



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA**

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO AMBIENTAL DE  
ENTEROVIRUS EN EL DISTRITO FEDERAL, MEXICO.**

**T E S I S**

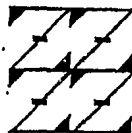
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

**B I O L O G O**

P R E S E N T A N :

**LAURA DEL AGUILA MORA  
LUCILA TAPIA MARTINEZ**

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**LO HUMANO  
ES  
DE NUESTRA REFLEXION**

**C.N.E.P. - ZARAGOZA - U.N.A.M.**



**México, D.F.**

**DIVISION DE CIENCIAS  
QUIMICO-BIOLÓGICAS  
COORDINACION DE BIOLÓGIA  
CAMPO 2**

**1993**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

GLOSARIO.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
HIPOTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	8
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACION.....	13
AREA DE ESTUDIO: .....	15
. UBICACION.....	15
. DESCRIPCION.....	15
. MAPA DE LOCALIZACION.....	20
TRABAJO DE CAMPO.....	21
TRABAJO DE LABORATORIO.....	22
RESULTADOS Y ANALISIS:.....	23
TABLAS Y GRAFICAS.....	29
. TABLA 1.....	30
. GRAFICAS.....	32
CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	40
APENDICES Y ANEXOS.....	42
APENDICES.....	41

<b>ANEXO 1. METODO PARA CONCENTRACION DE VIRUS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 2. TECNICA DE CONCENTRACION DE VIRUS POR ADSORCION A FILTROS POSITIVOS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 3. TECNICA DE CULTIVO CELULAR.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 4. METODO DE CONTEO CELULAR.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 5. TECNICA PARA EL CONGELAMIENTO DE CELULAS Y CONTEO CELULAR.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 6. DESCONGELAMIENTO DE CELULAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 7. FUNDAMENTO DE LOS METODOS PARA LA DETECCION DE VIRUS EN MUESTRAS CONCENTRADAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 7.1 DETECCION DE VIRUS POR EL METODO DE ENSAYO EN TUBO.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 7.2 TECNICA DE ENSAYO EN TUBO CON CELULAS VERO, HEP2C Y RD.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 8. TITULACION DE VIRUS POR EL METODO DE DOSIS INFECTIVA PARA CULTIVO DE TEJIDOS AL 50% (DICT50%).....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 8.1 TECNICA DE TITULACION DE VIRUS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO 9. METODO DE SPEARMAN-KARBER.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 10. IDENTIFICACION DE ENTEROVIRUS POR NEUTRALIZACION (BATERIAS DE MELNICK).....</b>	<b>67</b>
<b>CITAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>69</b>

## GLOSARIO

**ADSORCION:** Es una propiedad física que se dá por atracciones electrostáticas, dependiendo del pH y del medio en que se sus penden los virus.

**ANTISUERO:** Suero sanguíneo que contiene anticuerpos.

**BATERIAS DE MELNICK:** Antiseros utilizados para la identificación de enterovirus.

**BIOENSAYO:** Infección de muestras con material in-vivo.

**CAMARA DE NEUBAUER:** Hemocitómetro de uso común

**CAPSIDE:** Envoltura protéica simétrica que encierra el ARN.

**COXSACKIE, POLIO Y ECHO:** Se describen como enterovirus.

**CRIOPROTECTOR:** Son sustancias que protegen la capa celular a bajas temperaturas, ejemplo: Glicerol, Dimetilsulfóxido, Glucosa, Suero Fetal Bovino etc.

**DICT50%:** Dosis infectiva al 50% (capacidad que tienen los virus de poder infectar el 50% de los cultivos celulares).

**DGCOH:** Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica.

**EFEECTO CITOPATICO:** Muerte celular.

**ELISA:** Es una prueba de inmunoensayo que se basa en anticuerpos virales que se adsorben a superficies sólidas. Y se detecta en concentraciones de 10 a la 6 partículas virales por mililitro.

**ELUCION:** Proceso en el cual los virus se despegan del filtro.

**ENTEROVIRUS:** Grupo de virus que se clasifican en la familia Picomaviridae porque han sido encontrados en los intestinos y excretados en la materia fecal.

**EXTRACTO DE CARNE:** Sustancia proteica que sirve para la elución de los virus.

**FLOCULACION:** Proceso en el cual el eluyente forma el precipitado de la proteína en la que se envuelve el virus.

**HEP 2C:** Células de carcinoma epidermoide de laringe humana, sensibles a enterovirus.

**IN VITRO:** Experimentar fuera de las condiciones del ambiente natural del organismo.

**IN VIVO:** Experimentar en las condiciones naturales del organismo.

**LBM:** Lym-Benyesh-Melnick (Batería para la identificación de enterovirus)

**LEIBOVITZ (L-15):** Medio Especial para el crecimiento celular. En ausencia de CO<sub>2</sub>.

**MEM 10x:** Medio para el crecimiento celular concentrado 10 veces.

**MEM 199:** Medio de crecimiento para las células, el cual contiene sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas.

**MEM RPM I:** Otro medio menos rico que el anterior.

**MICROPLACA:** Material de 96 pozos utilizado en la identificación de virus.

**NEUTRALIZACION:** Proceso por el cual los virus pueden ser inactivados.

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud.

**PATOGENICIDAD:** Capacidad de producir una enfermedad.

**POOL:** Mezcla de diferentes precipitados para infectar un nuevo cultivo.

**RD:** Células de rhabdomyosarcoma embrionario humano que son sensibles a enterovirus (específicamente a Polio Tipo 3).

**REVCO:** Ultracongelador que mantiene viables a las células y a los virus a - 70 grados centígrados.

**SEROTIPO:** Tipo de virus identificado en presencia de sueros específicos.

**SFB:** Suero Fetal Bovino.

**TITULO VIRAL:** Dosis mínima requerida para producir efecto citopático al 50% de los cultivos inoculados.

**VIRION:** Partícula viral completa con capacidad infectante.

**VIRULENCIA:** Capacidad que poseen los virus para poder infectar.

## RESUMEN

Se realizó un estudio ambiental sobre la supervivencia de enterovirus en el Distrito Federal, utilizando muestras de polvo y lluvia, durante el período de enero a octubre de 1991, cubriendo un total de 10 colectas (una en cada mes) en 5 colonias del Distrito Federal.

El objeto de este estudio fué establecer la variación enteroviral ocurrida en cada estación del año, así como la posible influencia del viento. De entre los resultados destacan las DICT50% que fluctuaron entre 10 exponente 0.625 y 10 exponente 3.375, observándose una mayor variación en las épocas de Invierno y Verano, siendo éstas de bajas y altas temperaturas respectivamente; se comprueba también que la distribución de enterovirus en el Distrito Federal no es uniforme, y no está determinada por la dirección de los vientos únicamente, si no que influyen factores como la temperatura, el lavado de contaminantes por la lluvia y presencia de tiraderos a cielo abierto; como en el sitio Oriente de la Ciudad que arrojó un valor de DICT50% mayor que todos los demás (10 exponente 3.375), debiéndose este hecho a que la colecta se realizó donde existen basureros clandestinos, de ahí que se infiere una mayor contaminación biológica en dicho sitio.

Por último la temperatura es el factor físico-ambiental que determina la presencia de enterovirus, ya que existe una relación entre las estaciones frías y calientes y la variación de éstos. Se pudo constatar que los enterovirus son proclives a variar con la temperatura del ambiente.

Se puede discernir que una Dosis Infecciosa en cultivo de tejidos al 50% (DICT50%) mayor que la reportada en este trabajo puede producir infecciones en el ser humano. Por consiguiente, existe baja patogenicidad en el ambiente, pero puede causar enfermedad dependiendo de su virulencia.

## INTRODUCCION

Los virus son partículas infecciosas capaces de hospedarse en células para sobrevivir y tan pequeños (10-20 nm.), que pueden atravesar los poros de los filtros que impiden el paso de las bacterias. A los virus se les clasifica de acuerdo al tipo de ácido nucleico, tamaño, forma, susceptibilidad, agentes químicos y forma de replicación. Existe una gran variedad de virus, pero sólo nos ocuparemos de los ENTEROVIRUS, que pertenecen a la familia Picornaviridae; que comprenden tres géneros:

- 1).- Enterovirus.
- 2).- Rhinovirus.
- 3).- Calicivirus.

Estos géneros se caracterizan por poseer cápside con simetría icosaédrica de 20% a 30%, contienen RNA en su genoma, PM de  $2.5 \times 10^6$  a la  $6 \times 10^6$  a la 6 daltons, diámetro de 30 a 40 nm. y son resistentes al éter.

En este trabajo se estudiará a los enterovirus, que son considerados como virus entéricos por entrar al hospedero por vía oral-fecal, se replican en las células del tracto digestivo y son excretados en las heces fecales; así como habitantes transitorios del aparato digestivo humano, y causan enfermedades al hombre. (27).

El grupo de enterovirus comprende los siguientes tipos de virus:

- Poliovirus ( 3 serotipos ).
- Coxsackievirus A ( 24 serotipos ).
- Coxsackievirus B ( 6 serotipos ).
- Echovirus ( 34 serotipos ).

Son causantes de enfermedades como la poliomiélitis, meningitis, infecciones respiratorias y enfermedades gastro-intestinales entre otras. (32).

Siendo entéricos en su hábitat los enterovirus se transmiten principalmente por las vías oral-fecal en medios



insalubres, pero también se cree que puede haber diseminación por aerosoles. (33).

La contaminación fecal directa de las manos y de ahí a los alimentos o a utensilios de cocina es probablemente responsable de la mayoría de los contagios caso a caso. (10,18).

Durante las epidemias muchas especies de moscas pueden servir como portadores mecánicos de los virus y así contaminar alimentos y agua que puede ser consumida por individuos susceptibles. (10,39).

Los poliovirus por ejemplo están diseminados mundialmente, especialmente en países en vías de desarrollo, incluyendo a México. Históricamente el serotipo 1 ha sido el más común, pero el tipo 3 se ha hecho más prominente desde la introducción de la vacuna de Sabin. (2,20,21).

