

## Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica

Libia Herrero U.<sup>1</sup>, Alejandro Palacios F.<sup>2</sup>, Laya Hun O.<sup>1</sup> y Francisco Vega A.<sup>1</sup>

- 1 Sección de Virología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, Fax. 225-2374. lherrero@sol.racsa.co.cr.
- 2 Louisiana State University \_ International Center of Medical 2060 Research and Training (LSU-ICMRT), San Jose, Costa Rica. japalaci@ns.etsalud.sa.cr.c1. San Jose, Costa Rica.

Recibido 30-VII-1998. Corregido 18-III-1999. Aceptado 18-III-1999.

**Abstract:** *Anadara tuberculosa* is one of the most abundant mollusks of commercial importance in Costa Rica. Its habitat water is a potential source of fecal and chemical contamination to humans. We wanted to assess enterovirus, mainly poliovirus and hepatitis A virus and chemicals such as sulphates and nitrates in meat and body fluids. Thirteen samples were taken from four sites in Nicoya Gulf, three sites in the Sierpe-Térraba mangrove (Pacific of Costa Rica) and from five fish markets in San José, the capital of Costa Rica. Samples were tested for 1) fecal coliforms (Most Probable Number/100 ml), 2) isolation of enterovirus in cell culture (Hep-2, FrhK-4), 3) cell cytotoxicity in Vero cells and 4) the ability to inactivate 10 ID<sub>50%</sub> of poliovirus in cell culture. The Most Probable Number/100 ml in surrounding water was higher than the accepted standard for recreational waters, although the number of fecal coliforms in meats and body fluids was lower than in the external water. No cytopathogenic agents were isolated, but we found nitrate and sulphate concentrations that exceeded maxima for human consumption and recreation. The intrinsic cytotoxicity of the samples was at a 1/8 dilution, but some samples were cytotoxic at dilutions of 1/128. Body fluids were more cytotoxic than meats, but a positive correlation between cytotoxicity and chemical contamination was not determined: apparently other pollutants not identified in this study were responsible. Fluid and meat capacity to inactivate 10 ID<sub>50%</sub> of poliovirus in cell culture was demonstrated. Samples that were toxic for cell cultures also showed a higher percentage of poliovirus inactivation. Monitoring chemical pollution in these waters is highly recommended.

**Key words:** Bivalves, enterovirus, fecal coliforms, citotoxicity, poliovirus inactivation, chemical contamination.

Las pianguas (*Anadara tuberculosa*, Bivalvia: Arcidae) constituyen uno de los principales moluscos bivalvos de importancia comercial en Costa Rica (Campos *et al.* 1990). Sin embargo las aguas donde estos organismos se desarrollan presentan dos peligros directos para el ser humano. El primero de ellos, es la contaminación fecal y el segundo, la contaminación química debido a la utilización desmedida de fertilizantes e insecticidas en las zonas agrícolas (Murphy *et al.* 1979, McNeely 1979, Rao *et al.* 1984, Anónimo 1993).

Se ha demostrado que la descarga de las aguas negras en las costas es un riesgo para la salud pública, tanto para quienes se bañan, como para quienes consumen bivalvos (Fernández *et al.* 1971, Wanke y Guerrant 1987). El consumo de estos moluscos ha causado muchos brotes de enfermedades entéricas en varios lugares del mundo (Dsenclos 1991), debido a la capacidad que tienen de filtrar hasta 50 litros de agua por día (Martinez *et al.* 1991). Los virus de aguas negras cuando son ingeridos por bivalvos son atrapados en la mucosa de

las agallas y transportados por movimientos ciliares a la boca y luego al estómago. Aunque los virus de animales de sangre caliente no se replican en bivalvos, los virus pueden ser digeridos por enzimas, transportados protegidos por macrófagos hacia la musculatura o ser eliminados por las heces (Campos 1990, Martínez *et al.* 1991). De esta manera los bivalvos pueden actuar como concentradores tanto de bacterias como de virus, aumentando así las posibilidades de infección a la hora de consumirlos crudos o mal cocinados.

