

EL CANAL Gamaser

Novedades

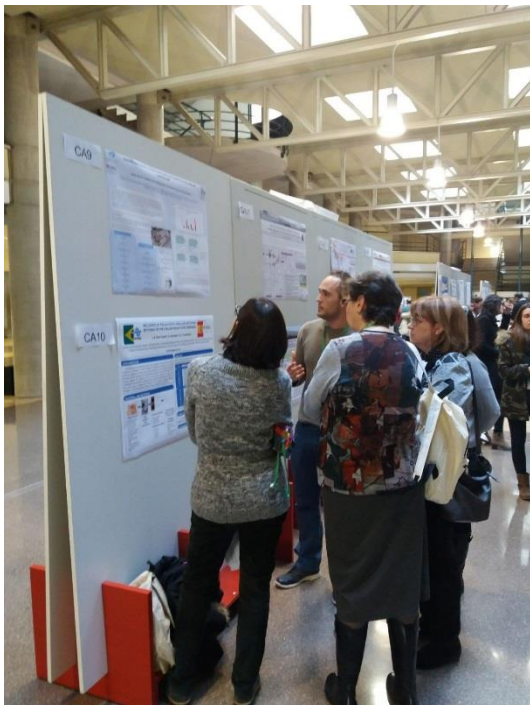
22 . Febrero . 2018

/.2018

Gamaser muestra su proyecto de investigación en el Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA ACOGE A ESTUDIANTES, EMPRESAS Y EQUIPOS DE I+D PROCEDENTES DE TODO EL MUNDO EN LA CUARTA EDICIÓN DEL ENCUENTRO. PARTICIPAR EN ÉL HA SIDO UNA EXPERIENCIA MAGNÍFICA.

Queremos agradecer la presencia de GAMASER en estas jornadas a Joaquín Piqueras, postgraduado en investigación de biología celular, molecular y genética por la Universidad de Valencia. Joaquín ha defendido el proyecto desarrollado en el laboratorio de GAMASER y en colaboración con el IATA-CSIC, bajo el título de *Method implementation to detect human Norovirus and Hepatitis A virus in sewage and reclaimed water*.



Joaquín Piqueras defendiendo el proyecto.


Uno de los usos sostenibles de las aguas residuales es su destino hacia riego y otros procesos industriales. Sin embargo, estas aguas contienen virus no detectados hasta ahora por procedimientos microbiológicos que requieren un control. El proyecto llevado a cabo en el laboratorio de GAMASER desarrolla un método de detección de estos virus presentes en aguas residuales a través de RT-qPCR, una herramienta de biología molecular.



EL CANAL Gamaser

Con esta técnica se consigue identificar y cuantificar virus no solo en aguas sucias, también en aguas de consumo humano y alimentos sólidos.


Gracias a todos por colaborar y desarrollar trabajos para el bien común.



Method implementation to detect human Norovirus and Hepatitis A virus in sewage and reclaimed water

Joaquín Piqueras^{1,2}, Guadalupe Sastre³, Walter Randazzo^{1,3}, Gloria Sánchez³, Raquel Sancho², Carina Gonzalez²

¹ University of Valencia. Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot. Valencia, Spain; ² GAMASER, Isaac Peral, 4. 46980 Paterna. Valencia, Spain; ³ Department of Preservation and Food Safety Technologies, IATA-CSIC, Av. Agustín Escardino 7. 46980 Paterna. Valencia, Spain



Introduction

Due to water scarcity, many countries are using reclaimed water from urban sewage as irrigation water, to save their water resources and sustain agriculture. If sewage treatment is not efficient enough, reclaimed water may contain some human pathogenic microorganisms, such as bacteria, helminths or enteric viruses. Therefore microbiological assays to detect some of these human pathogens in Spanish wastewater treatment plants (WWTP) are mandatory (RD 1620/2007). Nevertheless, the most common enteric viruses such as human noroviruses (NoV) or hepatitis A virus (HAV) are not detected by these assays, because so far there is not available any standardized method for their detection in water.

At the present time, quantitative RT-PCR (RT-qPCR) assay is the most effective method for enteric RNA virus detection and quantification in water and food samples. This study aims to detect and quantify NoV and HAV in several Valencian WWTP and to implement a virus detection method in sewage and reclaimed water at GAMASER laboratory using RT-qPCR.

Materials and methods

Two different types of water samples, Sewage and reclaimed water, were taken from several Valencia WWTP, which performed a secondary treatment for all reclaimed water samples, while only 2 of them received a tertiary treatment with UV radiation.

Two different water concentration methods were tested, using mengovirus as a process control: Aluminum concentration method (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) and Ultracentrifugation concentration method (Rodríguez-Díaz, J. et al.).

Aluminum concentration method

- 35 mL water
- Adjust to PH = 6
- Add 10 µL Mengovirus 1/10
- 350 µL AlCl₃ 0,9 N
- 150 rpm (15 min)
- 1700 x g (20 min)
- 1,75 mL Beef extract
- 150 rpm (10 min)
- 1500 x g (30 min)
- Resuspended into 1 mL PBS


Ultracentrifugation concentration method

- 35 mL Water
- 140000 x g (150 min 4°C)
- 5 mL 0,25M glycine buffer ice incubation (30 min)
- 5 mL 2 phosphate buffered saline
- 12000 x g (15 min)
- 229500 x g (60 min 4°C)
- Resuspended into 500 µL PBS

Inhibitors pretreatment: 25 µL Plant RNA

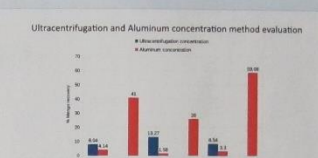
RNA extraction: NucleoSpin® RNA virus kit (Macherey-Nagel GmbH & Co.)

