus que es determinaren en aquestes, tenien major diversitat d'aquests. L'enterovirus que s'aïllà més freqüentment en els diferents tipus de mostra fou echovirus 6, el qual, juntament amb altres serotips d'echovirus i amb coxsackievirus identificats en aquest estudi, són alguns dels agents etiològics associats a brots de meningitis asèptiques arreu del món. A més, s'identificaren poliovirus 1 i 3 i en el cas de poliovirus 1 s'establí la

diferenciació entre soques vacunals (Sabin) i no vacunals (salvatges o revertents) per al fragment de genoma viral analitzat. Aquests resultats només són concloents per al fet que existeixen soques de poliovirus 1 no vacunals circulant a l'ambient, i tot i que vénen determinats per la metodologia emprada i la regió genòmica analitzada, podrien considerar-se per plantejar si s'estan acomplint realment els objectius del pla d'eradicació de poliovirus dut a terme per la OMS.



## BIBLIOGRAFIA

## A

- Abad, F. X., C. Villena, S. Guix, S. Caballero, R. M. Pintó and A. Bosch. 2001.** Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astrovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3904-3907.
- Abad, F. X., R. M. Pintó and A. Bosch. 1994.** Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3704-3710.
- Abad, F. X., R. M. Pintó and A. Bosch. 1997.** Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 107-111.
- Abbaszadegan, M., P. Stewart and M. LeChevallier. 1999.** A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 444-449.
- Abraham, R., P. Minor, G. Dunn, J. F. Modlin and P. L. Ogra. 1993.** Shedding of virulent poliovirus revertants during immunization with oral poliovirus vaccine after prior immunization with inactivated polio vaccine. *J. Infect. Dis.* 168: 1105-1109.
- Akin, E. 1981.** A review of infective dose data for enteroviruses and other enteric microorganisms in human subjects. In *Microbial Health Considerations of Soil Disposal of Domestic Wastewaters*. EPA-600/9-83-017, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- Alvarez, M. E. and R. T. O'Brien. 1982.** Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1064-1071.
- Anderson, Y. and P. Bohan. 2001.** Disease surveillance and waterborne outbreaks. In Fewtrell, L. and J. Bartram (Ed.), *Water quality: Guidelines, standards and health*. London. IWA Publishing.
- Anònim. 1981.** Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactericide. NFT 72-150. AFNOR, Paris, France.
- Anònim. 1984.** British Standard 6471. Methods for determination of antimicrobial value of QAC disinfectant formulations. British Standards Institution, London, United Kingdom.
- Anònim. 1989.** Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité virucide vis-à-vis des virus de vertébrés. NFT 72-180. AFNOR, Paris, France.
- Anònim. 1995a.** ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages - part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Anònim. 1995b.** Methods for the isolation and identification of human enteric viruses from waters and associated materials. London, UK, HMSO, 1995.
- Anònim. 2000.** ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages - part 2: Enumeration of somatic coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Anònim. 2001.** ISO 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages - part 2: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- APHA. 1998.** American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Asano, T., L. Y. C. Leong, M. G. Rigby and R. H. Sakaji. 1992.** Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data. *Wat. Sci. Technol.* 26: 1513-1524.
- Aulicino, F. A., A. Mastrantonio, P. Orsini, C. Bellucci, M. Muscillo and G. Larosa. 1996.** Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome. *Water Air Soil Poll.* 91: 327-334
- Avellón, A., I. Casas, G. Trallero, C. Pérez, A. Tenorio and G. Palacios. 2003.** Molecular análisis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 934-941.

## B

- Bailly, J. L., M. Chambon, H. Peigue-Lafeuille, H. Laveran, C. de Champs and D. Beytout. 1991.** Activity of glutaraldehyde at low concentrations (<2%) against poliovirus and its relevance to gastrointestinal endoscope disinfection procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1156-1160.
- Bello, M., P. Mas Lago, R. Palomera, L. Morier, I. Avalos, B. Acosta, N. Amin, J. Cartaza, and L. Sarmiento. 1997.** Viral meningoencephalities due to enteroviruses in Cuba during 1990-1995. *Revista Argentina de Microbiología.* 29: 24.
- Benton, W. H. and C. J. Hurst. 1986.** Evaluation of mixed cell types and 5-iodo-2'-deoxyuridine treatment upon plaque assay titers of human enteric viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1036-1040.
- Benton, W. H. and C. J. Hurst. 1990.** Sequential inoculation as an adjunct in enteric virus plaque enumeration. *Wat. Res.* 24: 905-909.
- Benton, W. H. and R. L. Ward. 1982.** Induction of cytopathogenicity in mammalian cell lines challenged with culturable enteric viruses and its enhancement by 5-iododeoxyuridine. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 861-868.
- Berg, G., D. R. Dahling, G. A. Brown and D. Berman. 1978.** Validity of fecal coliforms, total coliforms and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 880-884.
- Best, M., V. S. Springthorpe and S. A. Sattar. 1994.** Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of micro-organisms. *Am J. Infect. Control* 22: 152-162.
- Blanch, A. R., L. Belanche-Muñoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kühn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skrabber, G. Papageorgiou, H. D. Taylor, J. Wallis and J. Jofre. 2004.** Tracking the origin of faecal pollution in surface water. An ongoing project within the European Union research programme. *J. Water Health. En premsa.*
- Block, J. C., J. F. Collin, J. C. Joret, D. Rolland and J. M. Foliguet. 1979.** Elimination des enterovirus au cours du traitement par boues actives des eaux usées urbaines. *T. S. M.-L'eau.* 74: 201-206.
- Bloomfield S. F. and E. Looney. 1992.** Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 87-93.
- Bloomfield, S. F. 1996.** Chlorine and iodine formulations, p. 133-158. In J. M. Ascenzi (ed.), *Handbook of disinfectants and antiseptics.* Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- Bloomfield, S. F., C. A. Smith-Burchnell and A. G. Dalgleish. 1990.** Evaluation of hypochlorite-releasing disinfectants against the human immunodeficiency virus (HIV). *J. Hosp. Infect.* 15: 273-278.
- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. J. Jansen, P. M. E. Wertheimvan Dillen and J. van der Noordaa. 1990.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- Bosch A., F. Lucena, and J. Jofre. 1986a.** Fate of Human Enteric Viruses (Rotaviruses and Enteroviruses) after Primary Sedimentation. *Wat. Sci. Technol.* 18:47-52.
- Bosch, A., F. Lucena, J. M. Diez, R. Gajardo, M. Blasi and J. Jofre. 1991.** Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Res. Technol. J. AWWA.* 80-83.
- Bosch, A., F. Lucena, R. Gironés and J. Jofre. 1986b.** Survey of viral pollution in Besós river (Barcelona). *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 58: 87-91.
- Bosch, A., F. Lucena, R. Girones and J. Jofre. 1988.** Occurrence of enteroviruses in marine sediment along the coast of Barcelona, Spain. *Can. J. Microbiol.* 34: 921-924.
- Botero, L., M. Montiel and L. Porto. 1992.** Recovery of enteroviruses from water and sediment of lake Maracaibo. Venezuela. *J. Environ. Sci. Health.* A27: 2213-2226.

- Botma, K. L. 1999.** Studies on methods for increasing the susceptibility of cell cultures to enteric viruses. Tesi Doctoral. Fac. of Medicine. University of Pretoria. Pretoria.
- Boffner, A., S. Daneschnejad, W. Handrick, V. Schuster, U. G. Liebert and W. Kiess. 2002.** A season of aseptic meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 1126-1132.
- Boudouma, M., L. Enjalbert and J. Didier. 1984.** A simple method for the evaluation of antiseptic and disinfectants virucidal activity. *J. Virol. Methods* 9: 271-276.
- Bowles, N. E., P. J. Richardson, E. G. J. Olsen and L. C. Archard. 1986.** Detection of coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*, i: 1120-1123.
- Brock, T. D. 1983.** Membrane filtration: A user's guide and reference manual. Science Technology Springer-Verlag, Madison, WI.
- Bruce, C., W. Al-Nakib, M. Forsyth, G. Stanway and J. W. Almond. 1989.** Detection of enteroviruses using cDNA and synthetic oligonucleotide probes. *J. Virol. Methods*. 25: 233-240.
- Buras, N. 1974.** Recovery of viruses from wastewater and effluent by direct inoculation method. *Wat. Res.* 8: 19-22.
- Buras, N. 1976.** Concentration of enteric viruses in wastewater and effluent: a two year survey. *Wat. Res.* 10:295-298.
- Butler, D. 2003.** WHO prepares for final push to rid the world of polio. *Nature*. 424: 604.
- Butz, A. M., P. Fosarelli, J. Dick, T. Cusack and R. Yolken. 1993.** Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics*. 92: 202-205.
- C**
- Carducci, A., S. Arrighi and A. Ruschi. 1995.** Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 207-209.
- Caro, V., S. Guillot, F. Delpeyroux and D. Crainic. 2001.** Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82: 79-91.
- CDC. 2003.** Outbreaks of aseptic meningitis associated with echovirus 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity – United States, 2003. *MMWR*. 52: 761-764.
- Chambon, M. J. L. Bailly and H. Peigue-Lafeuille. 1992.** Activity of glutaraldehyde at low concentrations against capsid proteins of poliovirus type 1 and echovirus type 25. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3517-3521.
- Chang, L. T., S. R. Farrah and G. Bitton. 1981.** Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 921-924.
- Chang, S. L., G. Berg, A. Busch, R. E. Stevenson, N. A. Clarke and P. W. Kabler. 1985.** Application of most probable number method for estimating concentrations of animal viruses by the tissue cultures technique. *Virology*. 6: 27-42.
- Chapron, C. D., N. A. Ballester, J. H. Fontaine, C. N. Frades and A. B. Margolin. 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. Environ. Microbiol.* 66: 2520-2525.
- Cho, H. B., S. Lee, J. Cho and S. Kim. 2000.** Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiol.* 46: 417-424.
- Chomel, J. J., D. Antona, D. Thouvenot and B. Lina. 2003.** Three ECHOvirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhône-Alpes region, France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 191-193.
- Chonmaitree, T., C. Ford, C. Sanders and H. L. Lucia. 1988.** Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2576-2580.

- Cole, D., S. C. Long and M. D. Sobsey. 2003.** Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6507-6514.
- Contreras, N. 2000.** Bacteriófagos de bacterias entéricas en aguas de baño. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona.
- Contreras-Coll, N., F. Lucena, K. Mooijman, A. Havelaar, V. Pierzo, M. Boque, A. Gawler, C. Höller, M. Lambiri, G. Mirolo, B. Moreno, M. Niemi, R. Sommer, B. Valentin, A. Wiedenmann, V. Young and J. Jofre. 2002.** Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Wat. Res.* 36: 4963-4974.
- Cooney, M. K. 1973.** Relative efficiency of cell cultures for detection of viruses. *Health Lab. Sci.* 10: 294-303.
- Copper P. D. 1961.** An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus: some factors affecting efficiency of plating. *Virology* 13: 153-157.
- Cova, L., H. Kopecka, M. Aymard and M. Girard. 1988.** Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. *J. Med. Virol.* 24: 11-18.
- Crainic, R., P. Couillin, B. Blondel, N. Cabau, A. Boue and F. Horodniceanu. 1983.** Natural variation of poliovirus neutralization epitopes. *Infect. Immun.* 41: 1217-1225.
- Crance, J. M. J. Passagot, E. Bizizgos and R. Deloince. 1987.** Continuous production of hepatitis A virus in PLC/PRF/5 cell cultures: use of antigen for serology. *J. Virol. Methods.* 18: 193-203.
- Craun, G. F., R. L. Calderón and N. Nwacuku. 2003.** Causes of waterborne outbreaks reported in the United States, 1991-1998. In Hunter, P. R., M. Waite and E. Ronchi (Ed.), *Drinking water and infectious disease: establishing the links.* London. CRC Press. IWA Publishing.
- Cromeans, T., M. D. Sobsey and H. A. Fields. 1987.** Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replication isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* 22: 45-56.
- Cuervo, N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic and F. Delpeyroux. 2001.** Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* 75: 5740-5751.
- ## D
- Dagan, R. and M. A. Menegus. 1986.** A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J. Med. Virol.* 19: 219-228.
- Dahling, D. R. and B. A. Wright. 1984.** Processing and transport of environmental virus samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1272-1276.
- Dahling, D. R. and B. A. Wright. 1986a.** Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 790-812.
- Dahling, D. R. and B. A. Wright. 1986b.** Recovery of viruses from water by a modified flocculation procedure for second-step concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1326-1331.
- Dahling, D. R. and B. A. Wright. 1988.** Optimization of suspended cell method and comparison with cell monolayer technique for virus assays. *J. Virol. Methods.* 20: 169-179.
- Dahling, D. R., G. Sullivan, R. W. Freyberg, R. S. Safferman. 1989a.** Factors affecting virus plaque confirmation procedures. *J. Virol. Methods.* 24: 111-122.
- Dahling, D. R., R. S. Safferman and B. A. Wright. 1989b.** Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 503-506.
- Dahourou, G., S. Guillot, O. Le Gall and R. Crainic. 2002.** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83: 3103-3110.
- De Bartolomeis, J. and V. J. Cabelli. 1991.** Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1301-1305.

**Dennis, W. H., V. P. Olivieri and C. W. Kruse. 1979.** Mechanism of disinfection: incorporation of C1-36 into f2 virus. *Wat. Res.* 13: 363-369.

**Directiva per Aigua de Beguda. 2003.** Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *BOE*, 45:7228-7245.

**Directiva per Aigües de Bany. 1976.** Directiva 76/160/CEE del Consejo, de 8 de diciembre de 1975, relativa a la calidad de las aguas de baño.

**Directiva per al Cultiu de Marisc. 1991.** Council directive of 15th July laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve molluscs (91/42/EEC). *Off. J. Eur. Communities*. L 268: 1-13.

**Divizia, M., L. Palombi, W. Buonomo, D. Donia, V. Ruscio, M. Equestre, L. Leno, A. Panà and A. M. Degener. 1999.** Genomic characterization of human environmental polioviruses isolated in Albania. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3534-3539.

**Donaldson, K. A., D. W. Griffin and J. H. Paul. 2002.** Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Wat. Res.* 36: 2505-2514.

**Dowell, S. F. 2001.** Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg. Infec. Dis.* 7: 369-374.

**Drebot, M. A., C. Y. Nguan, J. J. Campbell, S. H. S. Lee and K. R. Forward. 1994.** Molecular epidemiology of enterovirus outbreaks in Canada during 1991-1992: identification of echovirus 30 and coxsackievirus B1 strains by amplicon sequencing. *J. Med. Virol.* 44: 340-347.

**Dulbecco, R. 1952.** Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 28: 747-752.

**Dunn, G., N. T. Begg, N. Cammack and P. D. Minor. 1990.** Virus excretion and mutation by infants following primary vaccination with live oral poliovaccine from two sources. *J. Med. Virol.* 32: 92-95.

**Duran Pinedo, A. E. 2001.** Comportamiento de los bacteriófagos propuestos como microorganismo modelo frente a diferentes procesos naturales y artificiales en aguas. *Tesi Doctoral*. Universitat de Barcelona. Barcelona.

**Dychdala, G. R. 1991.** Chlorine and chlorine compounds, p. 131-151. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

## E

**Easton, A. J. and R. P. Eglin. 1988.** The detection of coxsackievirus RNA in cardiac tissue by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* 69: 285-291.

**Eichner, M. and K. Dietz. 1996.** Eradication of poliomyelitis: when can one be sure that polio virus transmission has been terminated? *Am. J. Epidemiol.* 143: 816-822.

**El Bassioni, L., I. Barakat, E. Masr, E. M. de Gourville, T. Hovi, S. Blomqvist, C. Burns, M. Stenvik, H. Gary, O. M. Kew, M. A. Pallansch and M. H. Wahdan. 2003.** Prolonged detection of indigenous wild polioviruses in sewage from communities in Egypt. *Am. J. Epidemiol.* 158: 807-815.

**Engelbrecht, R. S., M. J. Weber, B. L. Salter and C. A. Schmidt. 1980.** Comparative inactivation of viruses by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 249-256.

**Enriquez, C. E., C. J. Hurst and C. P. Gerba. 1995.** Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. *Wat. Res.* 29: 2548-2553.

**EPA, 1993.** Standards for the disposal of sewage sludge. *Fed. Reg. Final Rule*. EPA/822/Z-93-001. Parts 257, 403 and 503. U. S. Environmental Protection Agency, Washington D. C.

**EPA, 1994.** Land application of sewage sludge. A guide for land appliers on the requirements of the federal standards for the use or disposal of sewage sludge, 40 CFR Part 503. EPA/831-B-93-002b. U. S. Environmental Protection Agency, Washington D. C.

- EPA. 1984.** Chapter 1. In USEPA Manual of methods for virology (Safferman, R. S., ed.) EPA/600/4-84/013.  
(<http://www.epa.gov/nerlcwww/chap1.htm>)  
Gener 2004.
- EPA. 1995.** ICR Most Probable Number Calculator. Versió 1.0. Albert J. Klee. Risk Reduction Engineering Laboratory. US EPA, Cincinnati, Ohio.  
(<http://www.epa.gov/nerlcwww/online/htm>)  
Gener 2004.
- EPA. 1996.** ICR Microbial Laboratory Manual. Office of Research and Development. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- EPA. 2000a.** Method 1601: Male-specific (F+) and somatic coliphages in water by two-step enrichment procedure. Office of Water. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- EPA. 2000b.** Method 1602: Male-specific (F+) and somatic coliphages in water by single agar layer (SAL) procedure. Office of Water. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- F**
- Farrah, S. R. and G. Bifton. 1978.** Elution of poliovirus adsorbed to membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 982-984.
- Farrah, S. R., C. Wallis, P. T. Shaffer and J. L. Melnick. 1976a.** Reconcentration of poliovirus from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 653-658.
- Farrah, S. R., D. R. Preston, G. A. Toranzos, M. Girard, G. A. Erdos and V. Vasuhdivan. 1991.** Use of modified diatomaceous earth for removal and recovery of viruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2502-2506.
- Farrah, S. R., Goyal, S. M., Gerba, c. P. Wallis, C. and P. T. B. Shaffer. 1976b.** Characteristics of humic acids and organic compounds concentrated from tap water usin Aquella Virus Concentrator. *Wat. Res.* 10: 897-901.
- Farrah, S. R., S. M. Goyal, C. P. Gerba, C. Wallis and J. L. Melnick. 1977.** Concentration of enteroviruses from estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1192-1196.
- Farrah, S. R., S. M. Goyal, C. P. Gerba, C. Wallis and J. L. Melnick. 1978.** Concentration of poliovirus from tap water ontro membrane filters with aluminum chloride at ambient pH levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 624-626.
- Favero, M. S. and W. W. Bond. 1991.** Chemical disinfection of medical surgical material, p. 617-641. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
- Fenner, F., B. R. McAuslan, C. A. Mims, J. Sambrood and D. O. White. 1974.** *The biology of animal viruses.* Academic Press, Inc. London. United Kingdom.
- Fields, H. A. and T. G. Metcalf. 1975.** Concentration of Adenovirus from Seawater. *Wat. Res.* 9:357-364
- Finance, C., F. Lucena, M. Brigaud, M. Aymard, R. Pares and L. Schwartzbrod. 1982.** Etude quantitative et qualitative de la pollution virale de l'eau de mer à Barcelone. *Rev. Française des Sciences de l'eau.* 1: 139-149.
- Fleisher, J. M., D. Kay, M. Wyer and H. Merret. 1996.** The enterovirus test in the assessment of recreational water-associated gastroenteritis. *Wat. Res.* 30: 2341-2346.
- Florino, P. M. and W. H. Hannon. 1966.** Use of DEAD dextran in agar overlays to enhance size of ECHO virus plaques. *Public Health Rep.* 81: 1015-1018.
- Floyd, R. and D. G. Sharp. 1978.** Viral aggregation: quantitation and kinetics of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1079-1083.
- Floyd, R., D. G. Sharp and J. D. Johnson. 1979.** Inactivation by chlorine of single poliovirus particles in water. *Environ. Sci. Technol.* 13: 438-442.
- Formiga, M. 2003.** La contaminació vírica en mol·luscs bivalves: detecció i caracterització. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona.