La determinación de los coliformes fecales ha sido la prueba que se ha utilizado para evaluar el grado de contaminación fecal de las aguas y de los bivalvos que viven en ellas (Fernández y Brunker 1977, McNeely 1979, Anónimo 1993). Sin embargo, algunos autores han demostrado que los virus entéricos, por su resistencia a pH ácido, sobreviven por tiempos más largos que los coliformes fecales, haciendo importante la detección directa de estos agentes (Metcalf 1978, Richards *et al.* 1982, Le Guyader *et al.* 1993, Gaswami *et al.* 1993).

El método estándar para el aislamiento de virus de las aguas y de los bivalvos ha sido en cultivos celulares, el cual es lento, tedioso y caro. Sin embargo, se ha desarrollado la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es mucho más rápida y muy sensible, pero con el inconveniente que no permite afirmar si el virus que se determina está en forma viable o no (Atmar *et al.* 1993).

Además de la presencia de microorganismos, la contaminación química de las aguas se ha convertido en un potencial riesgo para la salud. En los últimos años, en la costa del Pacífico en Costa Rica, la masa de agua del Golfo de Nicoya ha sido afectada drásticamente debido al impacto de una contaminación progresiva, relacionada con el desarrollo poblacional tanto en sus márgenes como en el valle así como con el desarrollo de las actividades agropecuarias e industriales (Cabalceta 1997).

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de enterovirus (polio) y hepatitis A y contaminantes químicos en los líquidos y las carnes obtenidas a partir de bivalvos recolectados en

el Estero de Puntarenas (Golfo de Nicoya) y en el manglar Sierpe-Térraba de Costa Rica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de muestras:** Las muestras fueron recolectadas durante la estación seca (de enero a abril) para evitar el efecto de dilución por lluvias. Durante ese año (1996) la precipitación lluviosa fue irregular, inclusive con inundaciones en febrero. Se recolectó una muestra por sitio, un total de 13 muestras: cuatro de ellas en el Golfo de Nicoya, más específicamente en los manglares del Estero de Puntarenas (Chacarita, El Cocal, al frente del Club de Yates y al frente del mercado de Puntarenas), cuatro muestras de diferentes sitios del manglar Sierpe-Térraba en la Península de Osa y cinco muestras de diferentes pesquerías del área de San José. Cada muestra constó de 50 bivalvos, los cuales se guardaron en una bolsa estéril y se transportaron en frío al laboratorio. El mismo día de la recolección, cada bivalvo de cada muestra se lavó individualmente y se extrajo el molusco de la concha en forma aséptica. Una vez separados, cada muestra de 50 bivalvos se dividió en cinco partes para realizar las diferentes pruebas: tres partes para coliformes fecales y otras pruebas bacteriológicas que no se incluyen en este trabajo, una parte para la detección del virus de la hepatitis A (VHA) por PCR, y una parte para los estudios virológicos en cultivos celulares; esta última se guardó a -70°C hasta su procesamiento.

**Procesamiento de los líquidos:** las muestras se descongelaron en baño maría, permitiendo la salida de los líquidos internos de los bivalvos al medio ambiente. Estos fueron recolectados y centrifugados a 1200 g durante 15 min y luego a 10 000 g en una centrífuga refrigerada (IEC B-204). Una parte se filtró a través de membranas de Millipore de 0.22µm y se guardó a -70°C y otra de 60 ml se precipitó con polietilén glicol (PEG-6000, Sigma) utilizando la técnica de Lewis y Metcalf (1988) para concentrar la muestra 20 veces.

**Procesamiento de las carnes:** una vez que se extrajo el líquido interno de los bivalvos, se preparó una suspensión al 60% de las carnes en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) complementada con 1000U/ug por ml de penicilina y estreptomina (Sigma). Esta suspensión fue triturada en una licuadora y macerada en un mortero estéril. Las muestras fueron congeladas y descongeladas tres veces y fueron centrifugadas a 1200 g por 15 min y luego a 10 000 g por 30 min. Las muestras así procesadas se mantuvieron a -70°C hasta su posterior utilización.

**Número más probable:** para la determinación del Número más Probable de Coliformes fecales (NMP CF) se utilizó el método de cinco tubos recomendado por la Asociación Americana de Salud Pública (Frampton y Restaino 1993). Para la identificación de *Escherichia coli* en los tubos lactosa y gas positivo se utilizó agar *Escherichia coli* con 50mg/ml de metilumbeliferil-B-D ácido glucurónico (MUG). Se incubó a 45°C por 24 hr y se realizaron las lecturas (Scott *et al* 1987, Frampton y Restaino 1993).

