

DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS F+ ESPECÍFICOS COMO INDICADORES DE ENTEROVIRUS EN EL CHORO (*Aulacomya ater*)¹

Milagros Miranda C.² y César Pizardi D.³

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aplicar el método de la norma ISO 10705 – 1: 1995 para determinar si el choro (*Aulacomya ater*) es un molusco que está libre de patógenos virales al momento de su venta al público en los terminales pesqueros y algunos mercados de abasto en Lima. Las muestras utilizadas fueron las vísceras y el manto del choro. La metodología empleada fue la recomendada por la norma ISO 10705-1:1995, la cual consistió primero en la preparación de los cultivos madre y de trabajo de la cepa hospedadora *Salmonella typhimurium* WG49, detección y enumeración de bacteriófagos ARN F+ específicos a la cepa. El bacteriófago fue detectado únicamente en las muestras provenientes del terminal pesquero de Ventanilla, con una mayor concentración en las vísceras (6000 a 10000 uff) que en el manto (800 a 1400 uff).

Palabras claves : bacteriófagos, virus entéricos, *Aulacomya ater*, *Salmonella typhimurium* WG49.

ABSTRACT

The purpose of this project was to apply the ISO 10705 – 1: 1995 standard method to determine whether the mussel (*Aulacomya ater*) is a mollusk that is free of viral pathogens at the time it is sold to the public at the Lima fishing ports and some wholesale fresh food markets. As samples we used the mussel viscera and mantle. The methodology employed was the one recommended by the ISO 10705-1:1995 standard, which consisted in the preparation of the master culture and working culture of the strain hosting the *Salmonella typhimurium* WG49, the detection and enumeration of the strain F+ specific RNA bacteriophages. The bacteriophage was detected only in the samples obtained at the Ventanilla fishing port, showing that the concentration in the viscera (6000 to 10000 pfu) was higher than in the mantle (800 to 1400 pfu).

Keywords : bacteriophage, enteric viruses, *Aulacomya ater*, *Salmonella typhimurium* WG 49

INTRODUCCIÓN

El choro al ser de gran importancia comercial en el país requiere como otros moluscos destinados a consumo, de un control microbiológico que contribuya a minimizar la transmisión de virus entéricos por vía alimentaria. El choro (*Aulacomya ater*), al igual que todo molusco filtra grandes cantidades de agua para alimentarse de toda la materia que ésta lleva en suspensión, entre la que puede encontrarse microorganismos patógenos. Además, poseen una gran capacidad de concentración (logran concentraciones 1000 veces superiores a las del agua exterior) convirtiéndose en peligrosos portadores de agentes infecciosos.

El monitoreo de la contaminación viral del agua y alimentos como los moluscos debería ser realizada pero es impracticable debido a lo complejo de las técnicas y el largo tiempo de análisis y el alto costo. Además, algunos virus entéricos epidemiológicamente importantes son incultivables

(Norwalk) o ineficientemente cultivables (hepatitis A). Por esta razón, se hace necesario encontrar indicadores confiables, rápidos y económicos para detectar contaminación fecal para virus entéricos y otros patógenos en agua, moluscos y otros alimentos.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aplicar el método de la norma ISO 10705 – 1:1995 para detectar y enumerar bacteriófagos F+ específicos como indicadores indirectos de enterovirus en choros en los terminales pesqueros de Ventanilla, Villa María y algunos mercados de abasto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos y medios de cultivo se prepararon de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 10705 – 1: 1995 (1), los materiales y equipos utilizados fueron los necesarios para el desarrollo del presente trabajo experimental.

Preparación de las muestras

Los choros utilizados fueron adquiridos en los terminales pesqueros de Villa María, Ventanilla y algunos mercados de abasto.

Los procedimientos utilizados en la preparación de las muestras fueron los recomendados en la bibliografía (2,3).