**Freshey, R. I. 1987.** Culture of animal cells, a manual of basic technique. A. R. Liss, New York.

## G

**Gantzer C., A. Maul, J. M. Audic, L. Schwartzbrod. 1998.** Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4307-4312.

**Gantzer, C., S. Senouci, A. Maul, Y. Levi and L. Schwartzbrod. 1997.** Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 65: 265-271.

**Gassilloud, B. 2003.** Adhésion-agrégation et dégradation des particules virales dans une eau minérale: Cas d'Enterovirus, de Norovirus et de Vesivirus. Tesi Doctoral. Université Henri Poincaré-Nancy I. France.

**Georgopoulou, A., P. Markoulatos, N. Spyrou and N. C. Vamvakopoulos. 2000.** Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4337-4342.

**Gerba, C. P., S. R. Farrah, S. M. Goyal, C. Wallis, and J. L. Melnick. 1978b.** Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage and seawater. *AEM.* 35: 540-548.

**Gerba, C. P., C. H. Stagg and M. G. Abadie. 1978a.** Characterization of sewage solid-associated viruses and behaviour in natural waters. *Wat. Res.* 12: 805-812.

**Gerba. 1987.** Recovery of viruses from sewage, effluents, and water. P 1-51. In Berg (ed) *Methods for recovering viruses from the environment.* CRC Press, Boca Raton, Fla.

**Gilgen, M., B. Wegmuller, P. Burkhalter, H. P. Buhler, V. Muller, J. Luthy and V. Candrian. 1995.** Reverse transcription PCR to detect Enteroviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1226-1231.

**Girond, S., J. M. Crance, H. Van Cuyck-Gandre, J. Reanudet and R. Deloince. 1991.** Antiviral activity of carrageenan on hepatitis virus replication in cell culture. *Res. Virol.* 142: 261-270.

**Goodheart, C. R. 1969.** An introduction to virology. W. B. Saunders, Philadelphia.

**Gorman, S. P. and E. M. Scott. 1977.** Uptake and media reactivity of glutaraldehyde solutions related to structure and biocidal activity. *Microbios Lett.* 5: 163-169.

**Gorman, S. P., E. M. Scott and A. D. Russell. 1980.** Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 161-190.

**Gottardi, W. 1991.** Iodine and iodine compounds, p. 152-166. In S. S. Block (ed.) *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Gow, J. W., W. M. H. Behan, G. B. Clements, C. Woodall, M. Riding and P. O. Behan. 1991.** Enterovirus RNA sequences detected by polymerase chain reaction in muscle of patients with postviral fatigue syndrome. *British Med. J.* 302: 692-696.

**Grabow, W. O. K., K. L. Botma, J. C. de Villiers, C. G. Clay and B. Erasmus. 1999.** Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull. WHO.* 77: 973-980.

**Grabow, W. O. K., V. Gaus-Müller, O. W. Prozesky and F. Deinhardt. 1983.** Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 619-624.

**Grabow, W. O., D. L. Puttergill and A. Bosch. 1992.** Propagation of adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. *J. Virol. Methods.* 37: 201-207.

**Grabow, W. O., M. B. Taylor and J. C. Villiers. 2001.** New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Wat. Sci. Technol.* 43: 1-8.



**Green, D. H. and G. D. Lewis. 1999.** Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Wat. Res.* 33: 1195-1200.

**Green, J. A. and S. Baron. 1975.** 5-Iododeoxyuridine potentiation of the replication in vitro of several unrelated RNA and DNA viruses. *Science* 190: 1099-1101.

**Guelin, A. 1952.** Application de la recherche des bacteriophages a l'etude des eaux pollues. I. La survie des enterobacteriacees dans les eaux. II. Bacteriophages des eaux a grandes et petites plages. *Ann. Ins. Pasteur, Paris.* 82 : 78-89.

**Guillot, S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux and R. Crainic. 2000.** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74: 8434-8443.

**Guttman-Bass, N. 1982.** Cell cultures and other host systems for detecting and quantifying viruses in the environment pp 195-228. In: *Methods for recovering viruses from the environment*, Berg (ed). CRC Press, Inc. Boca Ratan, Florida.

**Guttman-Bass, N. and A. Nasser. 1984.** Simultaneous concentration of four enteroviruses from tap, waste, and natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1311-1315.

**Guttman-Bass, N. and J. Catalano-Sherman. 1986.** Humic acid interference with virus recovery by electropositive microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 556-561.

## H

**Hamby, B. B., M. A. Pallansch and O. M. Kew. 1987.** Reemergence of an epidemic coxsackievirus B5 genotype. *J. Infect. Dis.* 156: 288-292.

**Hamper, B., J. G. Dege, M. Nonoyama, S. Y. Chang, M. A. Tagamefo and S. D. Showalter. 1974.** Programming of events in Epstein-Barr virus-activated cells induced by 5-iododeoxyuridine. *Virology* 62: 71-89.

**Hashimoto, S., N. Sakakibari, H. Kuma, M. Nakai, S. Sakuma, S. Chiba and K. Fujinaga. 1991.** Fastidious human adenovirus type 40 can propagate efficiently and produce plaques on a human cell line, A549, derived from lung carcinoma. *J. Virol.* 65: 2429-2435.

**Havelaar, A. H. and W. H. Hogeboom. 1984.** A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 439-447.

**Haverkos, H. W., N. Battula, D. P. Drotman and O. M. Rennert. 2003.** Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 57: 379-385.

**Hejkal, T. W., E. M. Smith and C. P. Gerba. 1984.** Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 588.

**Hejkal, T. W., f. M. Wellings, A. L. Lewis and P. A. LaRock. 1981.** Distribution of viruses associated with particles in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 628-634.

**Hejkal, T. W., F. M. Wellings, P. A. LaRock and A. L. Lewis. 1979.** Survival of poliovirus within organic solids during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 114-118.

**Hinman, A. 1999.** Eradication of vaccine-preventable diseases. *Ann. Rev. Public Health.* 20: 211-229.

**Holland, J. J., K. Spindles, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol and S. Vandepol. 1982.** Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* 215: 1577-1585.

**Hovi, T., M. Stenvik and M. Rosenlew. 1996.** Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients-clinical and epidemiologic implications. *Epidemiol. Infect.* 116: 91-97.

**Hsiung, G. D. and J. L. Melnick. 1958.** Adsorption, multiplication and cytopathogenicity of enteroviruses (poliomyelitis, Coxsackie and ECHO groups) in susceptible and resistant monkey kidney cells. *J. Immunol.* 80: 45-52.

**Huang, Q. S., J. M. Carr, W. A. Nix, M. S. Oberste, D. R. Kilpatrick, M. A. Pallansch, M. C. Croxson, J.**

**A. Lindeman, M. G. Baker and K. Grimwood. 2003.** An echovirus type 33 winter outbreak in New Zealand. *Clin. Infect. Dis.* 37: 650-657.

**Huang, Y. T., P. Yam, H. Yan and Y. Sun. 2002.** Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 40: 366-371.

**Hughes, M. S., P. V. Coyle and J. H. Connolly. 1992.** Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. *Epidemiol. Infect.* 108: 529-536.

**Hurst, C. J., K. A. McClellan and W. H. Benton. 1988.** Comparison of cytopathogenicity, immunofluorescence and in situ DNA hybridization as methods for the detection of adenoviruses. *Wat. Res.* 22:1547-1552.

**Hyypiä, T., P. Stalhandske, R. Vainionpää and U. Petterson. 1984.** Detection of enteroviruses by spot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 19: 436-438.

**Hyypiä, T., T. Hovi, N. J. Knowles and G. Stanway. 1997.** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78: 1-11.

## I

**IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. 1991.** Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat. Res.* 25: 529-545.

**ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2001.** The Classification of the Picornaviridae. Recurs electrònic; <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/picornaviridae/picomastudygroup/ictv-7a.htm>. Gener 2004.

**Ijaz, M. K., S. A. Sattar, C. M. Johnson-Lussenburg and V. S. Springthorpe. 1985a.** Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 289-293.

**Ijaz, M. K., S. A. Sattar, C. M. Johnson-Lussenburg, V. S. Springthorpe and R. C. Nair. 1985b.** Effect of relative humidity, atmospheric temperature and suspending medium on the airborne survival of human rotavirus. *Can. J. Microbiol.* 31: 681-685.

**Irving, L. G. and F. A. Smith. 1981.** One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 51-59.

## J

**Jensen, H., K. Thomas and D. G. Sharp. 1980.** Inactivation of coxsackievirus B3 and B5 in water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 633-640.

**Jerkofsky, M. and F. Rapp. 1975.** Stimulation of adenovirus replication in simian cells in the absence of a helper virus by pretreatment of the cells with iododeoxyuridine. *J. Virol.* 15: 253-258.

**Jiang, X., M. K. Estes and T. G. Metcalf. 1987.** Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2487.

**Jofre, J., A. Bosch, F. Lucena, R. Gironés and C. Tartera. 1986.** Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Wat. Sci. Technol.* 18: 167-173.

**Jofre, J., F. Lucena, L. Matia i F. Ribas. 2003.** La qualitat de l'aigua de consum humà a Catalunya. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. Barcelona.

**Jolik, W. K. 1972.** Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology* 49: 700-715.

## K

**Kao, C. H., S. S. Lee, Y. C. Liu, M. Y. Yen, Y. S. Chen, S. R. Wan, H. H. Lin, W. R. Lin, C. K. Huang and C. Chin. 2003.** Outbreak of aseptic meningitis among adults in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36: 192-196.

**Katzenelson, E. and S. Kedmi. 1979.** Unsuitability of polioviruses as indicators of virological quality of water. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 343-344.

**Katzenelson, E., B. Fattal and T. Hostoversky. 1976.** Organic Flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 638-639.

- Kedmi, S. and B. Fattal. 1981.** Evaluation of the false-positive enteroviral plaque phenomenon occurring in sewage samples. *Wat. Res.* 15: 73.
- Kerr, C. 2003.** Poliovirus cases rise in India. *The Lancet Infect. Dis.* 3: 264.
- Kew, O., V. Morris-Glasgow, M. Landaverde, C. Burns, J. Shaw, Z. Garib, J. André, E. Blackman, C. J. Freeman, J. Jorba, R. Sutter, G. Tambini, L. Venczel, C. Pedreira, F. Laender, H. Shimizu, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. van der Avoort, M. S. Oberste, D. Kilpatrick, S. Cochi, M. Pallansch and C. de Quadros. 2002.** Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science.* 296: 356-359.
- Kinnunen, L., A. Huovilainen, T. Pöyry and T. Hovi. 1990.** Rapid molecular evolution of wild 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J. Gen. Virol.* 71: 317-324.
- Kitahori, Y., Y. Inoue, Y. Maruhashi, O. Adachi and S. Imai. 2003.** An epidemic of aseptic meningitis due to coxsackievirus B5 in Nara prefecture, Japan : an epidemiological analysis by PCR-RFLP.
- Knipe, D. M. and P. M. Howley (ed). 2001.** *Fields Virology.* 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, cop. Philadelphia.
- Kobayashi, H., M. Tsuzuki, K. Koshimizu, H. Toyama, N. Yoshihara, T. Shikata, K. Abe, K. Mizuno, N. Otomo and T. Oda. 1984.** Susceptibility of hepatitis B virus to disinfectants or heat. *J. Clin. Microbiol.* 20: 214-216.
- Kopecka, H., B. Brown and M. Pallansch. 1995.** Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res.* 38: 125-136.
- Kott, Y., N. Roze, s. Sperber and N. Betzer. 1974.** Bacteriophages as viral pollution indicators. *Wat. Res.* 8: 165-177.
- Krikelis, V., N. Spyrou and P. Markoulatos. 1988.** Evaluation of enteric virus levels and serotypes recovered from wastewater and seawater. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 32: 153-158.
- Kuan, M. M. 1997.** Detection and rapid differentiation of human enteroviruses following genomic amplification. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2598-2601.
- Kühn, I., G. Allestam, A. Stenström and R. Mölby. 1991.** Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3171-3177.
- ## L
- Landry, E. F., J. M. Vaughn, M. Z. Thomas and T. J. Vicalé. 1978.** Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 544-548.
- Lane, R. J. M., B. A. Soteriou, H. Zhang and L. C. Archard. 2003.** Enterovirus related metabolic myopathy: a postviral fatigue syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 74: 1382-1386.
- Levy, D. A., M. S. Bens, G. F. Craun, R. L. Calderon and B. L. Herwaldt. 1998.** Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks -United States, 1995-1996. *CDC MMWR Surveillance Summaries.* 47: 1-34.
- Lucena F., A. Bosch, J. Jofre and L. Schwartzbrod. 1985.** Identification of viruses isolated from sewage, riverwater and coastal seawater in Barcelona. *Wat. Res.* 19: 1237-1239.
- Lucena F., L. Schwartzbrod and A. Bosch. 1986.** The effect of a mass poliomyelitis vaccination program on the occurrence of enterovirus in seawater. *Zbl. Bakt. Hyg.* 183: 67-69.
- Lucena, F., A. Bosch, J. Ripoll and J. Jofre. 1988.** Fecal pollution in Llobregat river: interrelationships of viral, bacterial, and physico-chemical parameters. *Wat. Air Soil Pollut.* 39: 15-25.
- Lucena, F., C. Finance, J. Jofre, J. Sancho and L. Schwartzbrod. 1982.** Viral pollution determination of superficial waters (river water and sea-water) from the urban area of Barcelona (Spain). *Wat. Res.* 16: 173-177.
- Lucena, F., X. Méndez, A. Morón, E. Calderón, C. Campos, A. Guerrero, M. Cárdenas, C. Gantzer, L. Schwartzbrod, S. Skraber and J. Jofre. 2003.**

Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *J. Appl. Microbiol.* 94: 808-815.

**Lukasik, J., T. M. Scott, D. Andryshak and S. R. Farrah. 2000.** Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2914-2920.

## M

**Ma J-F., T. M. Straub, I. L. Pepper and C. P. Gerba. 1994a.** Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4203-4206.

**Ma, J., J. Naranjo and C. P. Gerba. 1994b.** Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1974-1977.

**Manayani, D. J., R. V. Shaji, G. J. Fletcher, T. Cherian, N. Murali, N. Sathish, T. Solomon, C. Gnanamuthu and G. Sridharan. 2002.** Comparison of molecular and conventional methods for typing of enteroviral isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1069-1070.

**Mas, P., J. L. Pelegrino, M. G. Guzman, M. M. Comellas, S. Resik, M. Alvarez, R. Rodriguez, M. Mune, V. Capo, A. Balmaseda, L. Rodriguez, M. P. Rodriguez, J. Handy, G. Kouri and A. Llop. 1997.** Viral isolation from cases of epidemic neuropathy in Cuba. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121: 825-833.

**Matsuura, K., M. Ishikura, H. Yoshida, T. Nakayama, S. Hasegawa, S. Ando, H. Horie, T. Miyamura and T. Kitamura. 2000.** Assessment of poliovirus eradication in Japan: genomic analysis of polioviruses isolated from river water and sewage in Toyama Prefecture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5087-5091.

**Matsuura, K., S. Hasegawa, T. Nakayama, O. Morita and H. Uetake. 1984.** Viral pollution of the rivers in Toyama city. *Microbiol. Immunol.* 28: 575-588.

**Mayo, M. and C. R. Pringle. 1998.** Virus taxonomy – 1997. *J. Gen. Virol.* 79: 649-657.

**Mbithi, J. N., V. S. Springthorpe and S. A. Sattar. 1990.** Chemical disinfection of hepatitis: a virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3601-3604.

**Mbithi, J. N., V. S. Springthorpe and S. A. Sattar. 1991.** Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1394-1399.

**McIntyre, J. P. and G. A. Keen. 1993.** Laboratory surveillance of viral meningitis by examination of cerebrospinal fluid in Cape Town, 1981-9. *Epidemiol. Infect.* 111: 357-371.

**Melnick J. L., R. Safferman, V. C. Rao, S. Goyal, G. Berg, D. R. Dahling, B. A. Wright, E. Akin, R. Stetler, C. Sorber, B. Moore, M. D. Sobsey, R. Moore, A. L. Lewis, and F. M. Wellings. 1984.** Round robin investigation on methods for the recovery of poliovirus from drinking water. *AEM.* 47: 144-150.

**Melnick, J. L. 1984.** Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus diseases. *Monogr. Virol.* 15: 1-16.

**Melnick, J. L. 1996.** Enterovirus, Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus and newer Enteroviruses. pp. 655-712. In *Fields Virology B*. N., Knipe D. M., Howley P. M (eds). Lippincott-Raven Publishers. Pa, USA.

**Metcalfe, T. C., E. Moulton and D. Eckerson. 1980.** Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 141-152.

**Metcalfe, T. G., J. L. Melnick and M. K. Estes. 1995.** Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – A trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 461-487.

**Minor, P. D. 1992.** The molecular biology of poliovaccines. *J. Gen. Virol.* 73: 3065-3077.

**Mix, T. V. 1974.** The physical chemistry of membrane-virus interaction. *Develop. Ind. Microbiol.* 15:136-142.

**Mix, T. V. 1987.** Mechanisms of adsorption and elution of viruses to and from surfaces. pp. 127-139

In: Berg, G. (Ed.), *Methods for recovering viruses from the environment*. CRC Press, Boca Raton FL.

**Mocé-Llivina, L., J. Jofre and M. Muniesa. 2003.** Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions. *J. Virol. Methods*. 109: 99-101.

**Mocé-Llivina, L., J. Jofre, X. Méndez, D. Akkelidou, F. Lucena and G. T. Papageorgiou. 2002.** Counting cytopathogenic virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. *J. Virol. Methods*. 102: 83-92.

**Mocé-Llivina, L. F. Lucena and J. Jofre. 2004.** A double layer plaque assay for quantification of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol. En premsa*.

**Moore, N. J. and A. B. Margolin. 1993.** Evaluation of radioactive and nonradioactive gene probes and cell culture for detection of poliovirus in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3145-3146.

**Morris, R. 1984.** Reduction of naturally occurring enteroviruses by wastewater treatment processes. *J. Hyg.* 92: 97-103.

**Morris, R. and C. Waite. 1980.** Evaluation of procedures for recovery of viruses from water. *Wat. Res.* 14: 791-798.

**Morris, R. and D. N. Sharp. 1984.** Enteric virus levels in wastewater effluents and surface waters in the severn trent water authority 1979-1981. *Wat. Res.* 18: 935-939.

**Muscillo, M., F. A. Aulicino, A. M. Patti, P. Orsini, L. Volterra and G. M. Fara. 1994.** Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Wat. Res.* 28: 1-7.

## N

**Nathanson, N. and P. Fine. 2002.** Poliomyelitis eradication—a dangerous endgame. *Science*. 296: 269-270.

**Nestor, I. and L. Costin. 1976.** Presence of certain enteroviruses (Coxsackie) in sewage effluents and in river waters of Roumania. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 20: 137-149.

**Nestor, I., L. Costin, D. Sovrea and N. Ionescu. 1978.** Enteric viruses in the Danube river water and sludge. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 22: 144-151.

**Nottay, B. K., O. M. Kew, N. H. Hatch, J. T. Heyward and J. F. Obijeski. 1981.** Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology*. 108: 405-423.

**Nuanualsuwan, S. and D. O. Cliver. 2003.** Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1629-1632.

## O

**O'Brien, R. T. and J. Newman. 1979.** Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1034-1039.

**Oberste, M. S., W. A. Nix, D. R. Kilpatrick, M. R. Flemister and M. A. Pallansch. 2003.** Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus Res.* 91: 241-248.

**Oprisan, G., M. Combiescu, S. Guillot, V. Caro, A. Combiescu, F. Delpeyroux and D. Crainic. 2002.** Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 2193-2200.

## P

**Palacios, G., I. Casas, D. Cisterna, G. Trallero, A. Tenorio and C. Freire. 2002.** Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J. Virol.* 76: 4940-4949.

**Pallin, R., A. P. Wyn-Jones, B. M. Place and N. F. Lightfoot. 1997.** The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*. 67: 57-67.