**Reacción en cadena de la polimerasa:** para la determinación del ácido ribonucleico (ARN) del virus de la hepatitis A (VHA) se procedió a extraer 100 µl de los líquidos de los bivalvos individuales con el sistema "Rneasy" (Qiagen Corp). Ocho microlitros del extracto de ARN fueron retrotranscritos con Super Script II (GIBCO BRL) con el "primer" antisentido A3 de la región 5' no codificante. La amplificación se realizó con los "primers" A1 y A3. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (Palacios 1998).

**Inoculación en monocapas celulares para el aislamiento de virus:** un día antes se prepararon tubos con monocapas de células Hep-2 (ATCC CCL 23) y FrhK-4 (ATCC CRL 1688) y se inocularon por duplicado con 0.2 ml de cada muestra de líquidos y carnes. Después de una hora de adsorción a 37°C, se agregó medio de cultivo (MEM, Gibco) al 2% y se incubó a 37°C. En el caso de las células Hep-2, se observó las monocapas diariamente al microscopio por diez días. Luego de ese período de

tiempo, los tubos se congelaron y descongelaron tres veces, se centrifugó a 2 000 g por 15 min y el sobrenadante se guardó para hacer los pasajes ciegos. En el caso de las botellas con células FrhK-4 se incubó cuatro semanas a 37°C. Luego de ese período, las monocapas se congelaron y descongelaron tres veces, se eliminó los restos celulares por medio de centrifugación a 2 000 g durante 15 min y luego se determinó la presencia del antígeno del virus de la hepatitis A por la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (Forghani 1979). Los sobrenadantes se emplearon para hacer los pasajes ciegos.

**Pruebas de citotoxicidad en cultivos celulares:** a las suspensiones de los líquidos y las carnes se les realizó diluciones seriadas a partir de una dilución de 1/8 hasta 1/256 en medio MEM al 2% y las diluciones se ensayaron en monocapas de células Vero (ATCC CRL 6318) para detectar la toxicidad. Después de cinco días de observación, la máxima dilución donde se presentó toxicidad se tomó como la toxicidad intrínseca de la muestra.

**Capacidad de las muestras de inactivar el poliovirus tipo 1:** se mezcló volúmenes iguales de cada muestra de los líquidos y de las carnes con 10 DI<sub>50%</sub> de poliovirus y se incubó a 37°C durante una hora. Luego se inoculó en células Hep-2 y se incubó a 37°C. Se observó diariamente al microscopio por efecto citopático (ECP) característico. Se consideró que las muestras donde no se presentó ECP tienen capacidad de inactivar o neutralizar el virus.

**Determinación de sulfatos y nitratos en la muestras:** estas determinaciones se realizaron en el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) de la Universidad de Costa Rica por el método de cromatografía de iones de una sola columna con supresión electrónica de conductividad y detección conductimétrica (Anónimo 1991).

## RESULTADOS

En las pianguas recogidas del Manglar Sierpe-Térraba y en tres de las cinco recogidas de las pescaderías se detectó menos de 2 NMP

CUADRO 1

Análisis bacteriológico de muestras de bivalvos-Costa Rica

Lugar	NMP CF*/100 ml Agua**	NMP CF*/g Pianguas***
Sierpe 1	7	< 2
Sierpe 2	4	< 2
Sierpe 3	11	< 2
Sierpe 4	17	< 2
Pescadería 1	NSH	< 2
Pescadería 2	NSH	< 2
Pescadería 3	NSH	< 2
Pescadería 4	NSH	> 16000
Pescadería 5	NSH	3500
Chacarita****	33	23
Club de Yates****	460	4
Cocal Estero Adentro****	350	4
Frente Mercado****	350	< 2

\* = Coliformes fecales.

\*\* = *E. coli* o bacterias coliformes termotolerantes no deben ser detectadas en una muestra de 100 ml de agua. (APHA, 1991).

\*\*\* = Normales para bivalvos. (menor que 230CF por 100 ml) (APHA, 1991)

NSH = No se hizo.

\*\*\*\* = Sitios de muestreo en el Estero de Puntarenas.