Las valvas de los choros se lavaron con agua potable y ayuda de una escobilla. Se descartaron los que se encontraron abiertos o no respondieron con el abrir y cerrar de las valvas ante cualquier tipo de estímulo. Luego se abrieron asépticamente con un cuchillo flameado para separar las vísceras del manto.

Las muestras de manto y vísceras fueron pesadas por separado (30 choros aproximadamente) hasta obtener un peso referencial de 100 gramos para cada muestra.

En los mercados de abasto y el terminal pesquero de Chorrillos se proce-

¹ Trabajo realizado en el laboratorio de virología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la UNMSM. ² Ingeniera Pesquera ³ M.Sc. Facultad de Pesquería UNALM

dió a analizar las muestras por duplicado y en los terminales pesqueros de Villa María y Ventanilla se consideró analizar por su tamaño en grandes y pequeños dado su tipo de venta, obteniéndose un total de 26 muestras de manto y 26 muestras de vísceras durante todo el período de investigación.

Luego cada muestra fue homogeneizada en una licuadora con un volumen de \pm 100 ml de agua peptonada al 0.1% a la cual se le adicionó previamente 0.5 ml de Tween 80.

El homogeneizado fue sometido a centrifugación refrigerada a 5000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante se utilizó para la búsqueda del fago F+ específico.

Todo el proceso, desde la adquisición hasta la siembra se realizó el mismo día, manteniendo las muestras de manto, vísceras y reactivos en refrigeración o en baño de hielo.

Cultivo y mantenimiento de la cepa hospedadora *Salmonella typhimurium* WG49

Todos los procedimientos se realizaron según la norma ISO 10705-1:1995 (1), considerando además el control de calidad de la cepa y sus criterios de aceptabilidad.

Determinación de bacteriófagos

Muestras del manto y vísceras de choros fueron analizadas para la detección y enumeración de bacteriófagos ARN F+ específicos con la presencia de la cepa hospedera WG49 *Salmonella typhimurium* fago tipo 3 Nal (F'42 *lac*::Tn5), NCTC 12484 de acuerdo con el método de la norma ISO 10705-1:1995 (1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los choros fueron adquiridos vivos en los diferentes puntos de venta porque en estas condiciones estos moluscos bivalvos son considerados de máxima calidad debido a que se está ingiriendo un alimento con el máximo nivel de frescura posible. Desde este último punto de vista, algunas de sus características justifican un nivel de riesgo muy elevado por varios motivos: se alimentan por filtración, se encuentran en contacto con el fondo o lodos y se pueden consumir crudos (4).

Los moluscos por su tipo de alimenta-

ción se comportan como concentradores virales naturales, pero esta bioacumulación es pasiva, sin replicación del virus en el interior del molusco (5).

En consecuencia, se debe tener en cuenta que si una proporción, más o menos importante, de las personas que forman parte de la población general son portadoras de microorganismos como *Salmonella*, *Campilobacter* o el mismo virus de la hepatitis A, estos microorganismos pasarán al agua de cultivo y de aquí se acumularán en los moluscos bivalvos (4).

La metodología utilizada para la detección del fago es la mencionada en la norma ISO 10705 – 1: 1995 (1) en donde se utiliza como huésped a la cepa WG49 *Salmonella typhimurium*. La cepa WG49 fue genéticamente modificada por la inserción de un plasmidio codificado para la producción de F-*pilus* dentro de él. Esto produce una bacteria hospedera la cual es susceptible a bacteriófagos ARN F+ la cual puede ser utilizada como hospedera de fagos de organismos patógenos y, como consecuencia, lo hace un procedimiento confiable (3,6).

Se tomaron muestras de cinco mercados de abasto y del terminal pesquero de Chorrillos durante el mes de agosto en donde se observó que las condiciones higiénicas no eran las más adecuadas no sólo por presencia de lodo en las valvas sino también por la presencia de animales domésticos, además de poca iluminación, a pesar de lo cual las pruebas para la detección del fago dieron negativo.