- Papageorgiou, G. 2000.** Description of a simple method for the enumeration and identification of viruses adsorbed to cellulose nitrate membranes. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- Papageorgiou, G. T., L. Mocé-Llivina and J. Jofre. 2001.** New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5844-5848.
- Papageorgiou, G. T., L. Mocé-Llivina, C. G. Christodoulou, F. Lucena, D. Akkelidou, E. Ioannou and J. Jofre. 2000.** A simple methodological approach for counting and identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 194-198.
- Paul, J. H., S. C. Jiang and J. B. Rose. 1991.** Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2197-2204.
- Payment, P. and M. Trudel. 1979.** Efficiency of several micro-fiber glass filters for recovery of poliovirus from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 365-368.
- Payment, P. and M. Trudel. 1985.** Influence of inoculum size, incubation temperature and cell culture density on virus detection in environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 31: 977-980.
- Payment, P., E. Morin and M. Trudel. 1988b.** Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water. *Can. J. Microbiol.* 34: 907-910.
- Payment, P., F. Affoyon and M. Trudel. 1988a.** Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assomption River and its tributaries. *Can. J. Microbiol.* 34: 967-973.
- Payment, P., M. Tremblay and M. Trudel. 1985.** Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 981-983.
- Payment, P., R. Plante and P. Cejka. 2001.** Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Can. J. Microbiol.* 47: 188-193.
- Payment, P., S. Fortin and M. Trudel. 1984.** Ferric chloride flocculation for nonflocculating beef extract preparations. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 591-592.
- Payment, P., S. Fortin and M. Trudel. 1986.** Elimination of human enteric viruses during conventional wastewater treatment by activated sludge. *Can. J. Microbiol.* 32: 922-925.
- Payment, P., Y. Larose and M. Trudel. 1979.** Poliovirus as indicator of virological quality of water. *Can. J. Microbiol.* 25: 1212-1214.
- Peigue-Lafeuille, H., F. Fuchs, F. Gharabaghi, M. Chambon and M. Aymard. 1990.** Impact on routine diagnosis of echovirus infections of intratypic differentiation and antigenic variation in echovirus type 25 studied by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2291-2296.
- Pianetti, A., W. Baffone, B. Citterio, A. Casaroli, F. Bruscolini and L. Salvaggio. 2000.** Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Epidemiol. Infect.* 125: 455-462.
- Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre and R. Girones. 1998.** Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3376-3382.
- Pinto, M., S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Kedingier, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assman, K. Haffen, J. Fogh and A. Zweibaum. 1983.** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. *Biol. Cell.* 47: 323-330.
- Power, E. G. M. 1995.** Aldehydes as biocides. *Prog. Med. Chem.* 34: 149-201.
- Pöyry, T., L. Kinnunen and T. Hovi. 1992.** Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *J. Virol.* 66: 5313-5319.
- Pöyry, T., L. Kinnunen, T. Hyypiä, B. Brown, C. Horsnell, T. Hovi and G. Stanway. 1996.** Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 77: 1699-1717.

**Prabhakar, B. S., M. V. Haspel, P. R. McClintock and A. L. Notkins. 1982.** High frequency of antigenic variants among naturally occurring human coxsackie B4 virus isolates identified by monoclonal antibodies. *Nature*. 300: 374-376.

**Preston, D. R., T. V. Vasudevan, G. Bifton, S. R. Farrah and J. Morel. 1988.** Novel approach for modifying microporous filters for virus concentration from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1325-1329.

**Prince, H. N., D. L. Prince and R. N. Prince. 1991.** Principles of viral control and transmission, p. 411-444. In S. S. Block (ed.) *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Pringle, C. R. 1999.** Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch. Virol.* 144: 2065-2070.

**Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell and R. Girones. 1994.** Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2963-2970.

## Q

**Quintero-Betancourt, W., E. Lipp, M. Mc Laughlin, M. Callahan, D. Huffman and J. B. Rose. 2000.** Pathogen specific monitoring of ground water surface and reclaimed effluents in the state of Florida. 1<sup>st</sup> world water congress of the IWA. Paris, Juliol 2000.

## R

**Rains C. P., H. M. Bryson and D. H. Peters. 1995.** Ceftazidime. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic activity. *Drugs*. 49 (4): 577-617.

**Rao, V. C., K. M. Seidel, S. M. Goyal, T. G. Metcalf and J. L. Melnick. 1984.** Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus

adsorbed to sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 404-409.

**Rao, V. C., S. V. Waghmare and S. B. Lakhe. 1981.** Detection of viruses in drinking water by concentration on magnetic iron oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 421-426.

**Regli, S., J. Rose, C. N. Haas and C. P. Gerba. 1991.** Modeling risk for pathogens in drinking water. *JAWWA*. 83: 76-84.

**Reigel, F. 1985.** Isolation of human pathogenic viruses from clinical material on CaCo-2 cells. *J. Virol. Methods*. 12: 323-327.

**Resnick, L., K. Varen, S. Z. Salahuddin, S. Tondreau and P. D. Markham. 1986.** Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *JAMA* 255: 1887-1891.

**Reynolds, K. A., R. Kimberly, R. S. Fujioka, C. P. Gerba and I. L. Pepper. 1998.** Incidence of enteroviruses in Mamal Bay, Hawaii using cell culture and direct polymerase chain reaction methodologies. *Can. J. Microbiol.* 44: 598-604.

**Ribas, F. 1991.** Detección de virus entéricos en aguas naturales y potabilizadas y en residuos del proceso de potabilización. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona-AGBAR.

**Richards, G. P. and D. A. Weinheimer. 1985.** Influence of adsorption time, rocking and soluble proteins on the plaque assay of monodispersed poliovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 744-748.

**Rodriguez-Boulan, E. and W. J. Nelson. 1989.** Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*. 245: 718-725.

**Rolland, D., J. C. Joret, F. Villeval, J. C. Block and P. Hartemann. 1983.** Sampling strategy for detecting viruses in a sewage treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1767-1774.

**Rose, J. B., S. N. Singh, C. P. Gerba and L. M. Kelley. 1984.** Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 989-992.

**Rose, J., N. Sinh, C. Gerba and L. Kelly. 1984.** Comparison of Microporous Filters for

Concentration of Viruses from Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 989-992.

**Rotbart, H. A. 1991.** Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 4: 156-168.

**Rubin, J. 1991.** Human immunodeficiency virus (HIV) disinfection and control, p. 472-481. In S. S. Block (ed.) *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Russell, A. D., W. B. Hugo and G. A. J. Ayliffe. 1999.** Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.

## S

**Sabin, A. B. and L. R. Boulger. 1973.** History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* 1: 115-118.

**Salk, J. and D. Salk. 1977.** Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines. *Science.* 195: 834-837.

**Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.

**Santti, J., T. Hyypiä, L. Kinnunen and M. Salminen. 1999.** Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* 73: 8741-8749.

**Sato, K., Y. Inaba, T. Shinozaki, R. Fujii and M. Matumoto. 1981.** Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch. Virol.* 69: 155.

**Sattar, S. A. and S. A. Ansari. 2002.** The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses. *J. Virol. Methods.* 103: 171-181.

**Sattar, S. A., K. D. Dimock, S. A. Ansari and V. S. Springthorpe. 1988.** Spread of acute hemorrhagic conjunctivitis due to enterovirus-70: effect of air temperature and relative humidity on virus survival on fomites. *J. Med. Virol.* 25: 289-296.

**Sattar, S. A., M. K. Ijaz, C. M. Johnson-Lussenburg and V. S. Springthorpe. 1984.** Effect of relative

humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 879-881.

**Sattar, S. A., N. Lloyd-Evans and V. S. Springthorpe. 1986.** Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J. Hyg. Camb.* 96: 277-289.

**Sattar, S. A., V. S. Springthorpe, B. Conway and Y. Xu. 1994.** Inactivation of the human immunodeficiency virus: an update. *Rev. Med. Microbiol.* 5: 139-150.

**Sattar, S. A., Y. G. Karin, V. S. Springthorpe and C. M. Johnson-Lussenburg. 1987.** Survival of human rhinovirus type 14 dried onto nonporous inanimate surfaces: effect of relative humidity and suspending medium. *Can. J. Microbiol.* 33: 802-806.

**Schaper, M. and J. Jofre. 2001.** Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J. Virol. Methods.* 89: 1-10.

**Schaper, M., A. E. Durán and J. Jofre. 2002.** Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3702-3707.

**Schaper, M., J. Jofre, M. Vys and W. O. K. Grabow. 2002.** Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92: 657-667.

**Schmidt, N. J., H. H. Ho, J. L. Riggs and E. H. Lennette. 1978.** Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 480-486.

**Schvoerer, E., M. Ventura, O. Dubos, G. Cazaux, R. Serceau, N. Gournier, V. Dubois, P. Caminade, H. J. A. Fleury, M. Lafon. 2001.** Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res. Microbiol.* 152: 179-786.



- Schwartzbrod, L. and F. Lucena-Gutiérrez. 1978.** Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre: proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia*. 4: 55-58.
- Scott, E. M. and S. P. Gorman. 1991.** Glutaraldehyde, P. 596-614. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization and preservation*, 4<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger. Philadelphia, Pa.
- Sedmak, G., D. Bina and J. MacDonald. 2003.** Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7181-7187.
- Sekla, L., W. Stackiw, C. Kay and L. VanBuckenhouf. 1980.** Enteric viruses in renovated water in Manitoba. *Can. J. Microbiol.* 26: 518-523.
- Sellwood, J., J. V. Dadswell and J. S. Slade. 1981.** Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *J. Hyg.* 86: 217-225.
- Selmaier, H. P. and R. Wigand. 1983.** The influence of iododeoxyuridine pretreatment of various cell cultures on adenovirus multiplication. *Med. Microbiol. Immunol.* 171: 251-258.
- Shaffer, P. T. B., T. G. Metcalf and O. J. Sproul. 1980.** Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1115-1121.
- Sharp, D. G. and J. Leong. 1980.** Inactivation of poliovirus and (Brunhilde) single particles by chlorine in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 381-385.
- Sharp, D. G., D. C. Young, R. Floyd and J. D. Johnson. 1980.** Effect of ionic environment on the inactivation of poliovirus in water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 530-534.
- Shields, P. A. and S. R. Farrah. 1986.** Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 211-213.
- Shields, P. A., S. A. Berenfeld and S. R. Farrah. 1985.** Modified membrane-filter procedure for concentration of enteroviruses from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 453-455.
- Shuval, I. H. 1991.** Health Guidelines and Standards for Wastewater Reuse in Agriculture: Historical Respectives. *Wat. Sci. Technol.* 23: 2073-2080.
- Simmonds, R. S., G. D. Lewis, M. W. Loutif and F. J. Austin. 1982.** A method for detecting and identifying enteroviruses in effluents. *New Zealand J. Sci.* 25: 57-60.
- Simon, M. and I. Dömök, 1966.** Enhancing effect of human erythrocyte extracts on the susceptibility of monkey kidney cells to certain enterovirus. *Acta Microbiol. Ac. Sci. Hung.* 13: 229-234.
- Slade J. S. 1978.** Enteroviruses in slow sand filtered water. *J. Inst. Wat. Eng. Sci.* 32: 530-536
- Slade, J. S., R. G. Chisholm, and N. R. Harris. 1984.** Detection of Enteroviruses in Water by Suspended-Cell Cultures. In *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*. ISBN 0-12-295040-2
- Smith, E. M. and C. P. Gerba. 1982.** Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1440-1450.
- Smith, J., R. Leke, A. Adams and R. H. Tangermann. 2004.** Certification of polio eradication: process and lessons learned. *Bull. WHO.* 82: 24-30
- Sobsey M. D. and B. L. Jones. 1979.** Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 588-595.
- Sobsey M. D. and J. S. Glass. 1980.** Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *AEM* 40:201-210
- Sobsey, M. D. and J. S. Glass. 1984.** Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 956-960.
- Sobsey, M. D. and T. Cromeans. 1985.** Effects of bentonite clay solids on poliovirus concentration from water by microporous filter methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 795-798.

**Sobsey, M. D., C. P. Gerba, C. Wallis, and J. L. Melnick. 1977.** Concentration of enteroviruses from large volumes of turbid estuary water. *Can. J. Microbiol.* 23: 770-778

**Sobsey, M. D., S. E. Oglesbee, D. A. Wait and A. I. Cuenea. 1984.** Detection of hepatitis A in drinking water. *Wat. Sci. Technol.* 17: 23.

**Spendlove, R. S. and F. L. Schaffer. 1965.** Enzymatic enhancement of infectivity of reovirus. *J. Bacteriol.* 89: 597-602.

**Spinner, M. L. and G. D. Di Giovanni. 2001.** Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3016-3020.

**Springthorpe, V. S. and S. A. Sattar. 1990.** Chemical disinfection of virus-contaminated surfaces. *Crit. Rev. Environ. Control* 20: 169-229.

**Springthorpe, V. S., J. L. Grenier, N. Lloyd-Evans and S. A. Sattar. 1986.** Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests. *J. Hyg.* 97: 139-161.

**St. Jeor, S. and F. Rapp. 1973.** Cytomegalovirus replication in cells pretreated with 5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Virol.* 11: 986-990.

## T

**Tani, N., Y. Dohi, N. Kurumatani and K. Yonemasu. 1995.** Seasonal distribution of Adenoviruses, Enteroviruses and Reovirus in urban river water. *Microbiol. Immunol.* 39: 577-580.

**Tartera, C., R. Araujo, T. Michel and J. Jofre. 1992.** Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting *Bacteroides fragilis* in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2670-2673.

**Taylor, G. R. and M. Butler. 1982.** A comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine. *J. Hyg.* 89: 321-328.

**Taylor, M. B., W. O. K. Grabow and W. D. Cubitt. 1997.** Propagation of human astroviruses in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J. Virol. Methods.* 67: 13-18.

**Thoelen, I., P. Lemey, I. Van der Donck, K. Beuselinck, A. M. Lindberg and M. Van Ranst. 2003.** Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000.

**Thomas, H. A., Jr. 1942.** Bacterial densities from fermentation tube tests. *J. Amer. Wat. Works Assoc.* 34: 572.

**Tracy, S. 1984.** A comparison of the genomic homologies in the coxsackievirus B group: use of fragments of the cloned coxsackievirus B3 genome as probes. *J. Gen. Virol.* 65: 2167-2172.

## U

**Urban, C., A. Schweinberger, M. Kundi, F. Dörner and T. Hämmerle. 2003.** Relationship between detection limit and bias of accuracy of quantification of RNA by RT-PCR. *Mol. Cel. Prob.* 17: 171-174.

## V

**Valot, S., D. Ederf and A. Le Faou. 2000.** A simple method for the in vitro study of virucidal activity of disinfectants. *J. Virol. Methods.* 86: 21-24.

**Van Olphen, M., H. A. M. De Bruin, A. H. Havelaar and J. F. Schijven. 1991.** The virological quality of recreational waters in the Netherlands. *Wat. Sci. Technol.* 24: 209-212.

**Van Olphen, M., J. G. Kapsenberg, E. van de Baan and W. A. Kroon. 1984.** Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 927-932.

**Vantarakis, A. and M. Papapetropoulou. 1999.** Detection of enteroviruses, adenoviruses and hepatitis A viruses in raw sewage and treated

effluents by nested-PCR. *Wat. Air Soil. Poll.* 114: 85-93.

**Vaughn, J. M., E. F. Landry, M. Z. Thomas, T. J. Vicalé and W. F. Penello. 1979.** Survey of human enterovirus occurrence in fresh and marine surface waters on Long Island. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 290-296.

**Vidal, A., F. Lucena, I. Arza, F. Valero and J. Jofre. 1997.** Análisis de enterovirus en aguas superficiales. Artículos técnicos. *Tecnología del Agua.* 170: 38-48.

**Vilagines, P., B. Sarrette, C. Danglot and R. Vilagines. 1979.** Detection of enteroviruses by a concentration on glass powder in a liquid bed from samples of 500 liters of surface water. *R.Bull. Acad. Natl. Med.* 163: 668-673.

**Vilagines, P., B. Sarrette, G. Husson and R. Vilagines. 1993.** Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Wat. Sci. Technol.* 27: 299-306.

**Villena, C. 2003.** Vigilancia ambiental molecular de rotavirus grupo A humanos. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona.

**Villena, C., W. Morsy El-Senousy, F. X. Abad, R. M. Pinto and A. Bosch. 2003.** Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3919-3923.

## W

**Wallis and Melnick. 1967.** Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes. *Bull WHO.* 36: 219-225.

**Wallis et al. 1972.** Enterovirus concentration on cellulose membranes. *AEM.* 23: 476-480

**Ward, C. D. and J. B. Flanagan. 1992.** Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66: 3784-3793.

**Ward, R. L., D. R. Knowlton and P. E. Winston. 1986.** Mechanisms of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 450-459.

**Webb, S. R., K. P. Kears, c. L. Foulke, P. C. Hartig and B. S. Prabhakar. 1986.** Neutralization epitope diversity of coxsackievirus B4 isolates detected by monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 20: 9-15.

**WHO. 1979.** Human Viruses in Water, Wastewater and Soil; Report of a WHO Scientific Group, Technical Reports Series 639. World health organization, Geneva, Switzerland, 50 pp.

**WHO. 1989.** Health Guidelines fo the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. WHO Technical Report Series, No. 778, Geneva.

**William, F. H. Jr, W. Jakubowski, E. W. Akin and N. A. Clarke. 1976.** Detection of virus in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 254-261.

**Williams, J. F. 1970.** Enhancement of adenovirus plaque formation on HeLa cells by magnesium chloride. *J. Gen. Virol.* 9: 251-255.

**Woolwine, J. D. and J. L. Gerberding. 1995.** Effect of testing method on apparent activities of antiviral disinfectants and antiseptics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 39: 921-923.

**Wullenweber, M. and F. Agbalika. 1984.** Enterovirus types in samples of activated sewage sludge. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 178: 522-526.

## Y

**Yilmaz, A. and E. F. Kaleta. 2003.** Evaluation of virucidal activity of three commercial disinfectants and formic acid using bovine enterovirus type 1 (ECBO virus), mammalian orthoreovirus type 1 and bovine adenovirus type 1. *The Veterinary Journal.* 166: 67-78.

**Yoshida, H., H. Horie, K. Matsuura, T. Kitamura, S. Hashizume and T. Miyamura. 2002.** Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. *J. Gen. Virol.* 83: 1107-1111.

**Z**

**Zoll, J., J. Galama and W. Melchers. 1994.**

Intratypic genome variability of the coxsackievirus  
B1 2A protease region. *J. Gen. Virol.* 75: 687-692.



ANNEX I. MATERIAL I MÈTODES  
GENERAL

## TÈCNIQUES DE CULTIU CEL·LULAR

### MANTENIMENT DE LÍNIES CEL·LULARS

#### OBJECTIU

Manteniment de les línies cel·lulars en òptimes condicions al llarg del temps.

#### PROCEDIMENT

- Temperar el PBS 1x pH 7,2 (Annex II) i la solució de tripsina-EDTA (Annex II) a 37°C.
- Observar mitjançant un microscopi invertit els flascons, comprovant que presenten una monocapa cel·lular confluent.
- Decantar el medi de cultiu i afegir 5 mL per cada 25 cm<sup>2</sup> (35 mL en un flascó de 175 cm<sup>2</sup>) de PBS 1x estèril pel cantó oposat del flascó al que hi ha el creixement cel·lular, per realitzar un rentat, eliminant les restes de sèrum fetal boví que interferirien amb l'acció de la tripsina, inhibint-la.
- Decantar el PBS i afegir 3 mL per cada 25 cm<sup>2</sup> de tripsina-EDTA pel cantó oposat al creixement.
- Mantenir el flascó en posició horitzontal de manera que la monocapa de cèl·lules quedi totalment coberta per la tripsina durant 15-30 segons. Decantar l'excés de tripsina mantenint un volum d'aproximadament 2 mL en el flascó, assegurant que la monocapa no ha començat a desprendre's.
- Incubar de 5 a 15 minuts en posició horitzontal fins que les cèl·lules es desprenguin de la superfície del flascó. No provocar que les cèl·lules es disgreguin abans de temps per tal d'evitar la formació d'agregats cel·lulars i la no homogeneïtat de la suspensió cel·lular.
- Afegir medi de creixement (de 18 a 35ml en un flascó de 175 cm<sup>2</sup>) i disgregar les cèl·lules al màxim amb l'ajuda d'una pipeta estèril. A l'hora es fan saltar les poques cèl·lules que quedessin encara adherides a la superfície del flascó. Els medis de creixement i de manteniment emprats depenent de la línia cel·lular, es detallen a la taula A-1.1.
- Comptar les cèl·lules amb ajuda de l'hemocitòmetre o la cambra de recompte de cèl·lules (Fuchs-Rosenthal, Marienfeld, Germany). Aquest pas es fa les primeres vegades per tal de saber quina dilució cal aplicar per obtenir la concentració cel·lular desitjada. Un cop calculat el volum de medi necessari per diluir la suspensió, aquest pas pot ometre's, sobretot en aquelles línies cel·lulars contínues que no presenten cap problema pel que fa al creixement i a la formació de la monocapa.