CF/g (Cuadro 1). Sin embargo, en dos de las muestras de pescadería se obtuvo conteos más altos de lo permitido para consumo humano. En el agua recogida del manglar del río Sierpe, se determinó contaminación por coliformes fecales aunque los conteos fueron mucho menores que los que se detectaron en las aguas del estero de Puntarenas. No se determinó correlación entre el contenido bacteriano de las aguas y los bivalvos en ninguna de las muestras analizadas.

No se logró el aislamiento de ningún agente citopatogénico en las células Hep-2 después de realizar cinco pasajes ciegos. Es importante aclarar que ni en los análisis directos ni en las muestras concentradas se logró determinar la presencia de enterovirus en los líquidos y en las carnes de los bivalvos. Tampoco fue posible el aislamiento del virus de la Hepatitis A de los líquidos o las carnes, después de tres pasajes ciegos en las células FrhK-4 a pesar que se detectó genomas virales por la

reacción de la polimerasa en los líquidos pero no en las carnes de las muestras de Chacarita, Club de Yates y Cocal del Estero de Puntarenas (Cuadros 2 y 3).

El estudio de la contaminación química se realizó mediante pruebas de toxicidad de los líquidos y las carnes de los bivalvos en cultivos celulares. En el cuadro 2 se observa la toxicidad de los líquidos de los bivalvos en los diferentes sitios de muestreo. Los líquidos de los bivalvos de las pescaderías mostraron una toxicidad relativamente baja (<1/8 y 1/8), por el contrario las muestras obtenidas de sitios del Manglar Sierpe-Térraba y de Puntarenas presentan toxicidad a diluciones de 1/32 a 1/128. En el Cuadro 3 se muestra la toxicidad de las carnes, las cuales en general son mucho menos tóxicas que los líquidos respectivamente, con excepción de las carnes de los bivalvos de las pescaderías, que mostraron una toxicidad mayor con respecto a los líquidos.

Para tratar de establecer el tipo de tóxicos presentes en las muestras, se determinó nitratos y sulfatos en los líquidos y las carnes de los bivalvos. Como se observa en los cuadros 2 y 3, la concentración de nitratos en todas las muestras fue mucho mayor a lo aceptable para consumo humano y en el caso de los sulfatos todas excepto dos muestras se encontraron por arriba del límite normal.

Se determinó si la citotoxicidad de los líquidos y las carnes de los bivalvos podrían tener algún efecto sobre la replicación de un virus. Para ello se realizó una prueba de inactivación o neutralización utilizando el poliovirus tipo 1 en células Vero. Como se puede observar en los Cuadros 2 y 3, los líquidos tuvieron más capacidad de inactivar la cepa de referencia de poliovirus 1 que las carnes y se demostró una correlación entre citotoxicidad e inactivación en la mayoría de los casos.

## DISCUSIÓN

Los coliformes han sido utilizados como indicadores sanitarios de la calidad del agua y

Cuadro 2

*Análisis en cultivos celulares y estudio químico de los líquidos corporales*

	Toxicidad en Células (Título)	Inactivación (%) del Virus de la Polio	Concentración		PCR VHA
			Nitratos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	
Sierpe 1	1/32	0%	1.800	1.520	-
Sierpe 2	1/32	75%	NSH	NSH	-
Sierpe 3	1/32	0%	NSH	NSH	-
Sierpe 4	1/32	0%	2.000	2.700	-
Pescadería 1	1/8	0%	600	800	-
Pescadería 2	< 1/8	0%	360	400	-
Pescadería 3	< 1/8	0%	NSH	NSH	-
Pescadería 4	< 1/8	0%	NSH	NSH	-
Pescadería 5	1/8	50%	NSH	NSH	-
Chacarita****	1/128	100%	1.400	1.300	+
Club de Yates****	1/128	50%	NSH	NSH	+
Cocal Estero Adentro****	1/128	75%	2.000	1.700	+
Frente Mercado****	1/128	50%	NSH	NSH	-

% Inactivación = Inactivación del virus por la muestra. Se realizó con la mínima dilución en que no produce citotoxicidad en cultivos celulares.

NSH = No se hizo.

Nitratos = 10 mg/L, es lo aceptable para agua de consumo humano.

Sulfatos = 150 - 500 mg/L, es lo aceptable para agua de consumo humano.