Cerca del 90% de las infecciones en Norteamérica y Europa Occidental son causadas por el poliovirus tipo 1 y esporádicamente por el tipo 3. El serotipo 2 es el menos diseminado, pero se ha visto que en áreas del Medio Oriente, han causado infecciones severas. (10,18).

En los trópicos, la enfermedad es endémica durante todo el año, en países templados antes de la introducción de la vacuna, ocurría en forma clásica como epidemia de verano. El hecho de que ocurran casos esporádicos en invierno, indica la posibilidad de que el virus pueda también propagarse por las vías respiratorias. (10,18).

Los echovirus y coxsachievirus poseen características físico-químicas, biológicas y epidemiológicas similares a las de los virus Polio y comparten la propiedad de afectar al tubo digestivo del hombre.

En la actualidad el término enterovirus, designado originalmente para estos grupos de virus, ya no es muy apropiado, ya que se ha encontrado que ciertos virus Coxsackie y Echo causan también infecciones respiratorias agudas. (10,35,43). (Ver cuadro 1).

CUADRO # 1

## ENFERMEDADES CAUSADAS POR ENTEROVIRUS.

SINDROME	COMUNES	POCO COMUNES
Paralisis	Poliovirus 1,2,3	Coxsackie A (2,4,7,9) Coxsackie B (1,2,3,4,5) Echovirus (1,2,4,6,9,11,13,20)
Meningitis Aséptica	Echovirus (4,6,9,11,14,16) Coxsackie A (7,9,23) Coxsackie B (1,6)	Coxsackie A(16,18,19,11)
Encefalitis	Enterovirus 71 Coxsackie B5	Echovirus (9,14,19) Coxsackie A(2,4,6,8,9,18)
Encefalomiocarditis	Coxsackie B(1,5)	
Conjuntivitis hemorrágica aguda y radiculomielitis	Enterovirus 70	Enterovirus 71
Infecciones del Aparato Circulatorio alto	Coxsackie A(21) Echovirus (11,20)	Coxsackie A (10,24) Coxsackie B(2,5) Echovirus (4,8,9,22,25)
Neumonitis y bronquiolitis	Enterovirus 68	
Mialgia epidémica. (enfermedades de Bornholm)	Coxsackie B(7,15)	

Tomado de: Davis, B.D., Dulbeco, et al: Tratado de Microbiología, 2a. Ed., Salvat, 1983.(10).

Como se observa estos enterovirus pueden causar muchos síndromes clínicos.

Los enterovirus de los grupos Coxsackie y Echo, raras veces causan parálisis.

#### HIPOTESIS.

1).- La distribución de enterovirus en el D.F., no es uniforme.

2).- La distribución de enterovirus en el D.F., está determinada por la dirección de vientos.

3). Uno de los factores que influyen en la supervivencia de las partículas virales es el cambio de temperatura de las estaciones del año.

## OBJETIVOS

**GENERAL:** Determinar la variación estacional de enterovirus en muestras de polvo y lluvia en 5 colonias del D.F., en el período comprendido de Enero a Octubre de 1991.

### PARTICULARES:

1.-Determinar la variación de enterovirus y su relación con factores climatológicos (temporada de lluvias y dirección de vientos).

2.-Determinar la variación de enterovirus para cada estación del año.

3.- Aplicar la metodología para muestras de agua de rutina que se emplea en la DGCOH(Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica).

4.- Identificar con antisueros (Baterías de Melnick) el serotipo para cada sitio.

## ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios acerca de la supervivencia de enterovirus en el ambiente. En Estados Unidos, Canadá y otros países, se han hecho análisis tanto de aguas potables, residuales (servidas), aguas tratadas, ríos, suelos, aerosoles, aguas marinas, lixiviados, etc.

Feachem y Galelick (1982), en Londres Inglaterra, realizaron estudios en aguas superficiales, en cuerpos acuáticos en donde se vierten desechos orgánicos, y han encontrado de 100 a 620 virus entéricos por litro de agua analizada, observando mayor supervivencia en invierno.

Dichos autores indican que hay enterovirus que pueden sobrevivir durante meses, en aguas superficiales; pero a los pocos días suele haber una reducción del 90% al cabo de un mes y que el factor determinante de esta supervivencia es la temperatura. Spillman, et al en 1987, comprobó que a una temperatura de 20 grados se reduce la cantidad de enterovirus en un 99% durante el transcurso de 15 días.

Payment, et al en 1988 y 1989, realizaron un estudio en las aguas de los ríos y encontraron que las partículas virales pueden sobrevivir más tiempo debido a que éstas se adsorben en gran cantidad de partículas sólidas.

Rao, Ch., (1986), menciona que es probable que los enterovirus sobrevivan durante algunas semanas en letrinas y hasta aproximadamente tres meses. Una letrina puede ocasionar la contaminación viral de las aguas subterráneas dependiendo del tipo de suelo, nivel de la capa freática y la proximidad de los pozos locales, o bien los virus excretados en las heces fecales por los individuos infectados, y en menos casos la orina llega a contaminar efluentes que pueden ser ingeridos por los individuos que aprovechen estas aguas. La probabilidad de que éstos se infecten y que enfermen dependerá de la virulencia (eficiencia para infectar o Dosis infectiva (DI)), de la dosis ingerida y la susceptibilidad de cada individuo.

Bitton, (1980) ., menciona que las gotas de agua provenientes de agua tratada propagadas por el aire, pueden contener virus capaces de infectar a los individuos mediante la inhalación. Es posible que éstas gotas con partículas virales adsorbidas se formen al descargarse el depósito de un retrete cuando se asperja el agua durante el riego, y de esta manera dispersarse en el ambiente.

Rao., Metcalf y Melnick., 1986; en sus estudios han demostrado supervivencia de enterovirus por la adsorción a materia particulada en el proceso de desinfección en plantas de tratamiento. También han demostrado que los virus pueden sobrevivir en el suelo, ya que los hayaron en la superficie a menos de 50 cms. de profundidad.

Estos estudios demuestran que existen diferentes factores que influyen en la supervivencia de enterovirus como son:

- 1). Condiciones de pH: los virus se mantienen estables a un pH neutro, pero hay otros como los poliovirus que resisten un pH ácido de 4.
- 2). La temperatura: han demostrado que a bajas temperaturas ( bajo 0°C ) existe mayor supervivencia.

Los trabajos sobre contaminación por virus son relativamente recientes en México; se puede señalar que desde 1984, se ha desarrollado investigación en este campo. Estos estudios están relacionados con la calidad virológica del agua potable, residual y renovada en el Sistema Hidráulico del D.F., encontrándose mayor cantidad de Echovirus, Coxsackievirus y Poliovirus en orden decreciente, en algunas muestras de agua antes mencionada.

También se han realizado tomas de muestras de lixiviados, en los que se encontraron Echovirus en mayor porcentaje. (12,13,14 y 15).

Los estudios son escasos aún, debido a las limitaciones de tipo económico y de material requerido.

Fernández (1991); realizó estudios en muestras de rábano, irrigado con aguas tratadas provenientes de los Canales de

Xochimilco; y se encontraron enterovirus (Echovirus), en estas plantas comestibles.

Actualmente en México existen pocos estudios acerca de enterovirus en el ambiente, más bien están enfocados a contaminantes emitidos artificialmente (industrias, vehículos, etc.). Sin embargo existen contaminantes naturales como tolveneras, que representan una gran perturbación en la calidad del aire, aún mas en las zonas aledañas del D.F. (29).

La incidencia de las tolveneras es máxima durante el invierno y primavera (26), cuando las condiciones son propicias y si las consideramos como un medio a través del cual se pueden transmitir y distribuir las partículas virales, las que pueden contaminar agua y alimentos, que al ser ingeridos por el hombre pueden causar enfermedades entre las que podemos mencionar las gastrointestinales. (24).

Aunque en gran parte del D.F., ya existen condiciones de relativa prosperidad y de higiene, existen zonas en las que hay escasos o nulos servicios públicos, como agua potable, alcantarillado, pavimentación, drenaje y uso de letrinas. Debido a estas últimas se da la defecación al aire libre, lo que aunado a la influencia del viento, haga que las heces fecales sean transportadas y distribuidas a considerables distancias; esto trae problemas de salud principalmente en los niños.

A nivel ambiental no hay estudios que demuestren la variación ambiental de enterovirus, y es importante conocerla, ya que se pueden inferir las posibles enfermedades que se contraigan del ambiente; así mismo se pueden extrapolar los resultados obtenidos relacionándolos con las épocas del año; es decir en que épocas se da la mayor infección de enterovirus que afecten a la población humana. Y solamente hay estudios a nivel enzimático de virus entéricos en los que se demuestran las actividades y cambios patológicos a nivel celular en las diferentes infecciones virales. (45).

Las principales enfermedades que causan los enterovirus son entre otras, las respiratorias que periódicamente afectan a la población y la gastroenteritis que constituyen la principal causa de enfermedad y muerte en los niños. Las

enfermedades respiratorias se transmiten por contagio, para ello es preciso que una persona propensa haya estado en contacto con otra portadora del agente causal (generalmente un virus), para que la infección ocurra; la exposición a cambios violentos de temperatura no es una condición suficiente para explicar la enfermedad pero se presentan con mayor frecuencia estas enfermedades durante los meses de invierno(34).

En México a los virus se les considera agentes potenciales de alto riesgo a la salud, debido a que provocan enfermedades gastrointestinales y de algunos casos de parálisis flácida aguda en la población infantil, pudiendo ocasionar brotes epidémicos. (31).

Los agentes virales son los responsables del 95% de las infecciones nasofaríngeas y son diseminados por el aire; al hablar, toser o estornudar de una persona portadora. (48).