- Diluir la suspensió cel·lular fins tenir una concentració d'entre  $10^5$  i  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules  $\text{mL}^{-1}$  (l'adient per al subcultiu de les línies cel·lulars contínues),
  - afegint el volum de suspensió cel·lular necessari a un volum ja mesurat de medi (0,2-0,5 mL per  $\text{cm}^2$ ) dipositat als nous flascons o,
  - diluint les cèl·lules en el volum total necessari i distribuint la suspensió cel·lular resultant en nous flascons. L'opció emprada en l'estudi fou aquesta última pel fet que, un cop es té la suspensió cel·lular, es pot optar per preparar nous flascons, plaques o multiplaques.
- Cas de no voler obtenir nous flascons ni plaques i només voler subcultivar les cèl·lules del flascó inicial, seguirem el mateix procediment eliminant el volum de suspensió cel·lular necessari per obtenir la concentració final d'entre  $10^5$  i  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules  $\text{mL}^{-1}$  i afegirem medi de creixement fresc (0,2-0,5 mL per  $\text{cm}^2$ ) al flascó inicial.
- Incubar a  $(36 \pm 2)$  °C durant 3 o 4 dies passats els quals, realitzarem un examen visual dels flascons amb el microscopi invertit.
- Si les cèl·lules formen una monocapa confluent i no es volen tornar a subcultivar ni es vol usar el flascó per inocular-hi una mostra, es farà un rentat amb PBS 1x pH 7,2 (5 mL per cada 25  $\text{cm}^2$ ) i afegirem un volum de 0,2-0,5 mL per  $\text{cm}^2$  de medi de manteniment.
- Incubar de nou a  $(36 \pm 2)$  °C. Si el medi vira de color al cap dels dies quedant groc-ataronjat indica que s'haurà acidificat i caldrà canviar-lo o subcultivar de nou el flascó.
- Independentment del viratge o no de l'indicador de pH del medi, dins un període de 12 dies haurà de procedir-se al subcultiu de les cèl·lules del flascó amb medi de manteniment.

Les línies cel·lulars emprades en la realització del treball es trobaven entre els passis 90 i 200. En el cas de la línia cel·lular BGM, quan aquesta supera el passí 200, cal substituir les cèl·lules per d'altres amb menor nombre de passí.

**Taula A-I.1.** Medis emprats per al manteniment de les línies cel·lulars.

Línia cel·lular	Medi de creixement	Medi de manteniment
<b>BGM</b>	MEM + 5% SFB	MEM + 1% SFB
<b>CaCo-2</b>	MEM + 10% SFB + 1x NEAA	MEM + 2% SFB + 1x NEAA
<b>PLC/PRF/5</b>	MEM + 10% SFB + 1x NEAA	MEM + 2% SFB + 1x NEAA

SFB: sèrum fetal boví

NEAA: aminoàcids no essencials (*Non Essential Aminoacids*)

La preparació i composició detallada dels diferents medis emprats en les tècniques de cultiu cel·lular es recullen a l'Annex II.



## **PREPARACIÓ DE MONOCAPES CEL·LULARS PER A LA INFECCIÓ AMB SUSPENSIONS VIRALS**

### **OBJECTIU**

Obtenir flascons, plaques i multiplaques amb creixement cel·lular confluent per poder infectar aquestes cèl·lules amb suspensions virals per tal de procedir amb la detecció de virus per cultiu cel·lular.

### **PROCEDIMENT**

A partir de flascons de la línia cel·lular determinada on les cèl·lules es trobin formant monocapes confluents procedir amb el protocol per al subcultiu de la línia fins obtenir una suspensió cel·lular que contingui una concentració d'entre  $10^5$  i  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules  $\text{mL}^{-1}$  ressuspeses en medi de creixement. Disposar el volum adient d'aquesta suspensió cel·lular en els recipients que calgui preparar segons indica la taula A-I.2.

En el cas dels flascons, incubar-los tancats a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  durant 3 dies o fins a l'obtenció de monocapes confluents. En el cas de les plaques i les multiplaques, sistemes oberts, incubar-les a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  amb 5%  $\text{CO}_2$  i més del 80% d'humitat relativa fins a l'obtenció de monocapes confluents.

Un cop s'obtenen monocapes confluents, les cèl·lules poden infectar-se amb les suspensions virals segons els procediments de detecció de virus entèrics per inoculació de mostres en medi líquid o en medi sòlid, o bé seguint els procediments de Viraden i de doble capa.

**Taula A-I.2.** Volum de suspensió cel·lular necessari per a la formació de monocapes per a línies cel·lulars contínues dependent del recipient emprat.

Recipient a preparar	Volum de suspensió cel·lular ( $10^5$ i $5 \cdot 10^5$ cèl·lules $\text{mL}^{-1}$ )
<b>Flascó<sup>a</sup> de 175 cm<sup>2</sup></b>	88 mL
<b>Flascó de 80 cm<sup>2</sup></b>	30 mL
<b>Flascó de 25 cm<sup>2</sup></b>	10 mL
<b>Placa<sup>b</sup> de 100 mm x 20 mm</b>	20 mL
<b>Placa de 60 mm x 10 mm</b>	8 mL
<b>Multiplaca de 6 pous</b>	3,2 mL per pou
<b>Multiplaca de 24 pous</b>	0,8 mL per pou
<b>Microplaca de 96 pous</b>	150 $\mu\text{L}$ per pou

<sup>a</sup>Els flascons s'incuben totalment tancats a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

<sup>b</sup>Les plaques s'incuben a  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  i més del 80% d'humitat relativa.

---

**DETECCIÓ DE VIRUS ENTÈRICS PER CULTIU CEL·LULAR. INOCULACIÓ DE MOSTRES EN MEDI LÍQUID**

---

**OBJECTIU**

Determinar la presència o absència en una mostra, de virus capaços de produir efecte citopàtic en les cèl·lules en cultiu un cop infectades.

**PROCEDIMENT****—Inoculació de les mostres**

Treballar en una cabina de seguretat biològica.

- Descongelar les mostres a temperatura ambient.
- Eliminar el medi del flascó o placa a inocular i afegir el volum de mostra corresponent (Taula A-1.3) pel cantó oposat al del creixement cel·lular en el cas dels flascons i per la paret en el cas de les plaques.
- Incubar durant 90 minuts agitant suaument a intervals de 30 minuts per afavorir l'adsorció dels virus a les cèl·lules.
- Passat el període d'incubació, eliminar l'inòcul si cal, i afegir el volum corresponent de medi de manteniment (Taula A-1.3) adient per cada línia cel·lular.
- Incubar com pertoqui en cada cas i realitzar observacions al microscopi invertit a partir de les 24 hores seguint l'evolució del cultiu cada 24 hores fins un màxim de 12 dies.
- La presència viral es determina per l'aparició d'un efecte citopàtic i la destrucció progressiva de la monocapa cel·lular. Les molècules citotòxiques i/o la presència de microorganismes contaminants poden produir el mateix fenomen, per això, en els casos en que la monocapa s'hagi vist alterada es confirma la presència de virus a través de reinfecció i posterior quantificació en medi sòlid cas que la confirmació sigui positiva.

**Taula A-I.3.** Relació entre el volum de mostra a inocular per a la detecció de virus i la superfície de creixement cel·lular disponible.

Superfície a infectar	Volum de mostra	Volum de medi de manteniment post-infecció
<b>Flascó<sup>a</sup> de 175 cm<sup>2</sup></b>	5 a 10 mL	88 mL
<b>Flascó de 80 cm<sup>2</sup></b>	2 a 5 mL	30 mL
<b>Flascó de 25 cm<sup>2</sup></b>	0,5 a 1 mL	10 mL
<b>Placa<sup>b</sup> de 100 mm x 20 mm</b>	1 a 2 mL	20 mL
<b>Placa de 60 mm x 10 mm</b>	250 a 500 µL	8 mL
<b>Multiplaca de 6 pous</b>	100 a 400 µL	3,2 mL
<b>Multiplaca de 24 pous</b>	30 a 40 µL	0,8 mL
<b>Microplaca de 96 pous</b>	5 a 20 µL	150 µL

<sup>a</sup>Els flascons s'incuben totalment tancats a  $(36 \pm 2)$  °C.

<sup>b</sup>Les plaques s'incuben a  $(36 \pm 2)$  °C, 5% CO<sub>2</sub> i més del 80% d'humitat relativa.

#### — Confirmació de la positivitat de la mostra

- Procedir amb l'extracció viral mitjançant 3 cicles de congelació  $(-70 \pm 10)$  °C i descongelació (temperatura ambient) de la suspensió cel·lular resultat de l'alteració de la monocapa cel·lular.
- Centrifugar 10 minuts a 2000 ×g per eliminar les restes cel·lulars.
- Filtrar el sobrenedant (sn1) per filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus de baixa adsorció proteica (PVDF o PES).
- Repetir el procés d'inoculació sobre un cultiu cel·lular a partir d'aquest sobrenedant.
- Incubar durant 12 dies a  $(36 \pm 2)$  °C com s'ha descrit anteriorment.
- Cas que torni a desenvolupar-se efecte citopàtic procedir mitjançant dues aproximacions:
  - i. confirmar de nou i fins a tres vegades la presència viral mitjançant reinfecció i/o
  - ii. diluir l'extracció viral (sn1) i inocular les dilucions seguint el procediment d'inoculació de mostres en medi sòlid. Si una o les dues determinen la presència de virus cultivables a la mostra inicial, cal fer una quantificació dels virus entèrics presents en aquesta.
- Si no es produeix efecte citopàtic durant el procés de confirmació, la mostra es considerarà negativa.

**—Estimació de la concentració de virus**

NMP nombre més probable d'unitats infeccioses (NMPUI).

Si la mostra s'inocula directament del concentrat o s'infecten diferents rèpliques d'un cultiu cel·lular amb una única dilució, es calcula el NMPUI a partir del nombre confirmat de cultius amb efecte citopàtic negatiu (q) pel total de cultius inoculats (n) seguint la fórmula:

$$NMP = -\ln(q/n)$$

Si s'ha inoculat amb més d'una dilució, el NMPUI es calcula utilitzant la fórmula desenvolupada per Thomas (1942):

$$NMP / mL = \frac{P}{\sqrt{NQ}}$$

on P és el nombre de cultius positius de totes les dilucions; N és el volum total de mostra inoculada per a totes les dilucions en mil·lilitres i Q és el volum de mostra en tots els cultius negatius en mil·lilitres.

Quan s'utilitza aquesta fórmula queden excloses del càlcul totes les dilucions que tenen només cultius positius.

En el nostre cas, s'utilitzà el programa de la U. S. *Environmental Protection Agency* per a la determinació del NMP (EPA, 1995).

**DETECCIÓ DE VIRUS ENTÈRICS PER CULTIU CEL·LULAR.  
INOCULACIÓ DE MOSTRES EN MEDI SÒLID. MÈTODE DE MONOCAPA**

**OBJECTIU**

Quantificació de virus cultivables mitjançant cultiu cel·lular, utilitzant diferents línies cel·lulars.

**PROCEDIMENT**

Treballar a la cabina de seguretat biològica.

- Descongelar les mostres a temperatura ambient.
- Decantar el medi de les plaques i afegir el volum d'inòcul corresponent (Taula A-I.3).
- Incubar les plaques durant 90 minuts a  $(36 \pm 2)$  °C, 5% CO<sub>2</sub> i més del 80% d'humitat relativa agitant-les suaument cada 30 minuts per tal d'afavorir l'adsorció dels virus a les cèl·lules.
- Passat el període d'adsorció, eliminar l'inòcul de les plaques i afegir el medi *overlay* de post-infecció (20 mL per placa) –MEM2x i agar 2x (Annex II)- temperat a 45°C. Deixar solidificar el medi a temperatura ambient i incubar les plaques en posició invertida.
- Passat el període estimat de formació de clapes (aquest dependrà del tipus de virus i/o mostra inoculada) eliminar el medi sòlid de les plaques emprant una espàtula i afegir aproximadament 5mL per placa de la solució de cristall violeta-formaldehid (Annex II).

- Passats 10 minuts, recuperar la solució de cristall violeta-formaldehid a la botella inicial i rentar-ne l'excés de les plaques amb aigua corrent. El colorant cristall violeta tenyeix les cèl·lules vives; així, les zones on s'hagi produït lisi cel·lular apareixeran transparents (clapes circulars) i, les zones on no hi hagi lisi cel·lular quedaran tenyides de color violeta.
- Realitzar el recompte de les clapes i expressar el resultat referit al volum o pes de mostra analitzat.

#### — **Control de qualitat**

Amb cada anàlisi s'ha d'incloure una placa de control inoculada amb una quantitat coneguda de virus.

### **“SUSPENDED CELL PLAQUE ASSAY”. ASSAIG DE CLAPES AMB CÈL·LULES EN SUSPENSÍO**

#### **OBJECTIU**

Determinar la presència de virus cultivables capaços de produir efecte citopàtic sobre un cultiu cel·lular emprant cèl·lules en suspensió.

El mètode es basa en inocular una suspensió de cèl·lules amb un concentrat viral o una mostra per tal de detectar la presència d'enterovirus. Es barreja amb agar fos i el medi *overlay* i es diposita la barreja en una placa de Petri per a cultiu cel·lular. Després de la incubació durant 2-5 dies es detecten àrees de cèl·lules mortes. Aquest efecte citopàtic és localitzat, per que hi ha l'agar que permet que els virus es dispersin només de cèl·lula a cèl·lula i, les clapes poden observar-se a contrallum per la presència d'un colorant vital al medi. Al morir, les cèl·lules alliberen el colorant vital i perden el color, quedant zones circulars que indiquen destrucció cel·lular. La progènie d'una partícula vírica es localitza en cada zona de lisi. Així es pot calcular la quantitat de virus presents a la mostra inicial.

#### **PROCEDIMENT**

##### — **Comptar les cèl·lules a la cambra de Fuchs-Rosenthal**

La concentració cel·lular necessària és de  $1 \cdot 10^7$  cels  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. I calen 2 mL d'aquesta suspensió per cada placa de Petri de 90 mm de diàmetre. La suspensió cel·lular es prepara a partir de cèl·lules BGM amb 3-6 dies de creixement.

##### — **Preparar els diferents reactius a emprar**

- Fondre l'agar 2% i mantenir-lo en un bany a  $(45 \pm 1)$  °C. Calen 5 mL per cada placa
- Preparar el medi *overlay* (Annex II) i repartir-lo en tubs estèrils (5 mL per tub) i temperar-lo a  $(45 \pm 1)$  °C en un bany amb termòstat.
- Descongelar les mostres.
- Marcar les plaques de Petri estèrils corresponents a cada mostra.

- Barrejar l'agar 2% amb el medi MEM 2x temperat i mantenir la barreja a  $(45 \pm 1)$  °C en un bany amb termòstat.
- Repartir la suspensió cel·lular en tubs estèrils en volums que continguin  $2 \cdot 10^7$  cels  $\text{mL}^{-1}$  ( $\pm 10\%$ ).
- Centrifugar aquests tubs a  $3000 \times g$  durant 5 min.
- Eliminar el sobrenedant amb una pipeta estèril deixant 2 mL de medi de creixement. Ressuspendre les cèl·lules per agitació en aquest volum restant, obtenint així la concentració final de  $1 \cdot 10^7$  cels  $\text{mL}^{-1}$  ( $\pm 10\%$ ).

#### —Inocular les mostres

- Afegir la suspensió viral a la suspensió cel·lular. El volum que cal afegir depèn del tipus de mostra a analitzar (Taula A-I.4).
- Agitar la barreja i mantenir-la en estàtic durant 30 minuts a  $(36 \pm 2)$  °C per permetre la unió dels virus a les cèl·lules.

**Taula A-I.4.** Volum de mostra a inocular per placa emprant el mètode d'assaig amb cèl·lules en suspensió dependent del tipus de mostra a analitzar.

Tipus de mostra	Volum a inocular
Concentrat d'aigua de mar	2 mL
Concentrat d'aigua de riu neta	2 mL
Concentrat d'aigua de riu bruta (prop d'efluent de depuradora)	1 mL
Aigua residual tractada	1 mL
Aigua residual bruta	1 mL
Control	1 mL

#### —Preparar les plaques

- Treballant amb llum dèbil per reduir la fotoinactivació dels virus pel roig neutre, afegir la barreja de cèl·lules i virus a la de medi i agar i agitar per inversió.
- Passar immediatament la barreja a una placa de Petri per a cultiu cel·lular estèril.
- Posar les plaques dins una bossa negra que no deixi passar la llum.
- Repetir els tres passos anteriors per cada placa.

#### —Control de qualitat

Amb cada anàlisi s'ha d'incloure una placa de control inoculada amb una quantitat coneguda de ufp.

**—Incubació de les plaques**

Un cop seques, les plaques s'incuben en posició invertida per evitar la condensació damunt l'agar, a les fosques, en un incubador amb 5% de CO<sub>2</sub>, (36 ± 2) °C i més del 80% d'humitat relativa.

**—Lectura de les plaques**

- Les plaques es llegeixen a partir del dia 2 post-infecció i es segueix fins al dia 4 i cal que la lectura es faci preferiblement, per la mateixa persona. Les plaques que són negatives el quart dia poden incubar-se 2 dies més.
- Marcar i comptar les zones aclarides.
- Càlcul del nombre de ufp inicial a partir del valor del recompte del nombre total de clapes després del dia 6.

**—Confirmació dels resultats**

- Separar un fragment d'agar on s'hagi localitzat una zona de lisi.
- Passar el fragment a un flascó amb cèl·lules BGM i medi de manteniment.
- Si hi ha virus, causaran efecte citopàtic després de 5 dies d'incubació a (36 ± 2) °C.

---

**PREPARACIÓ DE SUSPENSIO CEL·LULAR PER SER EMPRADA EN ELS MÈTODES VIRADEN I DE DOBLE  
CAPA**

---

**OBJECTIU**

Obtenir una suspensió cel·lular amb una concentració final de 1,5·10<sup>7</sup> a 2·10<sup>7</sup> cèl·lules per mL necessària per a l'aplicació dels mètodes Viraden i de doble capa.

**PROCEDIMENT**

- A partir de flascons de 175 cm<sup>2</sup> de superfície de la línia cel·lular determinada de la que calgui preparar la suspensió, on les cèl·lules es trobin formant monocapes confluents, procedir amb el procediment per al subcultiu de la línia. Per a les línies BGM i PLC/PRF/5 s'aplica un passí 1:3 i per a la línia CaCo-2 s'aplica un passí 1:2.
- Un cop afegida la solució de tripsina-EDTA i quan les cèl·lules comencen a desprendre's, afegir de 13 a 14 mL de medi quan calgui passí 1:3 i de 18 a 19 mL de medi quan calgui passí 1:2 de la línia, i ressuspendre les cèl·lules en aquests volums. El medi utilitzat per a la preparació d'aquest tipus de suspensió cel·lular és MEM + 3% SFB + MgCl<sub>2</sub> + penicil·lina-estreptomicina + gentamicina + nistatina + ceftazidime (Annex II).
- Recuperar 10 mL de la suspensió cel·lular en tubs estèrils de 10 mL de capacitat quedant d'aquesta manera, en el cas del passí 1:3, 5 mL per flascó i en el cas del passí 1:2, 10 mL per

flascó. Al volum de suspensió restant en el flascó, afegir 80-90 mL del medi de creixement indicat en cada cas depenent de la línia, tancar i incubar.