\*\*\*\* = Sitios de muestreo en el Estero de Puntarenas.

Cloruros = Depende de la salinidad del agua.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

VHA = Virus de la hepatitis A.

- = No se detectaron genomas virales.

+ = Si se detectaron genomas virales

Cuadro 3

*Análisis en cultivos celulares y estudio químico de las carnes de Anadara tuberculosa*

	Toxicidad en Células (Título)	Inactivación (%) del Virus de la Polio	Concentración		PCR VHA
			Nitratos (mg/L)	Sulfatos (mg/L)	
Sierpe 1	1/32	0%	1.100	580	-
Sierpe 2	1/32	0%	NSH	NSH	-
Sierpe 3	1/32	0%	NSH	NSH	-
Sierpe 4	1/8	0%	1.400	940	-
Pescadería 1	1/8	0%	1.500	720	-
Pescadería 2	1/32	0%	980	620	-
Pescadería 3	1/8	0%	NSH	NSH	-
Pescadería 4	1/8	0%	NSH	NSH	-
Pescadería 5	1/8	0%	NSH	NSH	-
Chacarita****	1/32	25%	1.600	1.300	-
Club de Yates****	1/32	50%	NSH	NSH	-
Cocal Estero Adentro****	1/8	0%	90	62	-
Frente Mercado****	1/32	0%	NSH	NSH	-

% Inactivación = Inactivación del virus por la muestra. Se realizó con la mínima dilución en que no produce citotoxicidad en cultivos celulares.

NSH = No se hizo.

Nitratos = 10 mg/L, es lo aceptable para agua de consumo humano.

Sulfatos = 150 - 500 mg/L, es lo aceptable para agua de consumo humano.

\*\*\*\* = Sitios de muestreo en el Estero de Puntarenas.

Cloruros = Depende de la salinidad del agua.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

VHA = Virus de la hepatitis A.

- = No se detectaron genomas virales.

+ = Si se detectaron genomas virales

también para clasificar las áreas para recolección de bivalvos (Larkin y Hunt 1982, Chai *et al.* 1994, Danies *et al.* 1995), sin embargo, algunos autores (Sobsey *et al.* 1978, Goyal *et al.* 1979, Metcalf *et al.* 1980, Anónimo 1991) han demostrado que los coliformes no son indicadores inequívocos. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con la ausencia de correlación entre el contenido bacteriano de las aguas y los bivalvos.

En 1984, Araya y Rodríguez determinaron que el agua del Estero de Puntarenas era inaceptable para consumo y para la recreación, mostrando valores en el número más probable de coliformes totales entre 64 y 24 000/100ml y los bivalvos mostraron valores que fluctuaron entre 15 000 y 900 000/100 g. Otro estudio realizado entre 1985 a 1987 (Villalobos y Fernández 1988), demostraron que la contaminación en tres sitios del Golfo de Nicoya era muy alta; por lo tanto, los moluscos que ahí habitaban eran inaceptables para el consumo humano. Aunque este tipo de estudios no pueden ser comparados, ya que los conteos fluctúan de mes a mes (Villalobos y Fernández 1988), la diferencia en los valores de los coliformes obtenidos en los estudios de los años ochenta y este trabajo es muy marcada.

Varios estudios han demostrado que la posibilidad de aislamientos de virus entéricos de bivalvos es baja, con una variación del 34 al 50% (Sobsey *et al.* 1978, Lewis y Metcalf 1988). Este hecho puede ser explicado por varias razones, como por ejemplo la calidad del agua y la presencia de compuestos orgánicos que pueden inhibir las partículas virales, los compuestos citotóxicos capaces de interferir con la adsorción de los virus a las células, la preparación de las muestras o los mismos tejidos de los bivalvos (Sobsey *et al.* 1978, Metcalf *et al.* 1980). Aún así, la ausencia de aislamientos virales de las muestras de los bivalvos es difícil de explicar ya que alrededor de ciertos sitios de recolección (especialmente Puntarenas), existen asentamientos humanos que no cuentan con lugares adecuados para la eliminación de excretas, por lo tanto, se esperaba una contaminación fecal más alta con la consecuen-

te posibilidad de aislamientos de virus, ya que los enterovirus son habitantes normales del tracto intestinal del ser humano y se excretan por las heces frecuentemente (Melnick 1995).