Con base en lo anterior se plantea realizar un estudio que nos indique la presencia de enterovirus y su variación estacional, específicamente en agua de lluvia y polvo; así como su importancia de ser peligro potencial de contaminación del aire, agua, suelo y al hombre mismo.



## JUSTIFICACION

En virología ambiental no existen trabajos de enterovirus, por lo que ( para realizar el presente trabajo en muestras de agua de lluvia y polvo) se desarrolló la metodología que se describe en la Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica del D.F., (13).

En el D.F., se da una mayor influencia de tolvaneras en los meses de invierno y primavera(25), que van a propiciar la dispersión de partículas virales adsorbidas al polvo o heces fecales; posteriormente son dispersadas por la lluvia hasta integrarlas al ecosistema contaminando agua potable, alimentos y al hombre mismo; así posiblemente la supervivencia de partículas virales podría ser un riesgo potencial para la salud. Este estudio servirá como base a epidemiólogos interesados en el tema que se enfrenten a considerar estos enterovirus como vectores o causantes de enfermedades que se diseminan con mayor frecuencia en las grandes ciudades como la nuestra.

Desde principios de siglo y hasta la actualidad las diarreas han sido la principal causa de morbilidad y mortalidad de los infantes en muchos lugares del mundo, en especial en los países en desarrollo, según la Organización Mundial de la Salud, este padecimiento representa entre 20 y 30% de las causas de mortalidad en menores de 5 años.

En México las tasas de mortalidad y morbilidad por diarreas tienen una magnitud e impacto significativos; según las estadísticas de 1986, constituyeron la principal causa de muerte en preescolares y la segunda en el nivel infantil. Tres años después siguen ocupando estos sitios en los datos sobre mortalidad en dichos grupos de edad.

El número de casos de infecciones intestinales, enteritis y otras enfermedades diarréicas causadas por virus reportadas por las instituciones de salud a la Dirección General de Epidemiología demuestran un incremento considerable de 594,520 casos en 1979 a 2,301,443, lo que representa una tasa de 2,825.89 casos por 100,000 habitantes.

A partir de la utilización de la vacuna antipoliomielítica inactivada (UPI) en 1955, y oral (UPO) en 1961; la poliomiélitis se ha logrado erradicar en algunos países; sin embargo todavía circulan poliovirus salvajes (diseminado en el ambiente) en gran parte de la población en los países en desarrollo.

En México la enfermedad se notificó en 1937, registrándose como uno de los países de América Latina con mayor incidencia. Pero hasta 1972 se logró inmunizar a más del 70% de los niños menores de 5 años. El tipo 1 es el que predomina en comunidades con una cobertura baja de inmunización, el tipo 2 y el 3 se presentan en comunidades bien inmunizadas. En la República Mexicana los casos de polio salvaje (diseminado en el ambiente) o silvestre, reportados fueron 3 casos del tipo 3 en los Estados de Sinaloa, Colima y Jalisco en 1987. (47).

Con el presente estudio se pretende relacionar diferentes tipos de enterovirus para cada estación del año y así los resultados podrán ser extrapolables para discernir las enfermedades causadas por estos.

## AREA DE ESTUDIO

### UBICACION DEL DISTRITO FEDERAL.

El Distrito Federal se localiza en la cuenca cerrada del Valle de México, a una altitud de 2240 msnm, y cubre una superficie de aproximadamente 1500 kilómetros cuadrados (posee una fisiografía y geología heterogéneas. (40).

### DESCRIPCION Y UBICACION DE LOS SITIOS DE COLECTA.

Los sitios de colecta de muestras fueron elegidos considerando las zonas en las que hay mayor concentración de población del D.F.

La toma de muestras se llevó a cabo en 5 sitios que fueron:

I. COL. PATRIMONIO FAMILIAR.- Se encuentra al norte de la Delegación Azcapotzalco; la cual se localiza entre los meridianos (99 grados 13 minutos) y (99 grados 09 minutos) de longitud oeste, entre los paralelos (19 grados 27 minutos) y los (19 grados 20 minutos) de latitud norte. Posee una extensión de 33.28 kilómetros cuadrados, se encuentra casi en su totalidad urbanizada contando solo con lotes baldíos.

En este sitio se localizan casas habitación en su gran mayoría y no existen edificios altos, por lo que fluyen más los vientos; se encuentran pocas fábricas y no hay terrenos baldíos, por lo tanto la incidencia de tolvaneras no perturba el ambiente.

### Características Fisiográficas.

Presenta una topografía plana. Esta delegación no cuenta con suficientes espacios abiertos de áreas verdes, debido al intenso uso urbano del suelo, así como insuficiencia de árboles y plantas que tengan la capacidad para sobrevivir en época de estiaje y bajo condiciones de contaminación ambiental fuerte, además del inadecuado uso que de ellas hacen algunos habitantes.

#### Características hidrometereológicas.

No existen ríos o canales que lo manifiesten. El clima de la delegación se ve afectado por el enorme crecimiento urbano que presenta la Ciudad de México, así como la gran concentración de impurezas sólidas y gaseosas, productos del calor que producen las industrias existentes en esta zona que provocan la alteración de los elementos termodinámicos de la atmósfera (humedad, precipitación, temperatura y los vientos). Originalmente la Delegación Azcapotzalco presentaba un clima templado con ligeras variantes a través de las estaciones del año, pero a partir de estas nuevas condiciones aunadas a la sustitución del suelo natural por superficie de concreto se ha identificado un clima templado, pero con variantes en algunas ocasiones extremos; así como una temperatura promedio anual de 16 grados, con lo que se alcanza la periferia de la Ciudad, la cual presenta 12 grados centígrados.

II. COL. MIGUEL HIDALGO.- Se localiza al Sureste de la Delegación Tlalpan, la cual se encuentra al Surponiente y colinda al Sur con el Estado de Morelos, al Norte con la Delegación Coyoacán, Al noroeste con Xochimilco al sureste con Milpa Alta, al norponiente con la Magdalena Contreras, y al surponiente con el Estado de México. El sitio de colecta se caracteriza por no presentar edificios altos y predomina en su mayoría casas habitación con espacios abiertos y áreas verdes, por lo que la lluvia es abundante y con frecuencia de nublados. Existen terrenos baldíos que originan tolvaneras en época de sequía.

#### Características fisiográficas.

Se encuentra a 19 grados 17 minutos 22 segundos de latitud norte, 0 grados 1 minuto 54 segundos de latitud oeste del Meridiano de Greenwich y a una altura de 2, 393 msnm. Por su extensión territorial ocupa el primer lugar dentro del Distrito Federal con 312 kilómetros cuadrados.

#### Características hidrometereológicas.

En Tlalpan existen numerosas corrientes que bajan de los cerros, pero sólo en tiempos de lluvia llevan agua. Hay dos ríos casi secos: San Buenaventura y San Juan de Dios, otro río importante es el Eslava que sirve de límite entre la Delegación de Tlalpan y Magdalena Contreras.

III. COL. IZTAPALAPA.- Se encuentra al Oriente, la cual se ubica entre los paralelos 19 grados 16 minutos y 19 grados 23 minutos latitud norte y entre los meridianos 98 grados 57 minutos y 99 grados 8 minutos latitud oeste, localizándose al oriente del Distrito Federal; su superficie de la Delegación es de 115.06 kilómetros cuadrados; que corresponden al 7.72% del área total del territorio del Distrito Federal.

Es una zona que cuenta con unidades habitacionales; la zona recibe una carga de polvo mayor ya que cuenta con un terreno baldío (ex-tiraderos de Santa Cruz Meyehualco). La frecuencia de lluvias es moderada así como las tormentas eléctricas y nublados. No existen fábricas ni zonas verdes alrededor del sitio de colecta.

#### Características fisiográficas.

Se caracteriza por tener una topografía plana limitada al Sur por lomeríos y cerros, presenta pendientes del 5% de la zona urbana y tiene pendientes mayores al 25% en áreas que son aledañas a las elevaciones montañosas que se ubican en la Delegación.

Desde el punto de vista geohidrológico, las formaciones montañosas permiten la infiltración y escurrimiento del agua en época de lluvia, mismas que son extraídas en las partes bajas, por medio de pozos profundos.

#### Características hidrometeorológicas.

Presenta un clima templado subhúmedo con régimen de lluvias en verano y seco en invierno, presentando temperatura promedio anual de 17 grados centígrados, la precipitación pluvial de 41.3 mm.

IV.- COL. LOMAS DE LA ERA.- Se localiza al poniente de la Delegación Alvaro Obregón, la cual se ubica a 9 kilómetros al

sur del Centro de la ciudad; a 2,317 msnm, la cabecera se encuentra a los 19 grados 24 minutos 47 segundos de latitud norte y a los 0 grados 2 minutos 2 segundos al oriente del meridiano.

Es una zona de lomeríos, zonas verdes y cuenta con espacios abiertos, llueve en abundancia ( todo el día y la noche en época de lluvia ), los vientos se concentran en mayor altitud.

#### Características fisiográficas.

Dentro de la delegación se encuentra el 72% de las zonas minadas del D.F., las cuales presentan el mayor número de problemas: 58% están catalogadas de alta peligrosidad, 26% de mediana y 16% de baja peligrosidad. Dichos problemas se deben en general a cavidades detectadas en la zona poniente de la Ciudad de origen artificial que contenían material del subsuelo extraído con destinos constructivos a taludes que en la mayoría de los casos coinciden con antiguos frentes de explotación minera a cielo abierto de altura y extensión variable, o bien a rellenos de origen reciente, productos de materiales de desperdicios en zonas ocupadas antiguamente por explotaciones mineras a cielo abierto colocadas a volteo sin control de compactación. (40).

V.- COL. MORELOS.- Se localiza en la delegación Venustiano Carranza; la cual se ubica al nororiente del D.F. entre los meridianos 99 grados 2 minutos y 99 grados 8 minutos de longitud oeste y los paralelos 19 grados 24 minutos y 19 grados 28 minutos de latitud norte. Posee una extensión territorial de 33.42 kilómetros cuadrados. Este sitio se caracteriza por la gran cantidad de edificios altos por lo que en este se concentra la mayor cantidad de contaminantes de la zona urbana, existen pequeñas fábricas de calzado y madererías. En este sitio llueve en menor cantidad debido a que los nublados son someros.