- Centrifugar els tubs de 10 mL que contenen la suspensió cel·lular a 2000xg durant 10 minuts per tal de recuperar les cèl·lules.
- Descartar el sobrenedant i ressuspendre el sediment amb 1 mL del medi emprat per preparar la suspensió cel·lular. Pot utilitzar-se 1 mL del mateix sobrenedant.

La suspensió així preparada ha d'utilitzar-se dins un període màxim d'una hora. La gran densitat cel·lular acidifica ràpidament el medi, alterant-ne les condicions i fent que la suspensió no sigui estable durant períodes més llargs de temps.

Si es vol mantenir durant més temps la suspensió cel·lular, pot procedir-se a refrigerar-la després de la centrifugació i abans de ressuspendre el sediment. D'aquesta manera poden mantenir-se les cèl·lules durant diversos dies sense que hi hagi canvis en l'eficiència de recuperació d'enterovirus tal com es descriu a l'Annex Capítol 4.



## PROCEDIMENTS EMPRATS PER A L'OBTENCIÓ DE CONCENTRATS VIRALS A PARTIR DE MOSTRES AMBIENTALS

### ELUCIÓ DE FILTRES ELECTROPOSITIUS

#### OBJECTIU

Eluir els virus retinguts en els filtres electropositius emprats per concentrar virus en suspensió a l'aigua de riu i aigua de la xarxa de distribució.

#### PROCEDIMENT

- Inmediatament a la rebuda del filtre electropositiu (MicroKlean MK 100 de 9<sup>3/4</sup>", Cuno Inc., Meriden, USA), que prové de les concentracions realitzades per empreses potabilitzadores i distribuïdores d'aigua (AGBAR, ATLL) es procedeix amb l'elució. Cas que no sigui possible, poden afegir-se 100 mL de TSB estèril al mateix contenidor d'arribada i mantenir el filtre en aquestes condicions a (5 ± 3) °C. Els virus adsorbits als filtres es mantenen un màxim de 48 hores a (5 ± 3) °C des del moment de la concentració.
- Passar el filtre electropositiu a un portafiltres prèviament descontaminat (1N1-FC, Cuno Inc., Meriden, USA) abocant-hi també el TSB i subjectar-ho amb un suport.
- Connectar dos tubs de silicona estèrils, un a l'entrada i un a la sortida del portafiltres. S'introdueixen els dos tubs dins la botella que conté 900 mL de tampó d'elució (tampó glicina 25 mM, pH 10,5, Annex II) i s'inicia la circulació d'aquest en sentit contrari a l'emprat en el procés de concentració dels virus, a través del filtre electropositiu amb l'ajuda d'una bomba peristàltica (XX8 200 230 – XX80 EL0 05, Millipore Corp).
- Mantenir el tampó d'elució en circulació durant 30 minuts. Aturar la bomba peristàltica i buidar tot el tampó contingut al portafiltres dins la botella del tampó d'elució.
- Es pot procedir immediatament amb la floculació orgànica o mantenir l'eluit a (5 ± 3) °C un màxim de 24 hores ajustant el pH d'aquest a 7,0 – 7,2 amb HCl 1 M.
- Descontaminar el portafiltres amb hipoclorit sòdic 0,1% i posteriorment neutralitzar el clor residual per contacte amb una solució de tiosulfat sòdic 0,05% (Annex II) durant 30 minuts.
- Cal esterilitzar el filtre electropositiu prèvia la seva eliminació.

---

## CONCENTRACIÓ DE VIRUS PER FLOCULACIÓ ORGÀNICA

---

### OBJECTIU

Concentrar virus que puguin trobar-se presents en mostres d'aigua basant-se en la capacitat que tenen les proteïnes en solució d'agregar-se a pH àcids, per sota del seu punt isoelèctric, de manera que els virus que hi hagi a la mostra quedin atrapats en aquests agregats proteics que es formaran.

Mètode desenvolupat per a la concentració de virus que es troben en suspensions aquoses. Es poden concentrar des de petits volums (menys d'un litre) fins a varis litres. Normalment, cas que es vulguin analitzar volums de mostra molt grans (centenars o milers de litres d'aigua), es realitzarà una concentració prèvia per filtració (filtres electropositius) i el resultat de l'elució d'aquests serà el que es concentrarà per aquesta metodologia.

### PROCEDIMENT

- Afegir extracte de carn (BBL Beef extract Powder, 212303, Becton Dickinson) fins tenir concentració final del 3%.
- Ajustar el pH a 3,5-4,0 amb HCl 1M i mantenir en agitació suau a 60 rpm durant 30 minuts.
- Repartir el volum en tubs de centrífuga de 500 mL de capacitat i compensar-ne el pes. Centrifugar 20 minuts 10000  $\times$ g a la centrífuga J2-21 (Beckman Coulter Inc.).
- Decantar el sobrenedant i ressuspendre el floculat en 50 mL de PBS si són mostres de riu i/o aigües no tractades o en 25 mL de PBS si són mostres d' aigües tractades (potabilitzades).
- Ajustar el pH a 7,0-7,2 amb NaOH 1M i procedir a la descontaminació de la mostra.

---

## DESCONTAMINACIÓ QUÍMICA DE CONCENTRATS VIRALS

---

### OBJECTIU

Eliminar la microbiota present en una mostra (bacteris, fongs, llevats) sense afectar els virus d'interès, per tal que pugui ser inoculada posteriorment sobre un cultiu cel·lular per mesurar la seva citopaticitat i/o titular-ne el nombre de virus presents.

### PROCEDIMENT

- Afegir 3:7 (v:v) de cloroform (1.02445.1000, Merck & Co., Inc.) a la mostra a descontaminar.
- Mantenir en agitació a 900 rpm durant 30 minuts o fins que quedi una solució homogènia en un agitador de tubs (Mod. 4822, Pall Gelman Laboratory).
- Deixar decantar a  $(5 \pm 3)$  °C durant 16 a 18 hores o centrifugar durant 30 minuts a 2000  $\times$ g mantenint la temperatura a  $(5 \pm 3)$  °C.

- Quan s'observin clarament tres fases ben separades, recuperar la fase superior en un contenidor estèril. Les restes de cloroform i el contenidor inicial s'hauran de gestionar com a residus tòxics seguint els protocols d'eliminació de residus elaborats a tal efecte.
- Si no quedessin tres fases ben separades o s'arrossegessin restes de cloroform en la recuperació de la fase superior, centrifugar el volum recuperat a 2000 xg durant 30 minuts addicionals i repetir el pas anterior.
- Afegir 20 µL d'antiescumant (ref. MAZU DF 7960 B. Braun) a la mostra i airejar-la a la cabina de seguretat biològica usant una bomba d'aireació, filtrant l'aire a través d'un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus i 47mm de diàmetre (404112, Schleicher & Schuell) situat dins un portafiltres Swinnex® de 47mm (SX00 047 00, Millipore). El material emprat en l'aireació de les mostres ha d'haver estat preparat i esterilitzat prèviament.
- Connectar la bomba i mantenir l'aireació durant 10-15 minuts ajustant el flux d'aire per tal que no es produeixin aerosols.
- Un cop airejada, assegurant-nos d'haver eliminat qualsevol residu de cloroform, afegir 1,5 mL de solució d'antibiòtics (Penicil·lina 10000 U/mL, Estreptomicina 10000 µg/mL) per cada 50 mL de mostra i deixar-la a  $(36 \pm 2)$  °C durant 3 hores.
- Passat aquest període d'incubació es mantindrà la mostra a  $(-70 \pm 10)$  °C fins al moment de realitzar la titulació.

## **ADSORCIÓ-ELUCIÓ A POLS DE VIDRE**

---

### **OBJECTIU**

Concentració d'enterovirus presents en una matriu aquosa per adsorció-elució a pols de vidre.

El pols de vidre pirex borosilicatat (granulometria compresa entre 100 i 200 µm) presenta càrrega neta negativa i representa un excel·lent adsorbent per als enterovirus a un pH inferior al seu pHi.

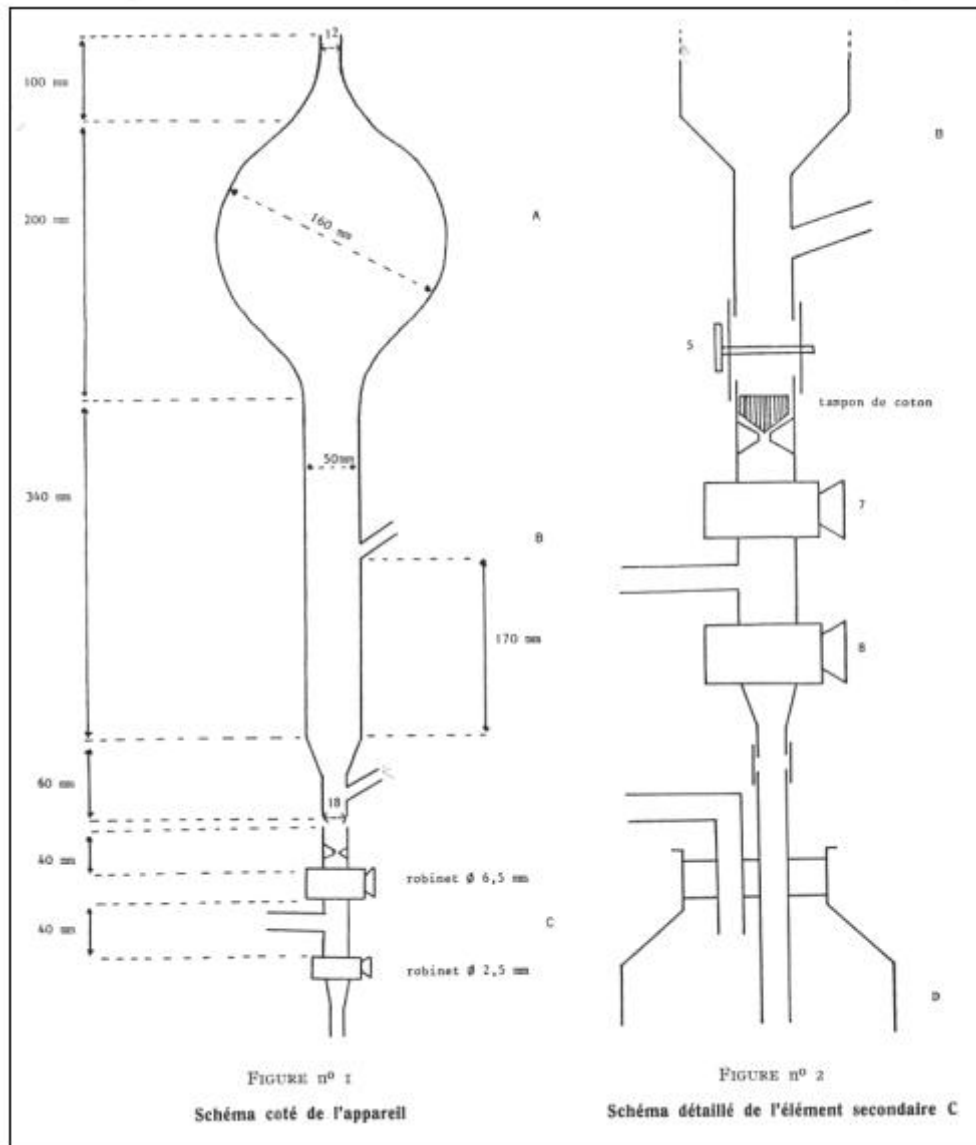
### **PROCEDIMENT**

La concentració es realitza per filtració ascensional de la mostra d'aigua a analitzar prèviament acidificada, a través d'una massa de pols de vidre en un llit fluid. Els enterovirus adsorbits s'elueixen seguidament amb un tampó alcalí.

El component necessari per a la concentració mitjançant adsorció a pols de vidre és un dispositiu descrit per Schwartzbrod i Lucena-Gutiérrez (1978) format per una columna de vidre pirex (50 mm x 340 mm) prolongat en la seva part superior per una cambra d'expansió esfèrica (160 mm de diàmetre) que acaba en un tub d'evacuació. La part basal inclou dos tubs laterals i l'extrem inferior es troba unit a un segon element mitjançant un tub de silicona. Aquest segon

element fou modificat per Ribas (1991) i en el nostre cas es substituï en la part final per una xeringa de plàstic que permetia l'extracció de l'eluent mitjançant succió.

- Introduir 150 g de pols de vidre (Poudre 62, 658909, Corning S. A.) pel tub superior de la cambra d'expansió amb l'ajuda d'un embut.
- Esterilitzar l'aparell complet a 121°C durant 20 minuts.
- Condicionar la mostra a pH 3,5 afegint HCl 1 M a la mostra en constant agitació.
- Preparar el dispositiu de filtració:
  - Connectar el tub superior de la cambra d'expansió a una trompa de buit que aboqui a la pica. Mantenir tancada l'aixeta superior de la peça inferior.
  - Connectar l'aparell a la mostra a través del tub inferior de la columna mitjançant una mànega submergida al recipient on es troba la solució a concentrar. La mànega disposa d'una pinça d'Hoffman abans d'entrar a la columna que es manté tancada.
- Posar en marxa la bomba de buit. Obrir l'aixeta d'entrada de la mostra a l'aparell. Observar com es forma un llit fluid (filtre dinàmic de pols de vidre) al llarg de tota la columna.
- Regular el flux de mostra de manera que el llit no superi el terç inferior de la cambra d'expansió, 60-80 L·h<sup>-1</sup>.
- Quan ha passat tot el volum de mostra a través del dispositiu, tancar l'entrada de mostra i desconnectar el buit de la part superior de la cambra d'expansió.
- Permetre que el pols de vidre sedimenti per gravetat i buidar l'aigua de la cambra d'expansió i de mitja columna a través del tub lateral.
- Seguir buidant l'aigua fins que quedi 1-2 cm per sobre del nivell del filtre, ara estàtic i compacte de fibra de vidre, aplicant el buit a través del tub lateral de la peça inferior, obrint l'aixeta superior i mantenint tancada l'aixeta inferior.
- Procedir amb l'elució afegint 150 mL d'eluent (tampó glicina 0,05 M, pH 10,5 amb roig fenol) per la part superior de la columna. Observar com avança el front de l'eluent a través del filtre i abans que arribi a l'aixeta superior de la peça inferior, tancar la vàlvula evitant pèrdues d'eluent.
- Parar el buit i amb una xeringa estèril extreure l'eluent i passar-lo a un contenidor estèril. Els virus es troben principalment en els primers 30 a 40 mL i aquest és el volum que es recull.
- Ajustar el pH a 7 amb HCl 1 N. El control del pH es pot seguir per canvi de color de l'indicador de pH roig fenol.
- Descontaminar el concentrat per filtració a través de filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus de baixa adsorció proteica.



**Figura A-I.1.** Esquema del dispositiu emprat per a la concentració de virus per pols de vidre.  
Adaptat de Schwartzbrod i Lucena-Gutiérrez (1978).

## **OBTENCIÓ DE CULTIUS DE VIRUS DE TÍTOL ALT A PARTIR DE CLAPES**

### **AÏLLAMENT DE VIRUS PROCEDENTS DE ZONES DE LISI CEL·LULAR**

#### **OBJECTIU**

Recuperar partícules víriques infeccioses procedents de zones de lisi cel·lular localitzades, obtingudes mitjançant els diferents mètodes d'obtenció de clapes en medi sòlid damunt les diferents línies cel·lulars.

#### **PROCEDIMENT**

- Retirar l'agar i/o el filtre de la placa i localitzar les zones de lisi damunt la superfície de plàstic de la placa de cultiu cel·lular.
- Dispensar 100 µL de PBS o MgCl<sub>2</sub> 0,05 M en tubs d'1,5 mL de capacitat estèrils.
- Recuperar el material de les zones de lisi amb l'ajuda d'una punta de pipeta o d'un escuradents estèrils.
- Ressuspendre en el PBS o el MgCl<sub>2</sub> 0,05 M.
- Si no es pot procedir immediatament amb la reinfecció, es poden mantenir els aïllaments congelats a (-70 ± 10) °C fins el moment de la reinfecció.

### **REINFECCIÓ DELS AÏLLAMENTS VIRALS DAMUNT LA LÍNIA CEL·LULAR BGM**

#### **OBJECTIU**

Obtenir suspensions virals a partir dels aïllaments de clapes amb un títol superior de virus, per tal de procedir amb l'extracció de l'àcid nucleic corresponent i l'anàlisi de caracterització d'àcids nucleics.

#### **PROCEDIMENT**

Procedir seguint el protocol d'inoculació de mostres en medi líquid en multiplaques de 6 o 24 pous depenent del volum de suspensió viral que es vulgui obtenir.

Un cop detectada la presència d'efecte citopàtic procedir amb l'extracció viral per congelació-descongelació del cultiu com es descriu a l'apartat següent.

## EXTRACCIÓ DE PARTÍCULES VÍRIQUES D'UN CULTIU INFECTAT

---

### OBJECTIU

Recuperar les partícules víriques alliberades al medi de cultiu a partir de les cèl·lules infectades i recuperar les partícules víriques que poden quedar encara dins les cèl·lules o associades a components cel·lulars.

### PROCEDIMENT

- Procedir amb l'extracció viral mitjançant 3 cicles de congelació ( $-70 \pm 10$ ) °C i descongelació (temperatura ambient) de la suspensió cel·lular que resulta de l'alteració de la monocapa cel·lular per la presència del virus. Aquest fet provoca trencament cel·lular i alliberament dels virus que encara poguessin quedar retinguts o associats a components cel·lulars.
- Centrifugar la suspensió obtinguda a 2000  $\times g$  durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars.
- Si es vol obtenir encara més puresa de la suspensió viral, es pot procedir filtrant el sobrenedant obtingut per filtres de baixa adsorció proteica (PVDF o PES) de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus.

## CONCENTRACIÓ DE PARTÍCULES VÍRIQUES PER ULTRAFILTRACIÓ

---

### OBJECTIU

Augmentar la concentració de virus en una suspensió.

### PROCEDIMENT

- Emprar filtres Ultrafree-4 Centrifugal filter Units Biomax (UFV4BHK25, Millipore Corp., Bedford, MA). Són unitats de filtració amb membrana Biomax-PB polietersulfona d'alt flux, indicada per a la concentració de partícules víriques i ideal per a mostres molt concentrades com lisats cel·lulars o barreges complexes de macromolècules.
- Disposar fins a un màxim de 4 mL de solució per filtre i procedir a la centrifugació d'aquests a 2000  $\times g$  fins que el volum final damunt el filtre sigui de 100 a 150  $\mu L$  aproximadament.
- Recuperar els virus retinguts damunt la superfície del filtre amb l'ajuda d'una pipeta.

**TÈCNiques EMPRADES EN BIOLOGIA MOLECULAR****EXTRACCIÓ D'ARN VIRAL I****OBJECTIU**

Obtenir l'àcid nucleic genòmic ARN de les partícules víriques infeccioses per tal de poder-ne fer l'anàlisi.

**PROCEDIMENT**

Procedir a l'extracció d'ARN amb el kit d'extracció QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) seguint les indicacions del fabricant per al protocol d'extracció d'ARN viral utilitzant una microcentrífuga.

- Pipetejar 560 µL de Buffer AVL que conté el Carrier RNA en un microtub de 1,5 mL estèril.
- Afegir 140 µL de la suspensió viral. Barrejar amb el vòrtex durant 15 segons.
- Incubar a temperatura ambient (15-25°C) durant 10 minuts.
- Centrifugar durant uns segons per eliminar les possibles gotes formades dins el tub.
- Afegir 560 µL d'etanol (96-100%) a la mostra i barrejar amb el vèrtex durant 15 segons. Centrifugar durant uns segons per eliminar les possibles gotes formades dins el tub.
- Amb compte, aplicar 630 µL de la solució en una columna QIAamp per a centrífuga (en un tub de recol·lecció de 2 mL) sense mullar el marge superior. Tancar i centrifugar a 6000 ×g durant 1 minut. Posar la columna en un tub de recol·lecció net i eliminar el tub que conté el filtrat.
- Obrir la columna QIAamp amb compte i repetir el pas anterior.
- Obrir la columna QIAamp amb compte i afegir 500 µL de Buffer AW1. Tancar i centrifugar a 6000 ×g durant 1 minut. Col·locar la columna en un tub de recol·lecció de 2 mL net i eliminar el tub que conté el filtrat.
- Obrir la columna QIAamp amb compte i afegir 500 µL de Buffer AW2. Tancar i centrifugar a 20000 ×g durant 3 minuts. Col·locar la columna en un tub de recol·lecció de 2 mL net i eliminar el tub que conté el filtrat. Centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut.
- Col·locar la columna en un microtub de 1,5 mL. Eliminar el tub que conté el filtrat. Obrir la columna QIAamp amb compte i afegir 60 µL de Buffer AVE temperat. Tancar i centrifugar a 6000 ×g durant 1 minut.
- L'ARN viral és estable durant més d'un any conservat a (-20 ± 5) °C o (-70 ± 10) °C.