Con el fin de establecer el papel de otros factores que pudieran interferir en el aislamiento de agentes virales, se realizó la prueba de toxicidad de los líquidos y las carnes de los bivalvos en cultivos celulares, que es un buen indicador de contaminación química. Los líquidos de los bivalvos de las pescaderías mostraron una toxicidad relativamente baja con respecto a las muestras obtenidas de sitios del manglar Sierpe - Terraba y de Puntarenas. La toxicidad de las carnes, en general, fue menor que los líquidos, con excepción de las carnes de los bivalvos de las pescaderías, que mostraron una toxicidad mayor con respecto a los líquidos. Esto último podría deberse a la manipulación propia de los bivalvos en las pescaderías. Los resultados indican que la toxicidad mínima de las carnes de estos moluscos se obtiene a una dilución de 1/8, posiblemente por constituyentes intrínsecos de los tejidos (Vaughn *et al.* 1979). Sin embargo, la toxicidad detectada a una dilución de 1/128 es muy significativa, pudiendo indicar factores que interfieren con el aislamiento viral en cultivos celulares.

Para tratar de establecer el posible tipo de tóxicos presentes en las muestras, se determinaron nitratos y sulfatos en los líquidos y las carnes de los bivalvos. La presencia de nitratos en agua en concentraciones mayores a 5 mg/L pueden reflejar condiciones insolubles de las muestras, ya que una de las mayores fuentes de nitratos son los desechos de humanos y animales. Como se observó en los resultados, las concentraciones de nitratos en todas las muestras fue mucho mayor a lo aceptable para consumo humano, indicando contaminación fecal o la presencia de fertilizantes en las aguas. El sitio de toma de muestra en Chacarita concuerda con el asentamiento humano antes mencionado además de una Planta Industrial de Fertilizantes, por lo tanto, esas aguas podrían estar contaminadas tanto con materia fecal como química. Como se demostró en

resultados (Cuadro 1), los conteos de coliformes en ese sitio son bajos con respecto a los otros sitios del Estero de Puntarenas y también mostró concentraciones altas de nitratos y sulfatos. Ruiz y Mora en 1993 revelaron que el uso que se le da al Estero de Puntarenas es muy variado, siendo lo más común la descarga de desechos domésticos e industriales, especialmente agroquímicos. Sin embargo, en este trabajo no se encontró una correlación entre la toxicidad de las muestras en cultivo celular y la presencia de nitratos en el agua, lo que sugiere la existencia de otros contaminantes.

Se trató de determinar si los diferentes resultados de toxicidad en cultivos celulares podrían tener algún efecto sobre la replicación de un virus. Para ello se realizó una prueba de inactivación o neutralización utilizando el virus de la polio. Los líquidos tuvieron más capacidad de inactivar la cepa de referencia de poliovirus 1 que las carnes y las muestras con títulos más elevadas de citotoxicidad presentaron a su vez mayor capacidad de inactivar el virus en cultivos celulares. Estos resultados sugieren que deben existir otros contaminantes químicos en las aguas y/o en los bivalvos capaces de inactivar el virus.

En Europa se ha descubierto una nueva contaminación de ríos, lagos y mares por productos farmacéuticos como antibióticos, analgésicos, antisépticos y drogas para disminuir el colesterol (Ralof 1998). Las drogas contaminan las aguas al ser liberadas en los desechos humanos. Actualmente no se conoce cual es la toxicidad potencial de estos agentes para el ser humano, los animales y los sistemas acuáticos, pero se cree que las drogas parcialmente degradadas podrían volver a su forma activa por medio de reacciones químicas en el ambiente.

Como se ha expuesto anteriormente, el aislamiento de virus de los bivalvos no es eficiente por los métodos conocidos, pero sumado a los bajos conteos de coliformes fecales en aguas potencialmente contaminadas y la alta contaminación química de éstas, hace imperativo continuar con la vigilancia de la contaminación química ambiental.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se llevó a cabo gracias a los fondos recibidos por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (#430-96-212 y #430-96-214), al Convenio 9451 BID-CONICIT (388RC) y al Centro Nacional de Referencia para Cólera-INCIENSA al facilitar las muestras de piangua y agua, así como la información sobre contaminación de coliformes fecales incluidas en el estudio. Además agradecemos al Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA), por las determinaciones de nitratos y sulfatos y por sus aportes en el manuscrito. También agradecemos a Edwin Carrera del Laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología por su ayuda técnica.