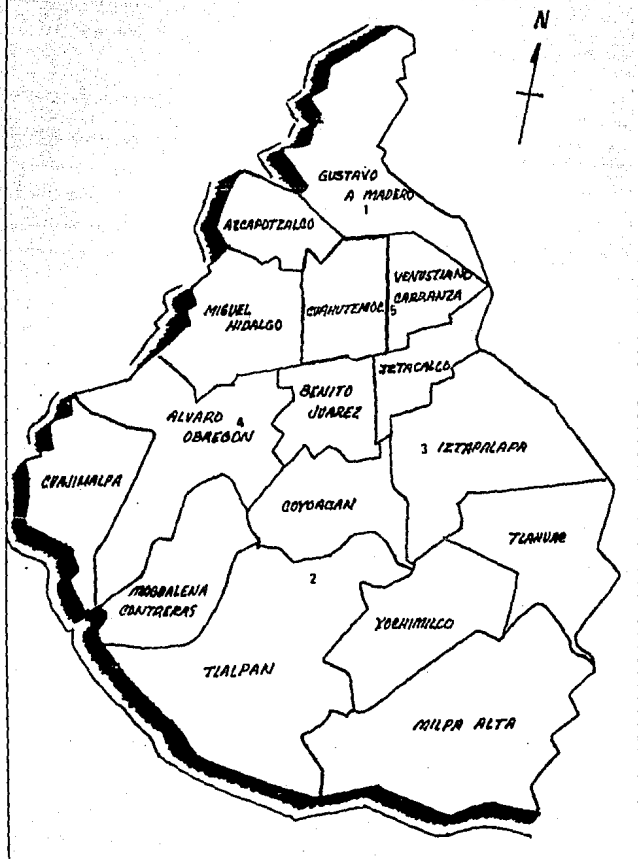
#### Características fisiográficas.

La delegación se ubica a una altitud de 2240 msnm, donde el único relieve es el conocido como el Peñón, con una cota máxima de 2290 msnm.

#### Características hidrometeorológicas.

El clima que presenta es subtropical de altura, el cual es clima suave y agradable, notándose que los meses de febrero y marzo son típicamente airoso; abril, mayo y junio integran un periodo caluroso y de mayo a noviembre se presenta la época de lluvia; así como en diciembre es frío. (40).

MAPA DE LOCALIZACION DE LOS SITIOS DE COLECTA.





## METODO DE LABORATORIO Y CAMPO

Para la realización del presente estudio se utilizó el siguiente material inerte e in vitro.

1. Cartuchos MICRO KLEAN Zeta Plus III, de fibras acrílicas y resinas fenólicas de 1 micra de retención nominal y longitud sencilla de 9 3/4 pulgada, resinas rígidas rango de 1 a 125 micrones, 1 para la adsorción de los enterovirus. (7).

2. Las siguientes líneas celulares para la infección de muestras en el bioensayo:

RD. Células de rhabdoma humano (línea continua)

HEP2c. Células de carcinoma de garganta humano (línea continua).

VERO. Células de Riñón de Mono Verde Africano (líneas continuas).

3. Virus polio tipo I para control positivo en la infección de las muestras: así como para la cosecha viral.

### TRABAJO DE CAMPO

A.- Muestras de lluvia.

B.- Muestras de polvo.

A. Las muestras de lluvia fueron colectadas en envases de boca ancha de 4 litros, sujetados con alambre a una altura de 1.5 m para evitar salpicaduras. El recipiente fué expuesto por un mes debido a la poca captación de lluvia, después del tiempo determinado se transportan al laboratorio para su posterior análisis.

B. Las muestras de polvo se colocaron filtros positivos MICRO KLEAN ZETA PLUS III, suspendidos a una altura de 1.5 m arriba de las azoteas para evitar interferencias. Una vez expuestos por 15 días se envuelven en un papel aluminio estéril y son transportados al laboratorio para su posterior análisis.

Nota: Las muestras se tomaron dependiendo de la fecha de colocación de estas y comprenden: Primavera (marzo, abril y mayo), Verano (junio, julio, agosto), Otoño (sep, oct) e Invierno (enero y febrero) (Véase Tabla 2).

Cabe aclarar que en este estudio solamente se colectaron las muestras una sola vez por mes, debido a limitantes de tipo económico y de material requerido.

#### TRABAJO DE LABORATORIO

Es necesario que el laboratorio de Virología cuente con un diseño especial para evitar al máximo contaminación de cualquier tipo (Apéndice I). El material, equipo y reactivos utilizados en dicho laboratorio se presenta en el Apéndice 2 y en el Apéndice 3 las preparaciones de los medios y reactivos utilizados en este trabajo.

Una vez que las muestras fueron transportadas al laboratorio se proceden a concentrarlas (Anexo 1 y 2). Para analizarlas y medir el efecto citopático (transformación de la morfología celular). Para mantener células confluentes se llevan a cabo técnicas de cultivo celular (Anexo 3) y Conteo celular (Anexo 4), Congelación celular (Anexo 5), y Descongelación celular (Anexo 6).

El buen estado de las células permite realizar la infección de las muestras concentradas mediante el método de bioensayo en tubo (Anexo 7, 7.1 y 7.2), se mantienen en observación por 15 días, y las muestras que resulten positivas se titulan por el método de diluciones logarítmicas base 10 de DICT 50% (Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% y se calcula por el Método de Karber. (Anexo 8 y 8.1). Para valorar las puntuaciones numéricas de enterovirus existe un método estadístico para realizarlo y que se llama el Método de Spearman-& Karber (Anexo 9) y finalmente se identifican con antisueros de Lin-Benyesh-Melnick(L:B:M:) (Anexo 10).

## RESULTADOS Y ANALISIS

De las 10 colectas realizadas en las 5 colonias del D.F, (de Enero a Octubre de 1991), se obtuvieron los siguientes resultados:

En la tabla 1 se observa que la Dosis Infecciosa mayor fué en el Oriente, en los meses de julio y agosto que nos representaría a la estación de Verano; así como variantes en los otros sitios.

Se presenta también la época estacional del año a que corresponde cada colecta.

Así tenemos que la colecta de Enero y Febrero corresponde a Invierno; Marzo, Abril y Mayo corresponden a Primavera; Junio, Julio y Agosto al Verano (estación de lluvia) y Septiembre y Octubre al Otoño.

Los valores de DICT 50% obtenidos oscilan entre 10 a la .625 y 10 a la 3.375 en cultivo de tejidos, como se observa en la Tabla 1, existe un incremento en Verano en el sitio Oriente que es el mayor de entre todos los demás, mientras que la Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% baja es de 10 a la .625 casi constante en todos los demás.

En primavera desde que empieza (marzo y abril)), se observa una Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% de 10 a la 1.625 (constante) en el sitio Poniente con respecto a los demás sitios; tanto como en el Sur casi a finales de primavera hubo Dosis Infecciosa 50% de 10 a la 1.625 la misma dosis que en verano.

En verano se observan Dosis Infecciosas variables: 10 a la 1.625 en el Sur, 10 a la 3.375 en el Oriente, en el Poniente 10 a la 1.750 y Centro 10 a la 1.75; se observa en la tabla que en esta estación hay más variación de entre otras y es importante aclararlo ya que como es una época sumamente lluviosa (pues abarca de mayo a julio) (25), podríamos esperar que con el fenómeno de lavado de la lluvia pueden ser precipitadas las partículas de polvo que en ellos se pueden adosar las partículas virales por lo que encontramos valores positivos altos y casi en todos los sitios.

Ahora bien el sitio Oriente con la más alta DICT50% de 10 a la 3.375 probablemente se deba a la influencia de los extriraderos de Santa Cruz Meyehualco.

En Otoño se observa una disminución de DICT50% en todos los sitios excepto en Norte, observándose una baja en el Oriente de 10 a la 1.625, así como en el Poniente hay un decremento de 10 a la .625, y en el Centro ya no se encuentra por la estación del año, encontrándose también que en el Norte hubo un aumento de DICT 50% que no se observó en la estación anterior. (Verano).

Sin embargo en Invierno otra vez existe una variación enteroviral de DICT50% en todos los sitios: 10 a la .625 en Norte, 10 a la .625 en Sur; en Oriente hay variación inclusive de mes a mes, en Enero 10 a la .625 y febrero un aumento de 10 a la 1.625 probablemente se deba al cambio estacional, y que esté influyendo la temperatura, pues fué casi al finalizar la estación de Invierno, sin embargo en el Poniente hubo DICT de 10 a la .750 y en el Centro también hubo una ligera variación en Enero (10 a la 1.250), y Febrero un aumento en 10 a la 1.875, se cree que la variación haya sido por el final de la estación de invierno, ya que a menor temperatura los virus son mas activos y a mayor temperatura (primavera) puede haber inactivación, por lo que se observa una disminución de la DICT 50% para todos los sitios.

Ahora bien con respecto a la temporada de lluvias (se abarcaron los meses de mayo, junio y julio). En el sitio que más se presentó una DICT50% alta fué en el Oriente, luego en el Poniente y Centro; en el Sur se observaron DICT50%(10 exponente 1.625) en mayo y junio, como en ningún otro sitio; debiéndose a que los vientos como fluyen de norte a sur, se acarrear los contaminantes y se concentran en esta parte; y al empezar las primeras lluvias del año se da el fenómeno de lavado atmosférico y esto conllevó a obtener resultados en este único sitio.

En agosto hubo poca lluvia, pero se podría decir que casi es la misma DICT50% que se presentó en Julio que correspondería al Verano.