---

**EXTRACCIÓ D'ARN VIRAL II**

---

**OBJECTIU**

Obtenir l'àcid nucleic ARN de les partícules víriques infeccioses per tal de poder-ne fer l'anàlisi.

**PROCEDIMENT**

Procedir a l'extracció d'ARN amb el kit d'extracció "EZ-RNA Total RNA Isolation Kit" (20-400-100, Biological Industries Co. Beit Haemek Ltd., Israel) seguint les indicacions del fabricant per al protocol d'aïllament d'ARN total a partir d'una suspensió cel·lular.

- Disposar 200 µL de suspensió cel·lular procedent d'un cultiu infectat on s'hagi observat l'aparició d'efecte citopàtic per presència viral i en el qual s'hagi realitzat l'extracció viral.
- Afegir 500 µL de Solució Desnaturalitzant i agitar suaument amb l'ajuda d'una pipeta.
- Mantenir durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 500 µL de Solució d'Extracció. Agitar vigorosament durant 15 segons.
- Incubar a temperatura ambient (15 a 25°C) durant 10 minuts.
- Centrifugar a 12.000 ×g, durant 15 minuts a (6 ± 2) °C.
- Recuperar la fase superior i passar-la a un microtub net i estèril.
- Afegir 500 µL d'isopropanol i barrejar.
- Incubar a temperatura ambient (15 a 25°C) durant 10 minuts.
- Centrifugar a 12.000 ×g, durant 8 minuts a (6 ± 2) °C.
- Eliminar el sobrenedant.
- Afegir 1 mL d'etanol 75% i agitar vigorosament.
- Centrifugar a 7.500 ×g, durant 5 minuts a (6 ± 2) °C.

En aquestes condicions és estable durant 1 any conservat a (-20 ± 5) °C.

Al moment de realitzar l'amplificació de l'ARN viral per RT-PCR caldrà seguir com s'indica:

- Eliminar l'etanol i assecar a l'aire durant 5 minuts o fins que no es vegin restes d'etanol.
- Solubilitzar amb 50 µL d'aigua bidestil·lada estèril agitant i incubant la barreja a 55°C durant 10-15 minuts.
- Un cop realitzada l'amplificació per RT-PCR mantenir la resta de solució a (-20 ± 5)°C.

---

**RT-PCR PER ENTEROVIRUS EN UN SOL PAS**


---

**OBJECTIU**

Aconseguir l'amplificació d'un fragment del genoma viral a testar.

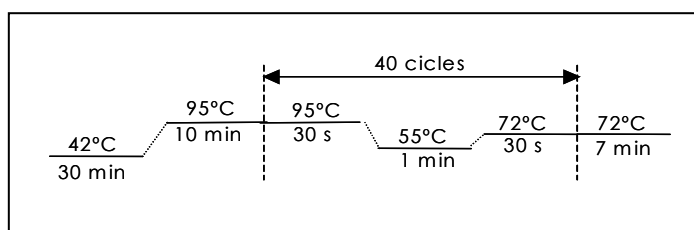
**PROCEDIMENT**

- Descongelar els reactius, agitar suaument i mantenir en gel.
- Preparar les barreges de reacció necessàries en una àrea neta emprant puntes de pipeta i microtubs estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. Calcular el volum de reacció de la barreja de RT-PCR per a n+0,5 mostres.

Reactiu	Volum <sup>a</sup>	Concentració final <sup>b</sup>
Tampó I de PCR 10x	5 µl	10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (25 mM cadascun)	0,4 µl	1 mM
Cebador dret (25 µM)	1 µl	0,5 µM
Cebador esquerre (25 µM)	1 µl	0,5 µM
DTT (0,02 M)	0,5 µl	0,2 mM
Inhibidor RNases (20 U/µl)	1 µl	20 U
Transcriptasa Reversa (50 U/µl)	0,1 µl	5 U
AmpliTaqa ADN Polimerasa (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
Aigua bidestil·lada estèril	30,5 µl	
Volum final	40 µl	

- Agitar suaument i disposar alíquotes de 40 µl de la barreja en tubs de 0,2 mL estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. Afegir a cada tub 10 µl de la mostra corresponent. Cal afegir un control negatiu (mostra sense ARN) i un control positiu.
- Barrejar suaument i centrifugar durant uns segons.

- Procedir a l'amplificació de les cadenes d'ADN mitjançant el programa:



### RT-PCR PER ENTEROVIRUS

#### OBJECTIU

Aconseguir l'amplificació d'un fragment del genoma viral a testar.

#### PROCEDIMENT

- Descongelar els reactius, agitar suaument i mantenir en gel.
- Preparar les barreges de reacció necessàries en una àrea neta emprant puntes de pipeta i microtubs estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. El volum de reacció de les barreges RT1 i RT2 es calcula per a n+1 mostres; i el volum de reacció de la barreja de PCR per a n+0,5 mostres.

#### RT1

Reactiu	Volum <sup>a</sup>	Concentració final <sup>b</sup>
dNTPs (25 mM cadascun)	0,4 µl	1 mM
Cebador dret (25 µM)	1 µl	2,5 µM
Tampó I de PCR 10x	1 µl	10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Aigua bidestil·lada estèril	0,6 µl	
Volum final	3 µl	

<sup>a</sup>Volum necessari per a l'anàlisi d'una mostra

<sup>b</sup>Concentració a la barreja RT1+mostra+RT2 (10 µl)

- Agitar suaument i disposar alíquotes de 3 µl de la barreja en tubs de 0,2 mL estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. Afegir a cada tub 5 µl de la mostra corresponent. Cal afegir un control negatiu (mostra sense ARN) i un control positiu.
- Barrejar suaument i centrifugar durant uns segons.
- Desnaturalitzar l'ARN escalfant a 95°C durant 5 minuts en un termociclador. Passat aquest temps, posar immediatament en gel per tal d'evitar la re-naturalització.

- Preparar la barreja de reacció RT2.

**RT2**

Reactiu	Volum <sup>a</sup>	Concentració final <sup>b</sup>
DTT (0,02 M)	0,5 µl	1 mM
Inhibidor RNAses (20 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
Transcriptasa Reversa (50 U/µl)	1 µl	5 U/µl
Volum final	2 µl	

<sup>a</sup>Volum necessari per a l'anàlisi d'una mostra

<sup>b</sup>Concentració a la barreja RT1+mostra+RT2 (10 µl)

- Agitar suaument i afegir 2 µl a cadascun dels tubs que provenen de la desnaturalització. Procedir a la síntesi de les cadenes de cADN incubant a 42°C durant 30 minuts i a 95°C durant 5 minuts en un termociclador. Un cop finalitzada, mantenir els tubs en gel.
- Preparar la barreja de reacció per a la PCR.

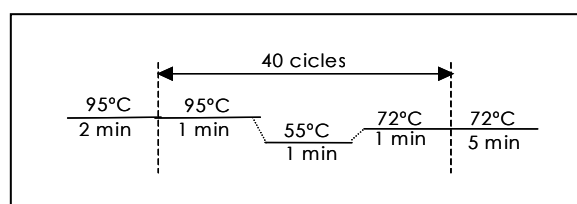
**PCR 1**

Reactiu	Volum <sup>a</sup>	Concentració final <sup>b</sup>
Tampó I de PCR 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	4 µl	10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Cebador esquerre (25 µM)	1 µl	0,5 µM
AmpliTaq ADN Polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	2 U
Aigua bidestil·lada estèril	34,6 µl	
Volum final	40 µl	

<sup>a</sup>Volum necessari per a l'anàlisi d'una mostra

<sup>b</sup>Concentració a la barreja final (50 µl)

Afegir 40 µl de la barreja de PCR a cadascun dels tubs i procedir a l'amplificació de les cadenes d'ADN mitjançant el programa:



## PCR IMBRICADA

### OBJECTIU

Aconseguir una major quantitat del fragment del genoma viral a testar emprant cebadors situats dins el fragment obtingut amb el primer cicle d'amplificació.

### PROCEDIMENT

- Descongelar els reactius, agitar suaument i mantenir en gel.
- Preparar les barreges de reacció necessàries en una àrea neta emprant puntes de pipeta i microtubs estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. El volum de reacció de la barreja de PCR es calcula per a n+0,5 mostres.

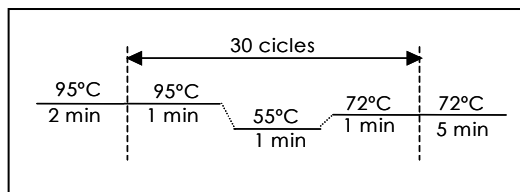
#### PCR 2

Reactiu	Volum <sup>a</sup>	Concentració final
Tampó I de PCR 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (25 mM/cadascun)	0,5 µl	250 µM
Cebador intern esquerre (25 µM)	1 µl	0,5 µM
Cebador intern dret (25 µM)	1 µl	0,5 µM
AmpliTaq ADN Polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	2 U
Aigua bidestil·lada estèril	41,1 µl	
Volum final	49 µl	

<sup>a</sup>Volum necessari per a l'anàlisi d'una mostra

- Barrejar tots els reactius i mantenir la barreja en gel.
- Disposar alíquotes de 49 µl de la barreja en tubs de 0,2 mL estèrils lliures de ARNasa-ADNasa. Afegir a cada tub 1 µl de l'ADN amplificat per PCR amb els cebadors externs corresponent. Al control negatiu (mostra sense RNA) cal afegir els controls positiu i negatiu procedents de l'amplificació amb els cebadors externs.

- Barrejar suaument, centrifugar durant uns segons i procedir a l'amplificació de les cadenes d'ADN mitjançant el programa:



## DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

### OBJECTIU

Obtenir fragments d'ADN a partir d'un amplificat obtingut per RT-PCR emprant enzims de restricció amb dianes específiques per tal de poder definir patrons de polimorfisme de fragments de restricció (RFLP).

### PROCEDIMENT

- A partir de l'ADN amplificat per RT-PCR a partir de l'ARN extret dels diferents enterovirus, preparar les reaccions de restricció.

En un microtub estèril, barrejar en aquest ordre:

Aigua bidestil·lada estèril	7,5 µl
Tampó 10x de l'enzim de restricció	2 µl
ADN amplificat	10 µl

Barrejar suaument amb l'ajuda d'una pipeta i afegir:

Enzim de restricció (10 u/µl)	0,5 µl
-------------------------------	--------

- Les reaccions de restricció es poden preparar independents o bé preparar una sola barreja per a cadascun dels enzims afegint el volum d'aigua bidestil·lada, tampó i enzim de restricció i barrejant 10 µL de l'ADN amplificat amb 10 µL de la barreja de restricció.

- Barrejar suaument amb la pipeta, tancar el tub i centrifugar durant uns segons a la microcentrífuga. Incubar a 37°C durant 3-4 hores.

Passat el període d'incubació amb els corresponents enzims, parar la reacció afegint 4-5 µl del tampó de càrrega i procedir a l'anàlisi dels fragments de restricció en gel d'agarosa al 3% emprant com a marcador de pes molecular el de fragments que difereixen en 50 parells de bases (amb bandes de 50 a 500 pb) 50 Base-Pair Ladder (27-4005-01, Amersham Biosciences).

---

## PURIFICACIÓ DE PRODUCTES DE PCR

---

### OBJECTIU

Purificar fragments d'ADN de cadena simple o de cadena doble a partir de reaccions de PCR i altres reaccions enzimàtiques. Es separen fragments que van des dels 100 pb fins a les 10 kb dels cebadors, els nucleòtids, les polimerases i les sals.

### PROCEDIMENT

Es procedeix utilitzant el kit per a purificació de productes de PCR QIAquick® PCR Purification Kit (28104, QIAGEN) seguint les instruccions del fabricant. Breument;

- Afegir 5 volums de tampó PB a 1 volum de mostra de PCR i barrejar.
- Situar la columna QIAquick en un tub de recollida de 2 mL.
- Per tal que s'uneixi l'ADN a la membrana, centrifugar les mostres en una microcentrífuga durant 30-60 segons.
- Eliminar el filtrat i disposar de nou la columna en el mateix tub col·lector.
- Rentar afegint 750 µL de tampó PE a la columna i centrifugant durant 30-60 segons.
- Eliminar el filtrat i disposar de nou la columna en el mateix tub. Centrifugar la columna durant 1 minut addicional a velocitat màxima (14.000 rpm aprox.).
- Situar la columna en un microtub estèril de 1,5 mL.
- Eluir l'ADN afegint 50 µL d'aigua bidestil·lada estèril al centre de la membrana centrifugant durant 1 minut. Es planteja l'opció d'incrementar la concentració d'ADN afegint només 30 µL d'aigua. Alternativament a la utilització d'aigua bidestil·lada, l'ADN pot eluir-se amb tampó EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) però això podria afectar a la reacció de seqüenciació.

---

## REACCIÓ DE SEQÜENCIACIÓ

---

### OBJECTIU

Obtenir la seqüència nucleotídica d'un fragment d'ADN. En el nostre cas es tracta d'ADN amplificat per reaccions de RT-PCR a partir de l'ARN viral.

### PROCEDIMENT

- S'utilitza el kit de seqüenciació d'ADN BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 2.0 (Abiprism, Perkin-Elmer Biosystems). Per tal d'aplicar el protocol de seqüenciació l'ADN mostra ha d'ésser

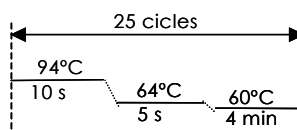
prèviament purificat. En el nostre cas s'emprà un kit de purificació d'ADN i es procedí com es descriu anteriorment.

- Cal preparar una barreja de seqüenciació independent per a cada cebador a utilitzar. Si es vol seqüenciar un mateix fragment de doble cadena d'ADN s'utilitzen els cebadors dret i esquerre i cal preparar dues barreges de seqüenciació per mostra.
- El càlcul de la temperatura d'unió dels cebadors es realitza seguint el model: per cada A o T es sumen 2°C i per cada C o G es sumen 4°C.
- Així doncs, preparar la barreja de reacció de seqüenciació en tubs de 0,2 mL estèrils barrejant en aquest ordre:

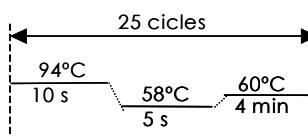
Barreja kit BigDye	4 µL
ADN purificat	1 µL
Cebador	1,8 µL
Aigua bidestil·lada estèril	3,2 µL

- Aplicar els programes de seqüenciació per a cada cebador en un termociclador.

Cebador dret (EP1)



Cebador esquerre (EP4)



- Acabats els cicles procedir amb la precipitació amb etanol.

## PRECIPITACIÓ AMB ETANOL DE PRODUCTES DE SEQÜENCIACIÓ

### OBJECTIU

Recuperar l'àcid nucleic a partir d'una solució.

### PROCEDIMENT

- Dur el volum de reacció de 10 µL a un volum total de 20 µL amb aigua bidestil·lada estèril.
- Afegir 17,5 µL d'aigua bidestil·lada estèril.
- Afegir 62,5 µL d'etanol 96% *ultrapure* temperat a temperatura ambient.



- Mantenir durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar durant 20 minuts a 14000 rpm a temperatura ambient.
- Aspirar l'etanol
- Afegir 200 µL d'etanol 70% temperat a temperatura ambient.
- Centrifugar durant 10 minuts a 14000 rpm a temperatura ambient.
- Repetir el rentat amb etanol 70% dues vegades més.
- Aspirar l'etanol.
- Assecar durant 10 minuts a l'Speed Vaccum.

Un cop sec l'ADN es procedeix a l'anàlisi de la seqüència immediatament al Servei de seqüenciació (Serveis Científico-Tècnics, Parc Científic, Universitat de Barcelona).

La seqüència obtinguda es visualitza amb el programa Chromas. L'anàlisi i cerca d'homologia es realitza amb les seqüències dipositades al banc de dades de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

---

## ANÀLISI DE L'ADN. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

---

### OBJECTIU

Permetre la visualització dels fragments d'ADN per tal de poder-ne fer l'anàlisi corresponent en els diferents estudis. Metodologia basada en Sambrook et al (1989).

### PROCEDIMENT

- Preparar el gel dissolent la quantitat d'agarosa (Agarosa grau biologia molecular, GK-AME-250, Genotek) necessària en TBE 1x (Annex II).
- Escalfar la barreja amb l'ajuda d'un microones fins al grau d'ebullició agitant de tant en tant per tal que quedi una suspensió homogènia.
- Deixar refredar a temperatura ambient fins a 50-55°C aproximadament i disposar la solució en una safata de metacrilat on s'afegirà una pinta per tal que es produeixi la formació dels pous de càrrega.
- Un cop solidificat el gel dipositar la safata dins una cubeta d'electroforesi amb tampó TBE 1x de manera que el tampó cobreixi completament el gel.
- Procedir amb la càrrega de les mostres;
  - o Barrejar el volum de solució d'ADN a analitzar amb el tampó de càrrega (Annex II) i dipositar la barreja resultant amb l'ajuda d'una micropipeta a l'interior dels pous.
  - o Reservar un dels pous per carregar un marcador de pesos moleculars. Cal diluir la quantitat de marcador necessària especificada pel fabricant en aigua bidestil·lada

estèril abans de barrejar-lo amb el tampó de càrrega i dipositar-lo dins el pou del gel d'agarosa.

- Iniciar l'electroforesi aplicant el voltatge i temps necessaris a la cubeta d'electroforesi on es te el gel d'agarosa. El gel ha de quedar totalment cobert pel tampó TBE 1x.
- Un cop finalitzada l'electroforesi submergir el gel en una solució de bromur d'etidi 0,002 µg·mL<sup>-1</sup> (Annex II) durant 15-20 minuts.
- Recuperar el gel i fer-ne l'observació en un transil·luminador de llum ultravioleta per tal de visualitzar les bandes corresponents a l'ADN.

La concentració d'agarosa, el tipus de marcador de pes molecular i el voltatge i temps aplicats depenen de la mida de l'ADN que es vol analitzar (Taula A-I.5).

**Taula A-I.5.** Anàlisi de fragments d'ADN mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

ADN A ANALITZAR	Concentració d'agarosa	Marcador de pes molecular	Voltatge	Temps
<b>Amplificats per RT-PCR i PCR imbricada</b>	2%	100 pb ADN ladder	130 V	70 min
<b>Fragments de Restricció</b>	3%	50 pb ADN ladder	120 V	90 min

## HIBRIDACIÓ AMB SONDA MARCADA AMB DIGOXIGENINA

### OBJECTIU

Detectar l'àcid nucleic viral (ARN) sobre membranes d'èsters de cel·lulosa o de niló mitjançant la utilització d'un oligonucleòtid marcat amb digoxigenina. A continuació es descriu el procediment utilitzat inicialment el qual fou modificat durant la realització del treball quedant finalment, com es descriu al Capítol 1 de la memòria.

**PROCEDIMENT**

- Preparar el tampó d'hibridació (14 mL de tampó per cada membrana a hibridar) just al moment d'utilitzar-lo.