En el terminal pesquero de Villa María a fines del mes de agosto y mediados de setiembre se observó en cuatro fechas que los choros se comercializaban con presencia de lodo en las valvas y que su venta se realizaba a pocos centímetros del suelo donde se suele estancar el agua determinándose también resultados negativos al fago.

Cuando se comenzó a tomar muestras en el terminal pesquero de Ventanilla se observaron las mismas condiciones de higiene que en el terminal pesquero de Villa María reportándose resultados negativos tanto en vísceras como en manto para la primera fecha más no así en las siguientes dos fechas en donde se detectó la presencia del fago.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados positivos y negativos del total del número de muestras.

	Numero de muestras	
	Manto	Vísceras
Positivo	4	4
Negativo	22	22
Total	26	26

Resultados de la determinación de fagos ARN F+ en choros

Al respecto se menciona que salvo algunas excepciones, todos los casos registrados de infecciones virales transmitidas por productos pesqueros, se han debido al consumo de moluscos crudos o poco cocidos. No obstante, existen pruebas claras de que el VHA se ha transmitido por medio de prácticas antihigiénicas durante la elaboración, distribución o manipulación de alimentos (7).

La formación de placas de (lisis de la cepa bacteriana) es decir la presencia de bacteriófagos ARN F+ en choros indicó que estuvieron expuestos a contaminación fecal ya sea en las áreas de cultivo o en algún punto de la cadena de comercialización.

El método empleado permitió, además de determinar cualitativamente la presencia de fagos, determinar la cantidad de partículas virales haciendo el recuento de las unidades formadoras de fagos (uff) por unidad de peso de tejido de molusco (100 g). Se cuantificaron solamente las muestras que dieron positivo cualitativamente o sea en las procedentes del terminal pesquero de Ventanilla.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados obtenidos en la enumeración de fagos

Muestras	Manto (uff)	Vísceras (uff)
T.P.V (13/09/02) Choros pequeños	800	6000
T.P.V (13/09/02) Choros grandes	1200	9000
T.P.V (20/09/02) Choros pequeños	800	5000
T.P.V (20/09/02) Choros grandes	1400	10000

Número de placas de lisis por 100 g de muestra en pruebas positivas al fago. T.P.V : Terminal Pesquero de Ventanilla

Se observa que, tanto el manto como las vísceras, dieron positivo, cuantitativamente en las vísceras el número

de fagos fue mucho mayor que en el manto, como citan otros autores en donde los resultados indicaron que las muestras de vísceras, debido al tipo de alimentación del molusco, retienen un mayor número de partículas virales (3).

El método utilizado en el presente

trabajo no sólo serviría como un método rápido para monitorear los diferentes procedimientos (como el de depuración) utilizados para eliminar los virus contaminantes sino, también, como un control para los moluscos como el choro que se encuentran listos para la venta al consumidor.

Al utilizar esta metodología se controlaría de una mejor manera las condiciones sanitarias y de esta forma disminuir el riesgo de enfermedades de tipo viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. International Standard Organization. ISO 10705-1 : 1995 , Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 1: Enumeration of F – specific RNA bacteriophages. 11p.
2. Doré, W. y Lees, D. Behavior of *Escherichia coli* and male-specific. bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. Appl. Environ. Microbiol. 1995 ; N°8. 61:2830-2834.
3. Doré, W. ; Henshilwood, K. y Lees, D. Evaluation of F-Specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 2000 ; N°4. 66:1280-1285.
4. Rodríguez, J. Riesgos asociados a los moluscos bivalvos.2002;Se consigue en URL: www.consumaseguridad.com/web/es/investigación/2002/01/30/665.php.
5. Romalde, J. Contaminación viral de moluscos: El caso del virus de la hepatitis A. 2002; Se consigue en URL: http://www.colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/salud_publica.htm.
6. Havelaar, A.; Hogeboom, W. y Pot, R. A method for the enumeration of male –specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bact. 1984; 56:439-447.
7. Huss, H. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros FAO. 1997; N° 334. Roma. 174p.