## RESUMEN

*Anadara tuberculosa* es uno de los moluscos más abundantes de importancia comercial en Costa Rica. Su hábitat acuático es una fuente potencial de contaminación fecal y química para el ser humano. El objetivo de este trabajo fue determinar enterovirus, especialmente poliovirus y el virus de la hepatitis A y contaminación química como nitratos y sulfatos en las carnes y los líquidos internos. Se recogieron trece muestras de cuatro sitios del golfo de Nicoya, de tres sitios del manglar Sierpe-Térraba (Pacífico de Costa Rica) y de cinco pescaderías de San José, la capital de Costa Rica. Las muestras fueron ensayadas por 1) coliformes fecales (Número Más Probable/100 ml), 2) aislamiento de enterovirus en cultivos celulares (Hep-2 y FrhK-4), 3) citotoxicidad en células Vero y 4) la habilidad de las muestras de inactivar 10 DI<sub>50%</sub> de poliovirus en cultivos celulares. El Número Más Probable/100 ml de las aguas fue más alto de lo que se considera adecuado para el uso recreacional, aunque los coliformes en los líquidos y las carnes fue en general mucho más bajo. No se logró el aislamiento de ningún agente citopatogénico, pero encontramos que la concentración de nitratos y sulfatos de las muestras fue mayor a lo aceptable para consumo humano. La toxicidad intrínseca de las muestras en cultivos celulares fue de una dilución de 1/8 aunque algunas muestras mostraron toxicidad a una dilución de 1/128. Los líquidos fueron más tóxicos que las carnes pero no se encontró una correlación entre la toxicidad en cultivos celulares y la toxicidad química: aparentemente otros contaminantes no identificados en este trabajo fueron los responsables. Se analizó la habilidad de los líquidos y las carnes de inactivar 10 DI<sub>50%</sub> de poliovirus demostrando que los líquidos y las carnes con más toxicidad en cultivos celulares fueron

los que mostraron un porcentaje mayor de inactivación del poliovirus. Se recomienda la vigilancia de la contaminación química de estas aguas.