**Tampó d'hibridació**

Reactiu	Volum	Concentració final
20x SSC	2,1 mL	6xSSC
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	140 µL	20 mM
SDS 10%	0,7 mL	1%
Esperma de Salmó (10 mg/mL)	70 µL	0,1 mg/mL
Reactiu de Denhart 100x	350 µL	5x
Aigua bidestil·lada estèril	3,64 mL	

- Prehibridar les membranes amb 7 mL del tampó d'hibridació per membrana, durant 1 hora a 55°C en un forn d'hibridació en agitació constant.
- Canviar el tampó de prehibridació per 7 mL de tampó d'hibridació fresc que conté la sonda marcada amb digoxigenina. Mantenir les membranes submergides en aquesta solució a 55°C durant 18 hores aproximadament en agitació.
- Passat el període d'hibridació descartar la solució d'hibridació amb la sonda i procedir amb els rentats.
- Submergir les membranes en tampó de rentat 6x SSC + 0,6% SDS (Annex II) i mantenir-les a temperatura ambient (15-25°C) en agitació constant durant 15 minuts.
- Submergir de nou les membranes en tampó de rentat i mantenir-les a 55°C en agitació durant 15 minuts.
- Seguir amb el procediment de detecció de la digoxigenina com es descriu a l'Annex I.

**DETECCIÓ QUIMIOLUMINISCENT DE LA MOLÈCULA DE DIGOXIGENINA. HIBRIDACIÓ D'ÀCIDS  
NUCLEICS**

**OBJECTIU**

Detectar les molècules de digoxigenina situades a l'extrem 5' d'un oligonucleòtid emprat com a sonda per a la detecció d'ARN viral.

**PROCEDIMENT**

Els passos descrits a continuació són els que segueixen als rentats de la hibridació per tal de detectar la molècula digoxigenina amb que va marcada la sonda i han de realitzar-se mantenint les membranes permanentment submergides i en agitació.

- Rentar les membranes en 10-20 mL per membrana de Tampó de Rentat (Annex II) durant 5 minuts.
- Incubar durant 30 minuts en 10-20 mL per membrana de Tampó 2 (Annex II) en plaques netes.
- Diluir l'anticòs anti-digoxigenina (Anti-digoxigenin AP Fab fragments, 1 093 274, Roche) 1:10000 en Tampó 2 (cal preparar 10 mL de solució per membrana). Cal centrifugar durant uns segons el vial de l'anticòs i prendre el volum necessari d'aquest de la part superior.
- Incubar les membranes durant 30 minuts (exactament) amb la solució d'anticòs.
- Eliminar l'anticòs no unit rentant dues vegades durant 15 minuts en 10-20 mL de Tampó de Rentat en plaques netes.
- Equilibrar la membrana durant 2-5 minuts en 10 mL de Tampó 3 (Annex II).
- Preparar el substrat CSPD (1 655 884, Roche) diluint-lo 1:100 en Tampó 3.
- Incubar les membranes de la següent manera; disposar una làmina plàstica i damunt d'aquesta les membranes amb la part on hi ha els àcids nucleics cap a munt. Disposar un volum d'1 mL de solució amb el substrat per cada membrana de 90 mm de diàmetre –i 0,5 mL quan es tracti de membranes de 47 mm de diàmetre- i tancar amb una nova làmina plàstica. Incubar a la foscor –tapant el conjunt amb paper d'alumini- durant 5 minuts.
- Traspasar les membranes a bosses de plàstic i segellar-les.
- Disposar les bosses dins de cassettes d'autoradiografia i incubar durant 10 minuts a 37°C.
- Exposar-hi un film d'autoradiografia i mantenir-ho així durant 2 hores.
- Procedir amb el revelat del film;
  - o submergir-lo durant 3 minuts en solució reveladora
  - o rentar 3 minuts submergint-lo en aigua
  - o submergir-lo durant 3 minuts en solució fixadora
  - o rentar amb aigua de l'aixeta i aigua destil·lada i deixar assecar.

---

## IMMUNODETECCIÓ

---

### OBJECTIU

Identificar diferents enterovirus emprant la tècnica d'immunodetecció amb anticossos monoclonals comercials.

### PROCEDIMENT

A partir dels filtres de membrana d'èsters de cel·lulosa que contenen les partícules víriques adsorbides les quals poden provenir, ja sigui d'una titulació pel mètode Viraden, o d'una adsorció directa, seguir com s'indica a continuació.

- Pretractament de les membranes. Pas adicional necessari si el filtre prové de titulació pel mètode Viraden.
  - Dipositar els filtres damunt de paper 3MM Chr (3030 917, Whatman) humitejat amb SDS 10% durant 5 minuts. La zona on es localitzen les partícules víriques ha de quedar cap amunt.
  - submergir-les en TBS-Tween 1x i mantenir-les en agitació a temperatura ambient durant 30 minuts per tal d'eliminar les restes cel·lulars.
- Bloqueig amb solució de TBS-Tween + 3% BSA durant 14-18 hores mantenint el filtre submergit en la solució a  $(5 \pm 3)$  °C en agitació constant suau.
- Conjugació amb l'anticòs primari. Les diferents dilucions de l'anticòs es realitzen en TBS-Tween 1x. Mantenir en agitació dins la solució durant 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient.
- Rentat amb TBS-Tween 1x durant 5 minuts. Repetir tres vegades el rentat canviant cada vegada el tampó per tampó nou.
- Conjugació amb dilució 1:10000 v:v en TBS-Tween 1x de l'anticòs secundari (anti-mouse IgG – whole molecule- conjugat amb fosfatasa alcalina, A-3688, Sigma). Mantenir en agitació dins la solució durant 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient.
- Rentat amb TBS-Tween 1x durant 5 minuts. Repetir tres vegades el rentat canviant cada vegada el tampó per tampó nou.
- Detecció de l'activitat fosfatasa alcalina amb el substrat NBT/BCIP. Disposar els filtres dins bosses de plàstic, afegir el Tampó 3 més substrat (Annex II), segellar i incubar a temperatura ambient protegit de la llum fins l'aparició de la coloració lilosa.
- Quan ja hagi aparegut el senyal, aturar la reacció retirant el filtre de la bossa i rentant-lo amb aigua destil·lada. Deixar assecar a l'aire damunt de paper absorbent.

## PROCEDIMENTS PER AL TREBALL AMB BACTERIÒFAGS

### CONCENTRACIÓ DE BACTERIÒFAGS PRESENTS EN AIGUA DE MAR

#### OBJECTIU

Concentrar els bacteriòfags presents en un volum determinat de mostra d'aigua de mar per tal d'obtenir un volum menor de mostra a analitzar. Procediment adaptat de Contreras (2000).

#### PROCEDIMENT

- Condicionar la mostra amb  $MgCl_2$  4,14 M afegint 15 mL per litre de mostra a concentrar.
- Filtrar volums de 200 mL de mostra per filtres de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus d'èsters de cel·lulosa i 47 mm de diàmetre.
- Retallar el filtre en 8 fragments i dipositar-los dins vials de vidre estèrils.
- Afegir 5 mL de tampó d'elució de fags (Annex II) assegurant que cobreixi tots els fragments.
- Aplicar ultrasons durant 3 minuts en un bany. L'aigua del bany ha de sobrepassar en 1 cm el nivell del tampó d'elució de dins els vials.
- Recuperar l'elut i descontaminar per filtració a través de 0,22  $\mu m$  de diàmetre de porus de baixa adsorció proteica (Millex-GP SLGP033RB, Millipore).
- Es pot procedir directament amb la seva titulació o bé, ajustar el pH a 7 amb HCl 0,1 M, afegir glicerol estèril fins a una concentració final del 10% i congelar a  $(-70 \pm 10)$  °C.

### AÏLLAMENT DE CLAPES DE BACTERIÒFAGS

#### OBJECTIU

Obtenir una suspensió de bacteriòfags que provenguin d'una clapa de lisi aïllada detectada sobre un cultiu de bacteris hostes en medi semisòlid, per tal de tenir un cultiu pur de bacteriòfags.

#### PROCEDIMENT

- Localitzar les zones de lisi o clapes produïdes pels bacteriòfags presents en una mostra determinada sobre un cultiu de bacteris hostes, quan la determinació ha estat realitzada aplicant el mètode de doble capa d'agar.
- Amb l'ajuda d'una nansa de sembra estèril retallar al voltant de la clapa retirant només la capa d'agar tou.

- Disposar el fragment d'agar tou dins un microtub de 1,5 mL de capacitat estèril que contingui 100 µL d'aigua destil·lada o PBS estèrils i ressuspènere per agitació amb l'ajuda d'un agitador de tubs (vòrtex).
- Afegir de 20 a 30 µL de cloroform i agitar vigorosament.
- Centrifugar a 6000 xg durant 10 minuts.
- Recuperar el sobrenedant on es localitzen els bacteriòfags i mantenir-lo a  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

---

## TEST DE LA GOTTA

---

### OBJECTIU

Determinar la presència de bacteriòfags en una suspensió determinada.

### PROCEDIMENT

- Afegir 1 mL del cultiu de la soca hoste en fase exponencial a un tub que contingui 2,5 mL d'agar tou líquuat.
- Agitar i estendre en una placa d'agar ordinari del medi adient.
- Esperar que solidifiqui.
- Dipositar una gota (5 – 20 µL) de la suspensió fàgica.
- Deixar que s'absorbeixi a temperatura ambient.
- Incubar a la temperatura indicada per al creixement de la soca hoste. Es recomana realitzar la incubació amb les plaques cap a munt.
- Observar la presència o absència d'una zona sense creixement bacterià al lloc on s'ha dipositat la gota, deguda a la lisi de les cèl·lules provocada pel fag.

## DETERMINACIONS BACTERIOLÒGIQUES

### TÈCNICA DE FILTRACIÓ EN MEMBRANA PER A LA DETERMINACIÓ DE BACTERIS

#### OBJECTIU

Retenir els bacteris sobre una membrana d'èsters de cel·lulosa de 0,45 µm de diàmetre de porus i fer-los créixer damunt medis de cultiu per tal d'obtenir un recompte de bacteris en un volum determinat de mostra.

#### PROCEDIMENT

- Seleccionar el volum de mostra a analitzar.
- Filtrar la mostra. Amb unes pinces esterilitzades a la flama es col·loca la membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus i 47 mm de diàmetre d'èsters de cel·lulosa (HAWG 047 00, Millipore) sobre el portafiltres de la rampa de filtració, la qual es troba connectada a l'aixeta d'aigua corrent a través de la trompa de buit. Col·locar damunt l'embut, assegurant-se que no hi hagi pèrdues. Filtrar la mostra intentant que aquesta quedi uniformement distribuïda damunt el filtre. Quan s'han de filtrar volums de mostra inferiors als 5 mL és recomana afegir solució estèril isotònica (PBS o Ringer ¼) a la mostra per tal de tenir un volum mínim de 5 mL.
- Transferir el filtre cara a munt a una placa de Petri que contingui el medi sòlid adient per al cultiu del microorganisme que es vol assajar.
- Incubar les plaques en posició invertida a la temperatura indicada el temps necessari per al creixement del microorganisme a estudi.
- Realitzar el recompte de les colònies que han crescut damunt el filtre que compleixin amb les característiques del microorganisme a estudi.
- En funció del volum de mostra analitzat realitzar els càlculs necessaris per tal d'expressar els resultats en ufc per 100 mL de mostra.



## DETERMINACIÓ DE MICROORGANISMES AEROBIS A 22°C I A 37°C

---

### OBJECTIU

Detectar i enumerar els microorganismes heterotrofs presents en una mostra.

### PROCEDIMENT

- Quan sigui necessari, preparar les dilucions de la mostra emprant com a diluent una solució isotònica per als bacteris (Ringer 1/4).
- Aplicar el mètode de filtració en membrana de les diferents dilucions a testar i dipositar els filtres damunt plaques de medi ric TSA (Annex II).
- Incubar les plaques a  $(36 \pm 2)$  °C durant 48 hores i a  $(22 \pm 2)$  °C durant 5 dies.
- Passat el període d'incubació realitzar el recompte de totes les colònies que han crescut damunt el filtre.

## DETERMINACIÓ DE COLIFORMES FECALS

---

### OBJECTIU

Detecció i recompte de coliformes termotolerants entenent com a coliformes aquells bacteris Gram negatius, no formadors d'espores, oxidasa negatius, anaeròbics facultatius que fermenten la lactosa (activitat  $\beta$ -galactosidasa) amb producció d'àcid i gas en  $(21 \pm 3)$  hores. Són termotolerants ja que a més de reunir aquestes condicions ho fan creixent a  $(44,5 \pm 0,2)$  °C. Coneguts com a coliformes fecals pel seu paper com a indicadors de contaminació fecal.

### PROCEDIMENT

- Després de concentrar el volum de mostra necessari per a cada anàlisi aplicant la tècnica de filtració en membrana, disposar la membrana sobre plaques amb medi m FC (Annex II) i incubar les plaques en posició invertida a  $(44,5 \pm 0,2)$  °C durant  $(21 \pm 3)$  hores.
- Comptar les colònies que creixen damunt el filtre i que mostren coloració blava corresponents als coliformes fecals. Les colònies de coliformes no fecals que creixen en medi m FC presenten color gris o crema.

---

**DETERMINACIÓ D'*Escherichia coli***

---

**OBJECTIU**

Detecció i recompte d'*Escherichia coli*, bacteris coliformes termotolerants que produeixen indol a partir de triptòfan i que presenten activitat  $\beta$ -glucuronidasa (tot i que sobre el 10% de les *E. coli* ambientals poden no presentar-ne). El grup de coliformes més adient per indicar contaminació fecal originada a partir d'animals de sang calenta.

**PROCEDIMENT**

- Després de concentrar el volum de mostra necessari per a cada anàlisi aplicant la tècnica de filtració en membrana, disposar la membrana sobre plaques amb medi Fluorocult LMX (Annex II) i incubar les plaques en posició invertida a  $(36 \pm 2)$  °C durant  $(21 \pm 3)$  hores.
- Comptar les colònies que creixen damunt el filtre i que mostren fluorescència quan s'irradien amb llum UV. De les colònies fluorescents es procedeix amb la confirmació afegint reactiu de Kovacs per a la prova de l'indol. Les colònies que presentaven coloració rosa-vermellosa amb l'addició del reactiu es consideren *E. coli*.

---

**DETERMINACIÓ D'ENTEROCOCS FECALS**

---

**OBJECTIU**

Detecció i recompte d'estreptococs fecals que es caracteritzen per ésser bacteris Gram positius, no esporulats, catalasa negatius amb capacitat per fermentar la glucosa amb producció d'àcid a  $(36 \pm 2)$  °C en  $(21 \pm 3)$  hores. Els enterococs són un subgrup d'aquests que es diferencien d'altres estreptococs per la capacitat de créixer a pH 9,6 amb NaCl 6,5%. Poden créixer a 10°C i a 45°C, resisteixen temperatures de 60°C durant 30 minuts i tenen la capacitat de reduir un 0,1% de blau de metil. Els enterococs fecals, a més de complir aquestes característiques hidrolitzen l'esculina produint 6,7-dihidroxicumarina.

**PROCEDIMENT**

- Després de concentrar el volum de mostra necessari per a cada anàlisi aplicant la tècnica de filtració en membrana disposar la membrana sobre plaques amb medi m-Enterococcus (Annex II) i incubar les plaques en posició invertida a  $(36 \pm 2)$  °C durant  $(44 \pm 4)$  hores.
- Les colònies d'enterococs damunt el medi m-Enterococcus presenten una coloració vermell fosc. Transferir les membranes en les que hagin crescut colònies damunt el filtre a plaques que continguin medi Bilis Esculina (Annex II) i incubar de nou a  $(44,5 \pm 0,5)$  °C durant de 3 a 4 hores.

Les colònies corresponents a enterococs fecals adquireixen una coloració fosca per la hidròlisi de l'esculina i la combinació del producte d'aquesta reacció amb els ions ferro (III) del medi.

## DETERMINACIÓ D'ESPORES DE CLOSTRIDIS SULFITO-REDUCTORS

---

### OBJECTIU

Detecció i recompte d'espores de clostridis sulfito-reductors mitjançant la tècnica d'inòcul en massa. Els clostridis són bacils Gram positius, anaeròbics estrictes capaços de produir espores, que pertanyen al gènere *Clostridium*.

### PROCEDIMENT

- Seleccionar el volum de mostra a analitzar i disposar-lo en tubs estèrils de 50 mL de capacitat.
- Ajustar el volum de la mostra a 25 mL amb aigua destil·lada estèril.
- Realitzar el xoc tèrmic a 80°C durant 10 minuts per tal de destruir les formes vegetatives del bacteri.
- Deixar refredar les mostres a temperatura ambient i afegir l'agar SPS 2x temperat a 55°C (25 mL aproximadament deixant el mínim d'aire possible). Agitar per inversió un parell de vegades.
- Deixar solidificar a temperatura ambient i incubar els tubs a  $(44,5 \pm 0,2)$  °C durant  $(21 \pm 3)$  hores.
- Recompte de les colònies negres que es trobin dins l'agar. El color negre de les colònies es deu a la reducció del sulfit i la precipitació del sulfur de ferro.

**Taula A-1.6.** Determinació de bacteris per NMP en aigua de mar utilitzant els micromètodes MUG/EC i MUD/SF en funció del nombre de pous que presenten fluorescència.

Pous positius	NMP/100 mL	Pous positius	NMP/100 mL	Pous positius	NMP/100 mL
0	<10	35	454	70	1306
1	10	36	470	71	1346
2	22	37	486	72	1386
3	32	38	504	73	1428
4	42	39	522	74	1474
5	54	40	540	75	1520
6	64	41	558	76	1568
7	76	42	576	77	1620
8	88	43	594	78	1674
9	98	44	614	79	1732
10	110	45	632	80	1792
11	122	46	652	81	1856
12	134	47	672	82	1926
13	146	48	694	83	2000
14	158	49	714	84	2080
15	170	50	736	85	2166
16	182	51	758	86	2262
17	194	52	780	87	2368
18	208	53	804	88	2484
19	220	54	826	89	2618
20	234	55	850	90	2772
21	246	56	876	91	2954
22	260	57	900	92	3178
23	274	58	926	93	3466
24	288	59	954	94	3872
25	302	60	980	95	4564
26	316	61	1010	96	>4564
27	330	62	1038		
28	344	63	1068		
29	360	64	1098		
30	374	65	1130		
31	390	66	1164		
32	406	67	1198		
33	422	68	1232		
34	438	69	1268		

ANNEX II. MEDIS I REACTIUS

<b>TAMPONS I REACTIUS</b>
---------------------------

---

**TAMPONS I REACTIUS EMPRATS EN TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR**

---

**PBS (Phosphate Buffer Saline) 1 ×**

- NaCl	8 g
- KCl	0,2 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,15 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 7,1-7,2 amb àcid clorhídric 1N. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

**Tripsina-EDTA**

- Tripsina (Trypsin 1:250, DIFCO)	2,5 g
- EDTA (Titrplex® III, 1.08418.1000 Merck)	0,2 g
- PBS 1× pH 7,1-7,2 estèril	1000 mL
- Penicil·lina/Estreptomicina	10 mL

(Penicillin/Streptomycin 10000 units·mL<sup>-1</sup>  
 Penicillin G sodium 10000 µg·mL<sup>-1</sup>  
 Streptomycin sulfate in 0,85% saline, 15140-  
 122, Gibco BRL, Life Technologies)

Dissoldre la tripsina i l'EDTA en el PBS per agitació. Treballant a la cabina de flux laminar, esterilitzar per filtració a través de filtres de baixa adsorció proteica Sterivex-GV 0,22 µm Durapore -PVDF- (SVGV B10 10, Millipore). Afegir la solució de Penicil·lina/ Estreptomicina i dispensar en ampolles estèrils per a ús de cultiu cel·lular de 100 mL de capacitat. La solució es manté estable a (-20 ± 5) °C durant 6 mesos. La solució de tripsina en ús es manté a (5 ± 3) °C un màxim de 15 dies.

**IDU 500 µg mL<sup>-1</sup>**

- |   |        |
|---|--------|
| - IDU (5-Iodo-2'-deoxyuridine, I 7125, Sigma) | 250 mg |
| - HBSS (Hanks' Balanced Salts, H 6136, Sigma) | 500 mL |

Preparar la solució HBSS seguint les indicacions del fabricant i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. Dissoldre per agitació l'IDU en aquesta solució i repartir en contenidors estèrils de 50 mL de capacitat. La solució es manté estable a  $(-20 \pm 5)$  °C durant 6 mesos.