Analizando la variación enteroviral por sitio, se observa en la Gráfica 1 (Norte) una DICT50% constante en Invierno y Otoño. En este sitio se presentó DICT 50% en época de sequía, abarcando los meses de enero-febrero, septiembre-octubre; y en época de lluvias los resultados del análisis de muestras fueron negativos para este sitio.

En la gráfica 2 se observa el sitio Sur que también presentó dosis bajas en Invierno.

Considerando nuestra hipótesis que el viento influye en la distribución de los enterovirus en el ambiente; se sabe que en estas épocas estacionales, los vientos fluyen de Norte a Sur en septiembre y octubre y en febrero se levantan cortinas de polvo que son provocadas por vientos del Este principalmente; concentrándose en el Centro; con base en esto se esperaba encontrar una DICT50% más alta en este sitio, por lo que se comprueba la hipótesis, ya que los vientos se concentran en este sitio.

Analizando la gráfica 3 que corresponde al Sitio Oriente se observa una gran variación enteroviral por meses que corresponden a las estaciones del año. Como se ha mencionado en Invierno (enero y febrero), hubo un cambio entre mes y mes, ya que se presentó una DICT50% más alta en febrero, debido probablemente a las tolvaneras que se presentan en este mes en el Oriente. En primavera no hubo algún resultado positivo, probablemente al aumento de temperatura (época de calor) que se presenta en esta época., y se ha reportado bibliográficamente que dicho aumento de temperatura puede inactivar a los virus. En los meses de julio y agosto se presentó una DICT50% más alta de entre todos los sitios, y probablemente se deba a la influencia de los tiraderos de basura que se presentan en esta zona y las lluvias jueguen un papel importante en el lavado de contaminantes y esto posiblemente influyó en la DICT50% mayor que se presentó. Así en Otoño se presentó una disminución de DICT50% con respecto a la estación anterior.

En la gráfica 4 sitio Poniente, observamos que en enero (Invierno) hay una DICT50% de 10 a la 0.75, pero en primavera (marzo -abril) hay un incremento a la 1.625, por ser época de calor, la variación de algunos enterovirus, y se podría pensar que sean Echovirus (ya que estos son los que sobreviven en primavera (37)). Sin embargo en Verano (julio-agosto) que abarca también la época de lluvia hay un ligero incremento de 10 a la 1.75, que como en los otros sitios hubo un incremento, creemos que fue debido a lo anteriormente descrito para otros sitios. Sin embargo en Otoño (sept-oct), se observa todavía un decremento bastante marcado pues es época

seca y existe el cambio de condiciones ambientales, según la estación del año. Se reporta bibliográficamente que en esta estación se dispersan algunos enterovirus, pudiendo ser Echovirus, Poliovirus o Coxsackievirus. (9).

En la gráfica 5 que corresponde al Centro se encontró la DICT50% más alta de entre todos los sitios en la estación de Invierno. y es lógico pensarlo puesto que hay una mayor concentración de contaminantes., en cambio en Primavera cuando los vientos fluyen del Norte, Oriente y Poniente concentrándose en el Centro mayor cantidad de contaminantes de todo tipo, hubiéramos esperado DICT50% positiva, pero no fué así. En julio y agosto que corresponde a la época de lluvia igual que en los otros sitios excepto en el Norte se presentó DICT50% por lo anteriormente explicado.

Por último en la gráfica 6 se presenta de manera global los valores de DICT50% estacional por sitio, observándose que los sitios donde hubo mayor variación fueron Oriente y Poniente, ya que abarcó valores de 10 a la .625 hasta 10 a la 3.375 a lo largo de las estaciones del año y de 10 a la .625 hasta 10 a 1.75 respectivamente, mientras que en el Centro se observó variación de valores en menor proporción; y en el Sitio Sur hubo valores diferentes (10 a la 0.625 y 10 a la 1.625); siendo para el norte las DICT50% más bajas y constantes.

Cabe aclarar que en Invierno hay 2 valores diferentes en Centro y Oriente (Ver gráfica 6) esto puede explicarse brevemente:

En Oriente el valor 10 exponente 1.625 corresponde al mes de febrero; se sabe que en este mes las tolvaneras ocurren con mayor frecuencia, y esto repercute en el incremento de dicha dosis. Pero en el sitio Centro, en el mes de febrero (10 exponente 1.875 el otro valor de Invierno), fué más alto que en Oriente, (sitio cercano a los extiraderos de Sta Cruz Meyehualco), debido a que el viento influye en la concentración de contaminantes para este sitio. Considerando esto, se infiere que de todos los sitios estudiados el Oriente y Poniente fueron los que presentaron la mayor variación para cada estación del año.

Cabe aclarar que en el presente estudio se colectó solo 1 muestra por mes; y se pretendía aplicar la metodología utilizada en la DGCOH para muestras de agua, así como probar

que de cierta manera ésta fuera útil para el aislamiento de enterovirus ambientales. Y con este proyecto se iniciará el estudio para determinar enterovirus en el ambiente y por el alto costo de material biológico y equipo de laboratorio necesario, no fué posible analizar un mayor número de muestras.

Es importante encauzar estudios posteriores relacionados al tema, ya que existen trabajos sobre contaminación de todo tipo, pero los de contaminación biológica son escasos, y estos están en mayor grado de causar grandes daños a la población, y sobre todo enterovirus que causan enfermedades triviales y mortales.

Por otra parte, los métodos utilizados para determinar la presencia de estos virus, nos permitieron determinar, aunque en cantidades muy bajas la presencia de enterovirus en el ambiente. Tanto en el método de concentración, como el método de bioensayo y de titulación de las muestras, deben de ser controladas más variables para que no haya interferencia en los resultados y puedan ser aislados con mayor eficiencia. (30,42,49).

El método de concentración que se ha empleado en este trabajo, determina los enterovirus (Echo, Coxsackie y Polio), y con las Baterías de Melnick se aíslan los tres tipos. (49).

En este trabajo no fué posible el aislamiento (identificación) del tipo de enterovirus, puesto que se necesita una DICT50% mayor (10 a la 6), para lograrlo, y puesto que este estudio es una introducción; nos permitió demostrar que en el ambiente hay enterovirus en dosis muy bajas, pero controlando las variables y condiciones óptimas en el laboratorio (factores como presencia de materia particulada, pH neutro y sobre todo bajas temperaturas). Las dosis determinadas pueden ser más altas para muestras sintéticas (testigos) (15).

Por otro lado sabemos que en invierno hay una mayor incidencia de enfermedades respiratorias y posiblemente exista en el ambiente el tipo Coxsackie A 21 y Echo 11 y 26, y que son los causantes de infecciones del aparato respiratorio (10), y esto se puede constatar con la alta incidencia de

pacientes que asisten en invierno a las dependencias de salud.

En cuanto al método de Bioensayo utilizado, se hizo todo lo posible (se controlaron al máximo las variables) para poder replicar las posibles partículas virales (aumento del título viral) contenidas en la muestra concentradas, y así obtenerlos altos para su posterior identificación, ( los profesionales en este campo recomiendan que sólo son necesarios 3 pases para aumentar el título viral de una muestra) (3,5).

Los enterovirus encontrados en el ambiente (aunque sea en dosis bajas y sin conocer el serotipo), aparentemente mostraron preferencia marcada por alguno de las líneas utilizadas en este estudio, en este caso fué la línea continua RD (células de rhabdoma humano), por ser más sensible a los enterovirus (21).

La Organización Mundial de la Salud recomienda que para un aislamiento amplio de enterovirus, en general el uso principalmente de las líneas utilizadas en este estudio (RD y Hep 2c) es bueno, puesto que muestran la mayor sensibilidad a estos enterovirus. (44), mostrando efecto citopático en las muestras positivas mediante los cuales se hace evidente la infección.

Además de que la probabilidad de que los individuos se infecten depende de la virulencia (la eficiencia para infectar o Dosis Infecciosa (38), lo que se determinó en este estudio.

Por lo tanto es evidente decir que aunque existieron DICT50% bajas, éstas pueden infectar a la población causándole alguna enfermedad.



**TABLAS Y GRAFICAS**

TABLA 1

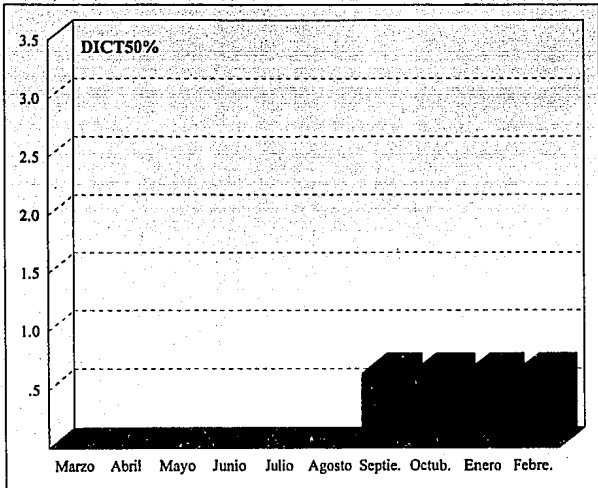
MUESTRAS ANALIZADAS DE ENTEROVIRUS

TOMA DE MUESTRA POR MES	DE SITIO	TIPO DE MUESTRA	DE ESTACION	DICT50%
Enero	NORTE	Polvo	Invierno	10 exp 0.625
Enero	SUR	Polvo	Invierno	10 exp 0.625
Enero	ORIENTE	Polvo	Invierno	10 exp 0.625
Enero	PONIENTE	Polvo	Invierno	10 exp 0.750
Enero	CENTRO	Polvo	Invierno	10 exp 1.250
Febrero	NORTE	Polvo	Invierno	10 exp 0.625
Febrero	SUR	Polvo	Invierno	Negativo
Febrero	ORIENTE	Polvo	Invierno	10 exp 1.625
Febrero	PONIENTE	Polvo	Invierno	Negativo
Febrero	CENTRO	Polvo	Invierno	10 exp 1.875
Marzo	NORTE	Polvo	Primavera	Negativo
Marzo	SUR	Polvo	Primavera	Negativo
Marzo	ORIENTE	Polvo	Primavera	Negativo
Marzo	PONIENTE	Polvo	Primavera	10 exp 1.625
Marzo	CENTRO	Polvo	Primavera	Negativo
Abril	NORTE	Polvo	Primavera	Negativo
Abril	SUR	Polvo	Primavera	Negativo
Abril	ORIENTE	Polvo	Primavera	Negativo
Abril	PONIENTE	Polvo	Primavera	10 exp 1.625
Abril	CENTRO	Polvo	Primavera	Negativo
Mayo	NORTE	Lluvia	Primavera	Negativo
Mayo	SUR	Lluvia	Primavera	10 exp 1.625
Mayo	ORIENTE	Lluvia	Primavera	Negativo
Mayo	PONIENTE	Lluvia	Primavera	Negativo
Mayo	CENTRO	Lluvia	Primavera	Negativo
Junio	NORTE	Lluvia	Verano	Negativo
Junio	SUR	Lluvia	Verano	10 exp 1.625
Junio	ORIENTE	Lluvia	Verano	Negativo