## REFERENCIAS

- Anónimo. 1991. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, D.C. p. 4-6 - 4-8.
- Anónimo. 1991. Centers for Disease Control. Gastroenteritis associated with consumption of raw shellfish-Hawai, Morbid. Mortal Weekly Rep. 40:303-305.
- Anónimo. 1993. WHO. Guidelines for drinking-water quality. WHO, Vol 1, 2 Ginebra, Suiza. p. 8-20:39-93.
- Araya G. & S. Rodríguez. 1984. Relación entre la contaminación del agua de los y los bivalvos del Estero de Puntarenas. Tesis de Grado. Universidad de Costa Rica, San José. p. 79.
- Atmar R., T.G. Metclaf, H.F. Neill & M.K. Estes. 1993. Detection of Enteric Viruses in Oysters by Using the Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59:631-635.
- Cabalceta G. 1997. Presencia de Residuos de Especies Químicas Claves en los Suelos. Centro de Investigación en Contaminación Ambiental, Universidad de Costa Rica, San José.
- Campos J.A., M.L.Fournier & R. Soto. 1990. Estimación de la población de *Andara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Sierpe-Térraba, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 38:477-480.
- Chai T-J., T-J. Haw & R. Calley. 1994. Microbiological quality of shellfish growing waters Cheaspeake Bay. J. Food Pollution 57:229-234.
- Danies C., J. Lang, M. Donald & J.N. Ashbal. 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and fresh water sediments. Appl. Environ. Microbiol. 61:1888-1896.
- Dsenclos J.C.A., K.C. Klontz, M.H. Wilder, O.V. Nainan, H.S. Margolis & R.A. Gunn. 1991. A Multistate Outbreak of Hepatitis A caused by the consumption of Raw Oysters. Am. J. P. Health 81:1268-1272.
- Fernández B., T. Bruncker & C. González. 1971. Calidad Sanitaria de las Aguas de la Playa de Puntarenas. Acta Med. Cost. 14:91-100.
- Fernández B. & T. Bruncker. 1977. Estudio bacteriológico de bivalvos del Golfo de Nicoya, Costa Rica. Condición del molusco recién recolectado. Rev. Biol. Trop. 25:101-107.
- Forghani, B. 1979. Radioimmunoassay, p. 171-189. In E.H. Lennette & N.J. Schmidt (eds.). Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. American Public Health Association, Washington DC, p. 171-189.
- Frampton E.W. & L. Restaino. 1993. A review. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water, and clinical samples based on beta- glucoromidasasa detection. J. Appl. Bacteriol. 74:223-233.
- Gaswami B.B., G. Siege & T.A. Celula. 1993. Detection of hepatitis A in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase using reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2765-2770.
- Goyal S.M., Ch.P. Gerba & J.L. Melnick. 1979. Human Enterovirus in Oysters and Their overlying Waters. Appl. Environ. Microbiol. 37: 572-581.
- Larkin E.P. & D.A. Hunt. 1982. Bivalve mollusks: control of microbiological contaminants. Bioscience 32:193-197.
- Le Guyader F, V. Afaire-Marchais, J. Brillej & S. Billaudel. 1993. Use of genetic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. Appl. Environ. Microbiol. 59:3963-3968.
- Lewis G.D. & T.G. Metcalf. 1988. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. Appl. Environ. Microbiol. 54:1983-1988.
- Martínez E., F. Egea, D. Castro, M. Morinigo, P. Romero & J. Barrigo. 1991. Accumulation and depuration of pathogenic and indicator microorganisms by the mollusk *Chamelea gallina*, under controlled laboratory conditions. J. Food Protection. 54:612-618.
- McNeely R.N. V.P. Neimanis & L. Dwyer. 1979. Water Quality Sourcebook. A Guide to Water Quality Parameters. Inland Waters Directorate. Water Quality Branch, Ottawa, Canada. p. 17-57.
- Melnick J.L. 1995. Enteroviruses: polioviruses, coxsackies, ECHOs and newer enteroviruses, p. 665-712. In B.N. Fields (ed). Virology. Lippincott-Raven. Filadelfia, Pensilvania.



- Metcalf T.G. 1978. Indicators of Viruses and Food, G. Berg. (ed) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan. p. 383-415.
- Metcalf T.G., E. Moulton & D. Eckerson. 1980. Improved Method and test Strategy for Recovery of Enteric Viruses from Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:141-152.
- Murphy A.M., G.S. Grohmann, P.J. Christopher, W.A. Lopez, G.R. Davey & R.H. Millsom .1979. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norkwalk virus. *Med. J. Aust.* 2:329-333.
- Palacios J.A. 1998. Desarrollo de un método de alta sensibilidad para la detección de VHA/ARN en *Anadara tuberculosa* y su relación con índices de contaminación fecal. Tesis de Licenciatura, Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, San José.
- Raloff J. 1998. Drugged Waters. Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? *Sci. News* (21 marzo): 187-189.
- Rao V.C., K.M. Seidel, S.M. Goyal, T.G. Metcalf & J.L. Melnick. 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorb into sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:404-409.
- Richards G.P., D.L. Goldmintz, D.L. Green & J.A. Babinchak. 1982. A Rapid Method for Extraction and Concentration of Poliovirus from Oyster Tissues. *J. Virol. Meth.* 5:285-291.
- Ruiz M. & D. Mora. 1993. Inventario de fuentes terrestres de contaminación sobre el Estero de Puntarenas. San José. VI certamen Bienal en Ciencia y Tecnología SI-PAA. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, San José.
- Sobsey M.D., R.J. Carrick & H.R. Jensen. 1978. Improved Methods for Detecting Enteric Viruses in Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:121-128
- Scott R., L. Chandler & W. Watkins. 1987. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in shellfish. *J. Food Protection* 50:685-690.
- Vaughn J.M., E.F. Landry, T.J. Vicale & M.C. Dahl. 1979. Modified procedure for the recovery of naturally accumulated poliovirus from oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:594-598.
- Villalobos C. & B. Fernández. 1988. Contaminación microbiana en moluscos bivalvos de importancia comercial, agua y sedimento en el Golfo de Nicoya. Informe final presentado al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.
- Wanke C.A. & R.L. Guerrant. 1987. Viral hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water. *Inf. Dis. Clin. N.* 1:649-664.