**MgCl<sub>2</sub> 2%**

- |  |        |
|--|--------|
| - MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (1.05833, Merck) | 2 g    |
| - Aigua bidestil·lada                                    | 100 mL |

Dissoldre per agitació y esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 6 mesos.

**Roig neutre 0,1%**

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| - Roig neutre (N4638, Sigma)  | 0,1 g  |
| - Aigua bidestil·lada estèril | 100 mL |

Dissoldre per agitació. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C.

**Solució fixadora cristall violeta-formaldehid**

- |  |        |
|--|--------|
| - Cristall violeta (1408, Merck)       | 1,3 g  |
| - 2-propanol (131098, Panreac)         | 50 mL  |
| - Formaldehid 37-38% (141328, Panreac) | 300 mL |
| - Aigua de l'aixeta                    | 700 mL |

Dissoldre el cristall violeta en l'alcohol isopropílic i barrejar amb els 300 mL de formaldehid. Afegir aigua fins obtenir el volum final d'un litre. La solució és estable a temperatura ambient períodes superiors a 1 any.

---

**TAMPONS I REACTIUS EMPRATS EN MÈTODES DE CONCENTRACIÓ-ELUCIÓ DE VIRUS**


---

**PBS 2 x**

Es prepara segons s'ha descrit per al PBS 1 x, però dissolent doble quantitat de cadascun dels compostos en 1000 mL d'aigua bidestil·lada.

**Tampó Glicina 0,25 M pH 10,5**

- Glicina (Glicina, 141340, Panreac)	18,77 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre la glicina en 900 mL d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 10,5 amb NaOH en pastilles i acabar d'ajustar amb NaOH 10 M. Afegir aigua bidestil·lada fins a 1 litre. Esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

**Tampó Glicina 0,25 M pH 10,5 + 3% Extracte de carn**

- Glicina (Glicina, 141340, Panreac)	18,77 g
- Extracte de carn (BBL Beef extract Powder, 212303, Becton Dickinson)	30 g
- Aigua bidestil·lada	900 mL

Dissoldre la glicina en 800 mL d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 10,5 amb NaOH en pastilles i acabar d'ajustar amb 10 M. Afegir l'extracte de carn i aigua bidestil·lada fins a 900 mL. Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 7 dies.

**Tampó Glicina 0,05 M pH 9,5 + 3% Extracte de carn**

- Glicina	3,75 g
- Extracte de carn	30 g
- Roig fenol (1 mg · mL <sup>-1</sup> )	10 mL
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre la glicina en 900 mL d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 9,5 amb NaOH en pastilles i acabar d'ajustar amb 10 M. Afegir l'extracte de carn, el roig fenol i aigua bidestil·lada fins a 1 litre. Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 7 dies.



**Roig de fenol 1 mg mL<sup>-1</sup>**

- Roig de fenol (7241, Merck)	100 mg
- Aigua bidestil·lada	100 mL

Dissoldre per agitació i filtrar a través de filtres Millex®-GS de 0,22 µm de diàmetre de porus d'èsters barrejats de cel·lulosa (SLGS 025 0S, Millipore) per eliminar cristalls d'indicador no dissolts. Mantenir la solució a temperatura ambient i protegida de la llum.

**MgCl<sub>2</sub> 4,14 M**

- MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (131396.0914, Panreac)	5 kg
- Aigua destil·lada	2,5 L

Dissoldre el MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O en 2 litres d'aigua destil·lada remenant a poc a poc. Afegir la resta d'aigua destil·lada i filtrar la solució a través d'un prefiltrer de fibra de vidre AP25 (AP25 04700, Millipore). Repartir en volums de 500 a 1000 mL i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a (5 ± 3) °C durant 6 mesos.

**MgCl<sub>2</sub> 0,05 M**

- Solució de MgCl <sub>2</sub> 4,14 M	15 mL
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació y esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a (5 ± 3) °C durant 6 mesos.

**Hipoclorit sòdic 0.1%**

- Lleixiu (42,5 g/L NaClO)	20 mL
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació. Cal preparar la solució immediatament abans del seu ús.

**Tiosulfat de sodi 2%**

- Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Sodio Tiosulfato 5-hidrato, 141721, Panreac)	20 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient durant 6 mesos.

**Tiosulfat de sodi 0,05%**

- Solució de tiosulfat de sodi 2%	2,5 mL
- Aigua destil·lada estèril	1000 mL

Dissoldre per agitació. La solució és estable a temperatura ambient durant 6 mesos.

**Tampó d'elució de bacteriòfags**

- Extracte de carn	10 g
- Tween 80 (142050, Panreac)	30 mL
- NaCl	29,2 g
- Roig de fenol (1mg · mL <sup>-1</sup> )	10 mL

Dissoldre l'extracte de carn i el NaCl en 1 L d'aigua destil·lada, afegir-hi les solucions de Tween 80 i de roig fenol i comprovar que el pH final sigui de 9. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a (5 ± 3) °C.

---

**TAMPONS I REACTIUS EMPRATS EN TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR**


---

**Extracció, amplificació i anàlisi d'ADN****Solució estoc de DTT 1 M**

- DTT (dithiotreitol, D-9779, Sigma)	0,0772 g
- Acetat sòdic 0,01 M pH 5,2	0,5 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar per filtració amb l'ajuda de filtres de 0,22 µm èsters de cel·lulosa (Millex®-GS SLGS025BS, Millipore). Repartir en volums de 50 µL en microtubs d'1,5 mL de capacitat estèrils. La solució és estable a (-20 ± 5)°C.

**Solució de DTT 0,02 M**

- DTT 1 M	10 µL
- TE estèril (10 mM Tris – 0,1 mM EDTA)	490 µL

Dissoldre per agitació i mantenir la solució a (-20 ± 5)°C.

**Acetat sòdic 0,01 M pH 5,2**

- Acetat sòdic	0,082 g
- Aigua bidestil·lada	100 mL

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 5,2 amb àcid acètic glacial. Esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts.

**TBE 10 ×**

- Tris base (A2264, AppliChem)	109 g
- Àcid bòric (203667, Calbiochem)	55,6 g
- EDTA (Titriplex® III, 1.08418.1000 Merck)	92 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació en 400 mL d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 8,3 amb NaOH 1M. Ajustar a un volum final de 1 litre amb aigua bidestil·lada. Esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts.

**TBE 1 ×**

A partir de la solució concentrada de TBE 10 × dissoldre 1:10 (v:v) la solució de TBE 10 × en aigua bidestil·lada estèril. Dissoldre per agitació. Cal preparar la solució immediatament abans de la seva utilització.

**Tampó de càrrega**

- Solució de sacarosa 40%

o Sacarosa (5476, Merck)	40 g
o Aigua destil·lada	100 mL

- Blau de bromofenol (12370, US Biochemical Corp.) 250 mg

Dissoldre per agitació. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C.

**Bromur d'Etidi 1%**

- Bromur d'Etidi (A1151, AppliChem)	1 g
- Aigua bidestil·lada	100 mL

Dissoldre per agitació. Mantenir la solució a  $(5 \pm 3)$  °C protegida de la llum. En aquestes condicions és estable durant llargs períodes de temps.

**Bromur d'etidi 0,002 µg mL<sup>-1</sup>**

- Solució 1% de bromur d'etidi	200 µL
- Aigua destil·lada	1000 mL

Barrejar suaument per agitació. Mantenir a temperatura ambient protegida de la llum. Es recomana reemplaçar la solució quan es detecti una disminució de l'activitat del producte.

**Immunodetecció****TBS-Tween 5 ×**

- Tris Base (A2264, AppliChem)	6,055 g
- NaCl	40,9 g
- Tween 20 (Merck)	5 mL
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C.

**TBS-Tween 1 ×**

- TBS-Tween 5 ×	100 mL
- Aigua bidestil·lada estèril	400 mL

Dissoldre per agitació la barreja en una ampolla estèril. Preparar immediatament abans de la seva utilització.

**Tampó de bloqueig**

- TBS-Tween 5 ×	100 mL
- BSA (Albumin, Bovine Fraction V, A9647, Sigma)	15 g
- Aigua bidestil·lada estèril	400 mL

Dissoldre per agitació. Preparar immediatament abans de la seva utilització.

**Tris-HCl 1M pH 9,5**

- Tris base (A2264, AppliChem)	60,57 g
- Aigua bidestil·lada	500 mL

Dissoldre per agitació, ajustar el pH a 9,5 amb HCl i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

### **Hibridació molecular**

#### **Tampó 1**

- Àcid maleic (141882, Panreac)	11,6 g
- NaCl	8,8 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació. Ajustar el pH a 7,5 amb NaOH en pols. Esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

#### **Tampó de Rentat (Protocol detecció de digoxigenina)**

- Tampó 1	1000 mL
- Tween 20 (109280, Merck)	3 g

Afegir el Tween 20 al tampó 1 prèviament esterilitzat. Dissoldre per agitació. La solució és estable a temperatura ambient.

#### **Tampó 2**

- Tampó 1	900 mL
- Solució estoc de Blocking Reagent	100 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

#### **Tampó 3**

- Tris-HCl 1M pH 9,5	100 mL
- NaCl 1 M	100 mL
- MgCl <sub>2</sub> 1 M	50 mL
- Aigua bidestil·lada	750 mL

Dissoldre per agitació tots els components prèviament esterilitzats en condicions d'asèpsia. És preferible preparar la solució immediatament abans de la seva utilització.

**Solució estoc de Blocking Reagent**

- Blocking Reagent (1 096 176, Roche)	10 g
- Tampó 1	100 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$ °C. Cal comprovar l'esterilitat abans de la seva utilització.

**Tampó de revelat amb substrat colorimètric**

- Tampó 3	1 mL
- NBT/BCIP Stock Solution (18,75 mg·mL <sup>-1</sup> 4-Nitro blue tetrazolium chloride i 9,4 mg·mL <sup>-1</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, toluidine-salt en 67% DMSO (v:v); 1 681 451, Roche)	20 µL

Dissoldre per agitació. Preparar immediatament abans de la seva utilització.

**Tampó de revelat amb substrat luminiscent**

- Tampó 3	1 mL
- CSPD (1 655 884, Roche)	10 µL

Dissoldre per agitació. Preparar immediatament abans de la seva utilització.

**Reactiu de Denhart**

- Ficoll™ 400 (17-0400-01, Amersham Pharmacia Biotech)	10g
- Polyvinyl-pyrrolidone (Povidone; PVP-40, Sigma)	10g
- BSA (Albumin, Bovine Fraction V, A9647, Sigma)	10g
- Aigua bidestil·lada	500 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar per filtració a través de filtres de baixa adsorció proteica (PVDF). La solució és estable a  $(-20 \pm 5)$ °C.

**Esperma de salmó 10 mg mL<sup>-1</sup>**

- Sperm Nuclei Type II-S: Crude; From Salmon (S-3126, Sigma)	100 mg
- Aigua bidestil·lada estèril	10 mL

Dissoldre per agitació. La solució és estable a  $(-20 \pm 5)$ °C. Cal bullir-la abans d'afegir-la al tampó d'hibridació durant la preparació d'aquest.

**SDS 10%**

- Sodium dodecyl sulfate	100 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

**20x SSC**

- NaCl	175,3 g
- Citrat sòdic (tri-sodio citrato 2-hidrato, 141655, Panreac)	88,2 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació. Ajustar el pH a 7,0 i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

**Tampó de rentat 6x SSC + 0,6% SDS**

- 20x SSC	170 mL
- SDS 10%	30 mL
- Aigua bidestil·lada estèril	300 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

**Tampó de rentat 2x SSC + 0,6% SDS**

- 20x SSC	50 mL
- SDS 10%	30 mL
- Aigua bidestil·lada estèril	420 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

**Tampó de lisi**

- Isotiocianat de Guanidina (G6639 , Sigma) 12 g

- TrisHCl 0,1 M pH 6,4 estèril 10 mL

Dissoldre per agitació en un bany a 60°C. Seguidament afegir:

- EDTA 0,2 M pH 8 2,2 mL

- Tritó X-100 (1.08605, Merck) 247 µL

Dissoldre per agitació. El tampó és estable a temperatura ambient, en la foscor durant 3 setmanes.



<b>DILUENTS I MEDIS DE CULTIU</b>
-----------------------------------

---

### DILUENTS

---

**Peptona salina**

- Peptona (Bactopeptona, 211677, Beckton Dickinson)	1 g
- NaCl	8,5 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 6 mesos.

**Ringer 1/4**

- Ringer	2,5 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació y esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient durant 6 mesos.

---

### MEDIS DE CULTIU

---

**Medis de cultiu emprats en bacteriologia****TSB**

- TSB (Brou de Triptona i Soja, 2-200, Scharlau)	30 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. La solució és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

**TSA**

- TSA (Agar de Triptona i Soja, 1-200, Scharlau)	40 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

#### **m FC Agar**

- m FC Agar (267720, Difco)	52 g
- Àcid rosòlic 1%	10 mL
- Aigua destil·lada	1000 mL

Ressuspendre per agitació el m FC agar escalfant-lo a l'hora fins a l'ebullició. Mantenir l'ebullició durant 1 minut per tal que es dissolgui completament i en aquest moment afegir l'àcid rosòlic. Mantenir l'agitació i l'ebullició durant 1 minut més. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

#### **Solució d'àcid rosòlic 1%**

- Àcid rosòlic (Bacto Rosolic Acid, 3228-09-1, Difco)	0,1 g
- NaOH 0,2 M estèril	10 mL

Afegir l'àcid rosòlic a la solució de NaOH i dissoldre per agitació.

#### **Fluorocult®**

- Fluorocult® LMX brou (1.10620, Merck)	17 g
- Agar per a bacteriologia (7-004, Scharlau)	15 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

#### **mEnterococcus Agar**

- mEnterococcus Agar (274620, Difco)	42 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Ressuspendre per agitació el mEnterococcus agar escalfant-lo a l'hora fins a l'ebullició. Mantenir l'ebullició durant 1 minut per tal que es dissolgui completament. Refredar fins a 50 °C aproximadament i dispensar immediatament a les plaques. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

**Agar Bilis Esculina**

- Bile Esculin Agar (287920, Difco)	64 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

**SPS**

- SPS Agar (01-050, Scharlau)	41,3 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts.

**Medis emprats en tècniques de cultiu cel·lular****Medi de Manteniment - MEM 1% SFB**

- Minimum Essential Medium (MEM)	9,39 g
Eagle (modified)auto-pow®(1110024, ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA)	
- Aigua bidestil·lada	940 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% (Sodium Bicarbonate 7,5%, 25 080-060, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes (Hepes Buffer 1M, BE17-737E, Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgium) — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina (L-Glutamine 200 mM in 0,85% NaCl solution, BE17-605E, Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgium) — concentració final 2 mM.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina (Penicillin/Streptomycin 10000 units·mL<sup>-1</sup> Penicillin G sodium 10000 µg·mL<sup>-1</sup> Streptomycin sulfate in 0,85% saline, 15140-122, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 10 mL de Sèrum Fetal Boví (FBS South American Origin, DE14-801F, Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgium).

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi de Manteniment – MEM 2% SFB**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	920 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL d'aminoàcids no essencials 100 × — concentració final 1 ×.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 10 mL de Sèrum Fetal Boví.

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi de Creixement - MEM 5% SFB**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	900 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 50 mL de Sèrum Fetal Boví.

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi de Creixement – MEM 5% SFB, NEAA**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	890 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de  $\text{NaHCO}_3$  al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL d'aminoàcids no essencials 100 × — concentració final 1 ×.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de Penicil·lina G, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  d'Estreptomicina.
- 50 mL de Sèrum Fetal Boví.

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi de Creixement - MEM 10% SFB, NEAA**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	840 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de  $\text{NaHCO}_3$  al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL d'aminoàcids no essencials 100 × — concentració final 1 ×.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de Penicil·lina G, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  d'Estreptomicina.
- 100 mL de Sèrum Fetal Boví.

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi per a la preparació de suspensions cel·lulars**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	940 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1 M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 10 mL de Sèrum Fetal Boví.
- 5 mL de solució de clorur de magnesi 2% — concentració final 0,01%
- 5 mL Nistatina (Nystatin 10000 U·mL<sup>-1</sup> in DPBS, N1638 Sigma) — concentració final 50 u·mL<sup>-1</sup>.
- 5 mL Gentamicina (Gentamicin 10 mg·mL<sup>-1</sup>, G1272 Sigma) — concentració final 50 µg·mL<sup>-1</sup>.
- 2 mL Ceftazidime (10000 µg·mL<sup>-1</sup>, GlaxoWellcome) — concentració final 20 µg·mL<sup>-1</sup>.

El medi completament preparat es manté estable a  $(5 \pm 3)$  °C un màxim de 15 dies.

**Medi post-infecció – MEM 2 × (Mètode de monocapa)**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	9,39 g
- Aigua bidestil·lada	440 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 10 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 10 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 10 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 10 mL de Sèrum Fetal Boví.

El medi completament preparat té una durada màxima de 15 dies.

**Medi post-infecció – Agar 2 × (Mètode de monocapa)**

- Agar purificat (L28, Oxoid Ltd.)	7,5 g
- Aigua bidestil·lada	500 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts.

Temperar l'agar 2 × i el MEM 2 × a 45°C aproximadament i barrejar agitant bé.

**Medi post-infecció – MEM 2 × (Mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió)**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	1,88 g
- Aigua bidestil·lada	80 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 4 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 2 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.
- 2 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 2 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 6 mL de Sèrum Fetal Boví.
- 1 mL de clorur de magnesi 2% — concentració final 0,01%.
- 1 mL Nistatina (Nystatin 10000 U·mL<sup>-1</sup> in DPBS, N1638 Sigma) — concentració final 50 U·mL<sup>-1</sup>.
- 1 mL Gentamicina (Gentamicin 10 mg·mL<sup>-1</sup>, G1272 Sigma) — concentració final 50 µg·mL<sup>-1</sup>.
- 1 mL de roig neutre 0,1%.

El medi completament preparat es manté estable a  $(5 \pm 3)$  °C un màxim de 15 dies.

**Medi post-infecció – MEM 2 × amb antibiòtics (Mètode Viraden i de doble capa)**

- Minimum Essential Medium (MEM) Eagle auto-pow®	1,88 g
- Aigua bidestil·lada	80 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 minuts. El medi preparat és estable a  $(5 \pm 3)$  °C durant 30 dies.

Treballant a la cabina de flux laminar, afegir:

- 4 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 7.5% — concentració final 26,8 mM.
- 2 mL de tampó Hepes 1M — concentració final 10 mM.

- 2 mL de L-Glutamina 200 mM — concentració final 2 mM.
- 2 mL de Penicil·lina/Estreptomicina — concentració final 100 U·mL<sup>-1</sup> de Penicil·lina G, 100 µg·mL<sup>-1</sup> d'Estreptomicina.
- 6 mL de Sèrum Fetal Boví.
- 1 mL de clorur de magnesi 2% — concentració final 0,01%.
- 1 mL Nistatina (Nystatin 10000 U·mL<sup>-1</sup> in DPBS, N1638 Sigma) — concentració final 50 U·mL<sup>-1</sup>.
- 1 mL Gentamicina (Gentamicin 10 mg·mL<sup>-1</sup>, G1272 Sigma) — concentració final 50 µg·mL<sup>-1</sup>.
- 400 µL Ceftazidime (10000 µg·mL<sup>-1</sup>, GlaxoWellcome) — concentració final 20 µg·mL<sup>-1</sup>.

El medi completament preparat es manté estable a (5 ± 3) °C un màxim de 15 dies.

**Agar 2% (Mètode d'assaig de clapes amb cèl·lules en suspensió, Viraden i de doble capa)**

- Agar purificat (L28, Oxoid Ltd.)	2 g
- Aigua bidestil·lada	100 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts.

Les solucions d'agar es poden deixar solidificar i fondre al microones quan es necessitin, assegurant-se que l'agar queda ben dissolt. Aquesta operació es pot realitzar fins a 4 vegades sense perdre eficiència en la solidificació de l'agar.