TOMA DE MUESTRAS POR MES	SITIO	TIPO DE MUESTRA	ESTACION	DICT50%
Junio	PONIENTE	Lluvia	Verano	Negativo
Junio	CENTRO	Lluvia	Verano	Negativo
Julio	NORTE	Lluvia	Verano	Negativo
Julio	SUR	Lluvia	Verano	Negativo
Julio	ORIENTE	Lluvia	Verano	10 exp 3.375
Julio	PONIENTE	Lluvia	Verano	10 exp 1.750
Julio	CENTRO	Lluvia	Verano	10 exp 1.750
Agosto	NORTE	Lluvia	Verano	Negativo
Agosto	SUR	Lluvia	Verano	Negativo
Agosto	ORIENTE	Lluvia	Verano	10 exp 3.375
Agosto	PONIENTE	Lluvia	Verano	10 exp 1.750
Agosto	CENTRO	Lluvia	Verano	10 exp 1.750
Septiembre	NORTE	Polvo	Otoño	10 exp 0.625
Septiembre	SUR	Polvo	Otoño	Negativo
Septiembre	ORIENTE	Polvo	Otoño	10 exp 1.625
Septiembre	PONIENTE	Polvo	Otoño	10 exp 0.625
Septiembre	CENTRO	Polvo	Otoño	Negativo
Octubre	NORTE	Polvo	Otoño	10 exp 0.625
Octubre	SUR	Polvo	Otoño	Negativo
Octubre	ORIENTE	Polvo	Otoño	10 exp 1.625
Octubre	PONIENTE	Polvo	Otoño	10 exp 0.625
Octubre	CENTRO	Polvo	Otoño	Negativo

Continuación de Tabla 1

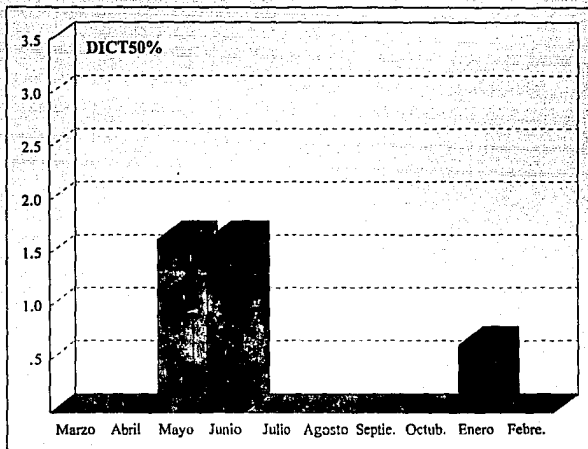
GRAFICA 1. VARIACION DE ENTEROVIRUS  
SITIO (1) NORTE



	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO		INVIERNO	
	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septie.	Octub.	Enero	Febr.
Log 10	0	0	0	0	0	0	0.63	0.63	0.63	0.63

GRAFICA 2. VARIACION DE ENTEROVIRUS

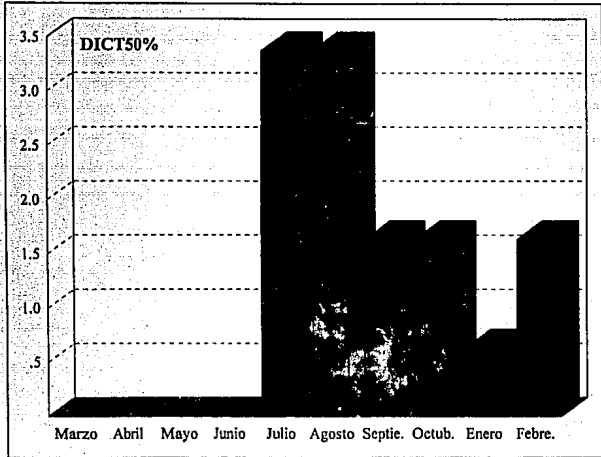
SITIO (2) SUR



	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO		INVIERNO	
	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septie.	Octub.	Enero	Febre.
Log 10	0	0	1.63	1.63	0	0	0	0	0.63	0

GRAFICA 3. VARIACION DE ENTEROVIRUS

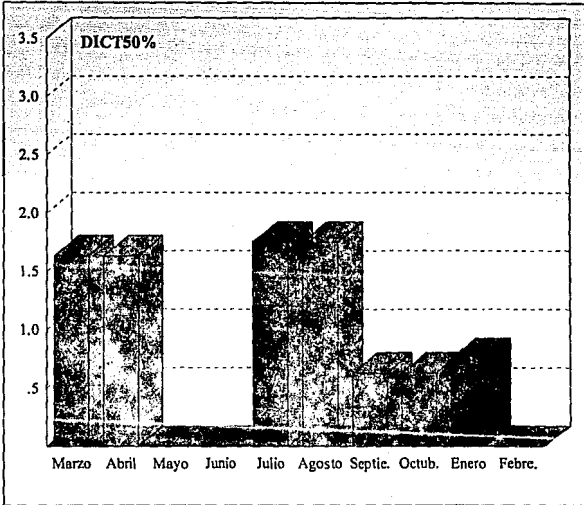
SITIO (3) ORIENTE.



	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO		INVIERNO	
	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septie.	Octub.	Enero	Febre.
Log 10	0	0	0	0	3.38	3.38	1.63	1.63	0.63	1.63

GRAFICA 4. VARIACION DE ENTEROVIRUS

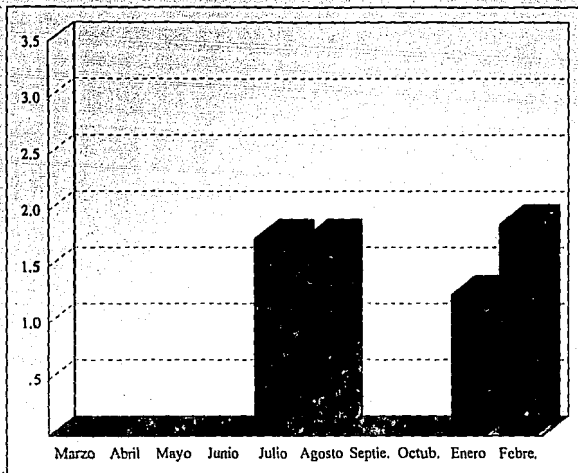
SITIO (4) PONIENTE



	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO		INVIERNO	
	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septie.	Octub.	Enero	Febre.
Log 10	1.63	1.63	0	0	1.75	1.75	0.63	0.63	0.75	0

GRAFICA 5. VARIACION DE ENTEROVIRUS

SITIO (5) CENTRO

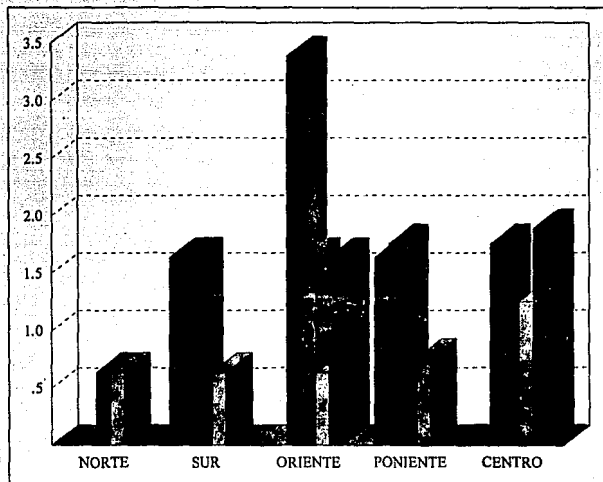


	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO		INVIERNO	
	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septie.	Octub.	Enero	Febre.
Log 10	0	0	0	0	1.75	1.75	0	0	1.25	1.88



GRAFICA 6. VARIACION ESTACIONAL DE ENTEROVIRUS  
EN LOS CINCO SITIOS.

(ENERO A OCTUBRE DE 1991)



	NORTE	SUR	ORIENTE	PONIENTE	CENTRO
PRIMAVER	0	1.63	0	1.63	0
VERANO	0	1.63	3.38	1.75	1.75
OTOÑO	0.63	0	1.63	0.63	0
INVIERNO	0.63	0.63	0.63	0.75	1.25
INVIERNO	0	0	1.63	0	1.88

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos dan a conocer la situación de los enterovirus ambientales en determinados sitios del D.F.

1.- En los sitios de colecta hay enterovirus en el ambiente en Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejidos 50% con títulos bajos, lo cual nos indica una débil pero latente patogenicidad al humano.

2.- De los sitios de colecta con respecto a las estaciones del año, en la que hubo mayor variación enteroviral fué en Invierno, debido a que es la época de frío y hay mayor sobrevivencia de enterovirus, sin embargo en Verano, en el sitio Oriente se encontraron enterovirus con títulos más altos que los anteriores, pero esto se explica por estar cerca de los extiraderos de basura y ser una zona más expuesta a la contaminación enteroviral y de todo tipo.