RNA amplification: One step RT-qPCR (Light Cycler 2.0)



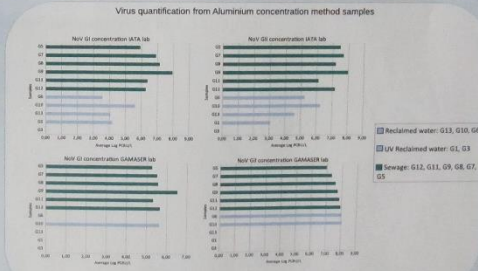
Results

Ultracentrifugation and Aluminum concentration method evaluation



Sample	Aluminum concentration	Ultracentrifugation
SG1	0,04	0,04
SG2	0,04	0,04
SG3	0,04	0,04
SG4	0,04	0,04
SG5	0,04	0,04
SG6	0,04	0,04
SG7	0,04	0,04
SG8	0,04	0,04
SG9	0,04	0,04
SG10	0,04	0,04
SG11	0,04	0,04
SG12	0,04	0,04
SG13	0,04	0,04
SG14	0,04	0,04
SG15	0,04	0,04
SG16	0,04	0,04
SG17	0,04	0,04
SG18	0,04	0,04
SG19	0,04	0,04
SG20	0,04	0,04
SG21	0,04	0,04
SG22	0,04	0,04
SG23	0,04	0,04
SG24	0,04	0,04
SG25	0,04	0,04
SG26	0,04	0,04
SG27	0,04	0,04
SG28	0,04	0,04
SG29	0,04	0,04
SG30	0,04	0,04
SG31	0,04	0,04
SG32	0,04	0,04
SG33	0,04	0,04
SG34	0,04	0,04
SG35	0,04	0,04
SG36	0,04	0,04
SG37	0,04	0,04
SG38	0,04	0,04
SG39	0,04	0,04
SG40	0,04	0,04
SG41	0,04	0,04
SG42	0,04	0,04
SG43	0,04	0,04
SG44	0,04	0,04
SG45	0,04	0,04
SG46	0,04	0,04
SG47	0,04	0,04
SG48	0,04	0,04
SG49	0,04	0,04
SG50	0,04	0,04
SG51	0,04	0,04
SG52	0,04	0,04
SG53	0,04	0,04
SG54	0,04	0,04
SG55	0,04	0,04
SG56	0,04	0,04
SG57	0,04	0,04
SG58	0,04	0,04
SG59	0,04	0,04
SG60	0,04	0,04
SG61	0,04	0,04
SG62	0,04	0,04
SG63	0,04	0,04
SG64	0,04	0,04
SG65	0,04	0,04
SG66	0,04	0,04
SG67	0,04	0,04
SG68	0,04	0,04
SG69	0,04	0,04
SG70	0,04	0,04
SG71	0,04	0,04
SG72	0,04	0,04
SG73	0,04	0,04
SG74	0,04	0,04
SG75	0,04	0,04
SG76	0,04	0,04
SG77	0,04	0,04
SG78	0,04	0,04
SG79	0,04	0,04
SG80	0,04	0,04
SG81	0,04	0,04
SG82	0,04	0,04
SG83	0,04	0,04
SG84	0,04	0,04
SG85	0,04	0,04
SG86	0,04	0,04
SG87	0,04	0,04
SG88	0,04	0,04
SG89	0,04	0,04
SG90	0,04	0,04
SG91	0,04	0,04
SG92	0,04	0,04
SG93	0,04	0,04
SG94	0,04	0,04
SG95	0,04	0,04
SG96	0,04	0,04
SG97	0,04	0,04
SG98	0,04	0,04
SG99	0,04	0,04
SG100	0,04	0,04

Virus quantification from Aluminum concentration method samples



Conclusion

A minimum recovery of 1% mengovirus (ISO 15216:2017) was obtained for all samples using both concentration methods, thus validating the results. In conclusion, both methods are valid and show that human enteric virus circulate in sewage and reclaimed water from several Valencian WWTP, which has the potential to contaminate water used for agricultural irrigation, highlighting the relevance for the implementation of a virus detection method at GAMASER laboratory.

References

Rodríguez-Díaz, J., Querol, L., Carballal, L., Viret, E., Soriano, F., Nave, A., & Basteros, M. G. (2008). Detection and characterization of waterborne gastroenteric viruses in urban sewage and sewage-polluted river water in Galicia, Northwest Spain and environmental monitoring. *Water, Air, and Soil Pollution*, 142, 343-350.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Edition of American Public Health Association.

ISO 15216:2017. Microbiology of Food and Animal Feed — Horizontal Method for Determination of Hepatitis A Virus and Norovirus in Food Using Real-time RT-PCR.

Póster presentado en el Congreso.