3.- Con las Baterías de Melnick, se identificaron los diferentes tipos de enterovirus que hay en el ambiente, sin embargo existe una objeción con respecto a los resultados, ya que se requiere de una DICT50% (10 a la 6) mínima y no se obtuvo en las muestras; pero sí en los testigos.

4.- En este estudio se pudo observar que no sólo la dirección de vientos influye en la distribución de enterovirus, sino que existen otros factores como la temperatura que se presenta en cada estación del año. Podemos afirmarlo, ya que esperábamos encontrar DICT más altas en el Sur, sin embargo en este sitio fueron constantes y bajas; pero también hay que considerar que probablemente pueda haber interferencias en el ambiente, como son reacciones fotoquímicas de los contaminantes atmosféricos, que estén influyendo en el cambio de pH y esto propicie la inactivación de los enterovirus; ya que se observó que en algunas muestras tenían pH de 5 y 6 para Centro y Sur respectivamente. (muestras de agua de lluvia; para el caso de 5 se le

considera ácida). Sin embargo; si hubiera sido posible la identificación enteroviral, se podría constatar con la bibliografía, cuales son las enfermedades que causan y en que épocas del año ocurren con mayor frecuencia, que se sabe que en Invierno es la mayor incidencia de dichas enfermedades respiratorias, pues hay una mayor afluencia de casos en las dependencias de salud.

5.- Se pudieron constatar las hipótesis propuestas en este trabajo, ya que la distribución de enterovirus en el Distrito Federal no fué uniforme; ésta distribución está determinada por la dirección de los vientos y hay factores que influyeron en la supervivencia de las partículas virales como es la temperatura de las estaciones del año, fenómeno de lavado atmosférico provocado por las lluvias y la presencia de tiraderos a cielo abierto.

6.- Las DICT50% de los enterovirus, resultò ser muy baja (10 exponente 0.625 a 10 exponente 3.375), pero es suficiente para causar infección en cultivo de tejidos (células).

7.- Es importante aclarar que el material in vitro, equipo, reactivos, medios de cultivo, tiempo de exposición de la muestra, pH, temperatura ambiental, y el almacenamiento de muestras a bajas temperaturas (-70 grados centígrados), hará posible llevar a cabo la técnica descrita (y hacer en un futuro una correlación amplia de enterovirus en el ambiente.).

8.- Con este proyecto pretendimos contribuir al estudio ambiental de enterovirus en el medio, ya que en este país, al menos hasta la fecha, no se han reportado enterovirus en el ambiente, y sólo existen trabajos de virus en agua potable, residual y renovada, lixiviados; así como en algunos vegetales, como lo hemos mencionado en este estudio.

## RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores sobre el mismo tema se recomienda lo siguiente:

1.- Tomar en cuenta los sitios de colecta, elegir un mayor número de estos en áreas de contaminación biológica más frecuente, y trabajar un mayor número de muestras.

2.- Abarcar por lo menos 2 períodos anuales, para lograr una correlación amplia de tipo de enterovirus con las estaciones del año.

3.- En el caso de que haya DICT50% suficientes (mucho mayor que las reportadas en este trabajo), extrapolar, como se ha mencionado con las enfermedades que causan dichos enterovirus.

4.- Se propone hacer un estudio más detallado con respecto a las enfermedades que causan los enterovirus y relacionarlas con la población infantil, que es la que más se encuentra afectada en todos los tiempos.

5.- Recomendamos elegir ensayos tendientes a incluir la mayor gama enteroviral de importancia de salud al hombre (Hepatitis, Agente Norwalk, etc.), y que se sabe son virus no cultivables en líneas celulares y no citopatogénicos.

6.- Se recomienda que al aplicar la técnica mencionada en este trabajo, se controlen estrictamente las variables como pH, Temperatura, almacenamiento de muestras y transporte de estas para evitar la inactivación de las partículas virales, que como es sabido son algunos de los principales factores que determinan la virulencia.

7.- Hacer estudios interdisciplinarios e interinstitucionales para evaluar la importancia que tienen los virus, ya que causan enfermedades de importancia humanitaria y que conllevan al planteamiento y evaluación de las enfermedades que causan.

**APENDICES Y ANEXOS**

## APENDICE 1

Un laboratorio de cultivo de tejidos tiene 4 actividades principales para reducir al mínimo la contaminación:

1.- Lavado de vidriería de laboratorio con procedimientos especiales para reducir la toxicidad a las células.

2.- Preparación de medios de cultivos esterilizados por filtración, distribución aséptica y pruebas de esterilidad en medios sólidos como agar hierro tres azúcares, soya tripticosa, y agar placa.

3.- Pasaje o subcultivo y mantenimiento de las células, su congelación, almacenamiento y descongelación.

4.- El control de calidad de los diversos pasos y del producto final, las monocapas de células saludables y utilizables para titulaciones de virus entéricos en el medio ambiente. (28).

Nota: La calidad del agua es esencial para obtener un buen crecimiento de las células, y esta debe controlarse cada vez que se utilice, con un conductímetro.

Existen sistemas para desionizar el agua; 1) El sistema MilliQ, que produce agua con alta calidad, libre de compuestos orgánicos y pirógenos, apta para el cultivo de tejidos. 2) y destilando pero varias veces el agua para optimizar su pureza.

## APENDICE 2

### MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS.

#### I): Material para concentración de enterovirus.

- Filtros positivos de resinas fenólicas para la adsorción de enterovirus. (7).
- Portacartuchos de plástico para los filtros.
- Vasos de precipitado de polipropileno de 500 ml. de capacidad. (tubos para centrifuga CORNING.
- Pipetas de 1,2,5, y 10 ml.
- Matraces Ernlennmeyer de 500 y 1000 ml. de capacidad
- Probetas de 500 ml. de capacidad.
- Vasos de propileno para centrifuga con capacidad de 250 mL.
- Filtros swinex con membranas de 0.45 micras
- Jeringas desechables de 10 ml. de capacidad.
- Viales de plástico con capacidad de 50 ml. CORNING.

#### II): Equipo de laboratorio para la concentración de enterovirus:

- Balanza granataria SARTORIUS.
- Centrifuga refrigerada con capacidad para 21 000 revoluciones DUPONT, INSTRUMENTS, SHORVALL
- Ultracongelador REVCO y Refrigerador de -20 a -70 grados centígrados.
- Campana de flujo laminar vertical SAMSON
- Autoclave
- Parrillas de agitación. LAB-LINE INSTRUMENTS.

#### III). Reactivos para la concentración de enterovirus.

- Extracto de carne al 3% como eluyente.
- Glicina
- HCl 1 N
- Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 N.
- NaOH 1N
- Antibiótico 1%

- Suero Fetal Bovino como crioprotector.
- Alcohol al 70%
- Benzal al 70%
- Hipoclorito de Sodio al 30%
- Tiosulfato de Sodio al 0.1%

Nota: Ver preparación en apéndice 3

I). Material para Bioensayo (Infección de muestras de enterovirus)

- Pipetas de 1 y 2 ml.
- Probetas de 100 ml.
- Sistemas de filtración con membranas de 0.22 y 0.45 micras MILIPORE de 250 ml.
- Matraz kitazato de 100 ml. de capacidad.
- Botellas de dilución.
- Tubos de ensayo.

II). Equipo para Bioensayo (Infección de muestras de enterovirus),

- Vortex (Agitador para tubos).
- Multiblock
- Autoclave
- Campana de flujo laminar vertical SAMSON
- Incubadora sencilla para 37 grados centígrados.

III). Reactivos para Bioensayo (Infección de muestras).

- Antibiótico
- Antimicótico
- HEPES 1 M
- Glutamina
- MEM al 2% (Medio esencial mínimo)

Nota: Ver composición en Apéndice 3

I): Material para el manejo de cultivo celular.



- Cajas de plástico CORNING y CUNO de 25,75 y 125 cm<sup>2</sup> como sustrato adherible a la capa celular; de poliestireno estériles.

- Microplacas con 96 pozos y Micropipetas de 0.05, 0.02 y 0.01 ml. APENDORF 4710.

- Puntillas para microplacas con rango de 1 a 250 microlitros.

- Viales de plástico con capacidad de 1.5 ml.

- Pipetas de 1, 2, 5, y 10 ml.

- Botellas de dilución

- Cámara de Neubauer.

## II) Equipo para el manejo de cultivo celular:

- Ultracongelador REVCO de -20 grados centígrados a -70 grados centígrados.

- Tanque de nitrógeno líquido.

- Incubadora doble a 37 grados centígrados.

- Campana de bioseguridad de flujo laminar horizontal o vertical.

- Autoclave.

-Refrigerador doble RHEEM.

### APENDICE 3

Reactivos para cultivo celular (Medios para el crecimiento).

- Medio Esencial Mínimo 2x (MEM 2X)
- Medio RPMI\*
- Medio L15\*
- Suero Fetal Bovino inactivado a 56 grados centígrados durante 30 minutos.
- Antibac (solución de antibióticos).
- Azul de tripano al 0.5%
- Bicarbonato de sodio al 4.4%
- Glucosa al 1%
- Tripsina 2.5 %
- Medio soya tripticasa para pruebas de esterilidad.
- Agar nutritivo para pruebas de esterilidad.
- Agar placa para pruebas de esterilidad
- Versenato de Sodio al 0.05%.

\*Estos medios contienen sustancias necesarias para el crecimiento de células que han sido definidas como aminoácidos, carbohidratos y sales.

Nota: Ver composición y preparación en el apéndice 3

#### MATERIAL DE VIDRIO Y PLASTICO PARA CULTIVO CELULAR.

Los materiales de vidrio desde pipetas a vasos de precipitado y frascos necesitan ser lavados con detergentes de alta solubilidad. Los detergentes Limco y alcoholes para cultivo de tejidos son los más usualmente utilizados, estos deben ser apropiados para el cultivo de tejidos.

El uso de lavado con agua caliente, seguido de agua fría y finalmente con agua destilada.

El hábito de llenar con agua destilada un envase recién usado antes de someter al autoclave evita que las sales se

concentren y los materiales tóxicos se peguen a los frascos. A discreción, el material contaminado o de análisis puede ser llenado de agua antes de meterlo al autoclave, sobre todo los frascos que se utilizan para crecer células. El uso de agua que ha sido destilada solo una vez es suficiente para éste propósito.

La esterilización de vidriería de laboratorio para uso en cultivo de tejidos se hace de preferencia en horno de calor seco a 180 grados centígrados, por un mínimo de 4 horas. La esterilización por horno de calor seco es preferible a la esterilización por autoclave, si la vidriería va a ser utilizada en el cultivo (la esterilización por autoclave es necesaria para frascos que han sido utilizados en los títulos).

La vidriería se tapa con hoja de aluminio en vez de las tapas de plástico, ya que estas pueden derretirse en el horno. Las tapas se pueden esterilizar a parte en el autoclave dentro de cajas petri de vidrio. (28).

#### PREPARACION DE REACTIVOS.

- Solución Salina Balanceada de Hansks (SSB).

Se empleó SSB comercial preparada en MEM con sales Eagle 10x, únicamente se preparaba al 10% con Suero Fetal Bovino, esto es:

Para 100 mL. de medio se utilizan 10 mL de esta solución + 10 mL. de suero fetal bovino + 1 mL. de glucosa y aforar con agua destilada.

- Mezcla de antibióticos.

Se utilizó Antibac y antifung, Solución de pen-strep a 10 000 U:I: 100x.

Se utilizó con 2% de Suero Fetal de Bovino.

- Acido clorhídrico 0.1 N. (Medir 0.817 mL aforar a 100 mL.

- NaOH 0.5 M

- NaHCO<sub>3</sub> al 4.4.%

- Rojo Fenol

- MEM 10X ( Bicarbonato; ajustar a pH Neutral (2mL aprox.), Antibac 1 mL, Suero Fetal Bovino 2 mL, Agua MQ 84 mL, HEPES 1 mL para 100 mL de medio.)

Disolver y filtrar rápido agregar un trozo de hielo seco (para saturación de CO<sup>2</sup>), y cerrar herméticamente, esterilizar por autoclave. (6).

- Medio de Crecimiento.

M199 al 7% de Suero Fetal Bovino y 0.17% de Bicarbonato de Sodio.

- Colocar 80 mL de Agua MQ.
- 10 mL de M199 10X.
- 7 mL de Suero Fetal Bovino.
- 1 mL de Antibac.
- 2 mL de Bicarbonato de Sodio al 4.4%
- Para 100 mL.

- Leibovitz al 2% (medio de mantenimiento)

- Colocar 97 mL. de Leibovitz al 1X.
- 2 mL. de suero fetal bovino.
- 1 mL de antibac, para 100 mL.

- M199 para la congelación de células al 10% de Suero Fetal Bovino y 0.11 de de Bicarbonato de Sodio.

- Colocar M199 10X. 1mL.
- 1 mL. de Suero Fetal Bovino.
- 0.25 mL. de Bicarbonato al 2.5%
- 7.75 mL. de agua Milli Q. Para 10 mL.

NOTA: Para un criotubo colocar 0.930 mL. de medio de congelación con células y 0.070 de Dimetil Sulfoxido para tener una concentración final de 7% de crioprotector.

- Solución de Verseno al 0.05%.

- Solución A.

- Disolver NaCl 8g.
- 0.2g. de KCl.
- 0.2g. de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Disolver en 80 mL de agua y esterilizar en autoclave.

Por otra parte disolver 0.5g. de EDTA en 100 mL de agua

Milli Q. Agregar a ésta 40 mL de solución A y aforar con 860 mL. de la misma agua, para obtener un litro de Verseno al 0.05%.

- Solución de Tripsina-Verseno al 0.05%

- Mezclar 24.5 mL de Verseno al 0.05%
- 0.5 mL. de Tripsina al 2.5% Para 25 mL.

CARACTERISTICAS DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS DURANTE EL BIOENSAYO

Células RD.- Establecidas por McAllister a partir de un rhabdomio sarcoma embrionario maligno, de la pelvis de una niña caucásica de 7 años, en febrero de 1968, con contenido de mioglobina y actividad de miocina AtPasa con viabilidad del 80%

Un inóculo de 10 a la 5 células viables por mililitro se multiplica de 3 a 4 veces en 8 días. La morfología de las células: forma de huso y multinucleadas con un 2n de 46 cariotipos inestable, con un número hiperdiploide bimodal de 49 y 50. Son susceptibles a poliovirus tipos: I, II y III, estomatitis vesicular y herpes simples isoenzimas G6PD tipo CB.

Células Vero.- Proviene de riñón de mono verde adulto, obtenidos en marzo 27 de 1962 por Cyasumura y Kawakita en Japón, viabilidad del 85%, un inóculo de 3 por 10 a la 5

células en 3 mililitros se incrementa 30 veces en 7 días a 37 grados centígrados. Su morfología es semejante a fibroblastos, su cariotipo es  $2n$  igual a 60, es susceptible a polio tipo 3, a Virus Semliki, Paramaviri, Kocobera, Murutucu, Pongola y Tocaribe, no hay actividad de transcriptasa reversa.

Células Hep 2c.- Proviene de carcinoma epidermoide de laringe de un hombre caucásico de 56 años, establecidas en 1952 por A. E. Moore, viabilidad 85%, 10 a la 5 células por mililitro, se multiplican 10 veces durante 5 a 6 días. Su morfología es semejante a células epiteliales, cariotipo  $2n=42$ . son sensibles a polio virulento y avirulento tipo 1, adenovirus tipo 3 y virus de estomatitis vesicular, no se observa actividad de transcriptasa reversa, isoenzima G6PD tipo A. (23).

#### Ventajas y desventajas de utilización :

Las líneas y cepas celulares tienen una desventaja con los cultivos primarios (in vivo), de que por lo general pierden su susceptibilidad a la infección viral. Desde el punto de vista práctico presentan una ventaja sobre cultivos primarios, y es que pueden subcultivarse en cualquier momento y en cualquier cantidad sin desperdicio de materiales tiempo y esfuerzo. (6).

Por las razones anteriores se utilizaron las células RD y Hep 2c en sus líneas continuas.

## ANEXO 1 . METODO PARA CONCENTRACION DE VIRUS.

La concentración de virus esta basada en el principio básico de que el virus se va a adsorber a materiales adsorbentes por medio de la atracción electrostática de cargas opuestas. Los enterovirus a un pH neutral del agua tienen una carga negativa. Un filtro de carga neta positiva es obviamente un sustrato ideal para la adsorción del virus negativo, mientras que el pH del agua sea de 5 a menos de 8. Los cambios de pH en el agua afectan la carga de un virus y este es el principio utilizado en la concentración de un virus por medio de filtros positivos y otros materiales adsorbentes. (1)

Después de que el volumen se ha concentrado en el filtro o material adsorbente se busca entonces recuperar el virus por medio de la elución del virus. La elución es esencialmente el proceso inverso de la adsorción . La desadsorción de los virus se obtiene a un pH alto 9 o 9.5 para filtros positivos y negativos. El extracto de carne es uno de los eluyentes protéicos más comúnmente utilizado, compete con el virus por el sitio de adsorción en el filtro. El resultado neto entre la proteína y el pH neto es una desadsorción más eficiente de los virus. El extracto de carne tiene además la ventaja de ser usado en la biofloculación donde el virus se adsorbe a flóculos orgánicos, permitiendo concentrar aún más la muestra, este precipitado es eluido en solución buffer de fosfatos después de la centrifugación. (22).

**ANEXO 2. TECNICA DE CONCENTRACION DE VIRUS POR ADSORCION A FILTROS POSITIVOS.**

**Muestras de lluvia .**

**A) Colecta.**

1. Recoger el agua de lluvia en un envase limpio sujetado en un soporte de metal a una altura de 1.5m arriba de la azotea, dependiendo el tiempo y duración de esta .

2. La muestra se traslada a laboratorio en condiciones bajas de temperatura en el mismo envase en que fueron colectadas, previamente tapada.

**B) Concentracion de la muestra.**

3. Antes de proceder a la concentración de la muestra se le ajusta el pH 7.

4. Conectar con mangueras al cilindro de presión positiva el cartucho de filtración.

5. Se vierte el agua de lluvia y se filtra con presión positiva no mayor de 1kg./cm<sup>2</sup> ó 12 lb/cm<sup>2</sup> ó 12lb/pulg<sup>2</sup>, hasta filtrar toda el agua.

**Muestras de polvo.**

**A. Colecta de muestra.**

1. Colocar el filtro a una altura de 1.5m arriba de la azotea durante 15 días, pasado este tiempo envolverlo con papel aluminio estéril y transportarlo al laboratorio en condiciones baja de temperatura para su posterior análisis.

**B' Concentración de muestras de polvo.**

3. Se coloca el filtro dentro del portacartuchos y se hace pasar por presión positiva (como en el agua de lluvia).



C) Elución de las muestras.

6. Se vierte el eluyente (extracto de carne al 3% y pH 9.5) en los portacartuchos y se dejan alrededor de 10 minutos.

7. Pasar el eluyente con presión positiva, recolectando todo el eluyente incluyendo la espuma. (14).

D) Biofloculación.

8. Ajustar el pH a 3.5 con HCl 1 N.

9. Agitar el eluido durante 30 minutos.

10. Centrifugar a 6000 rpm por 25 minutos en centrifuga refrigerada.

11. Decantar el sobrenadante y resuspender el flóculo en 12.5 ml . de fosfato disódico a pH 9.5 y mezclar.

12. Ajustar el pH de sobrenadante a 7.2 con HCl 0.1 N.

E) Filtración.

13. Filtrar con membrana de 0.45 micras y guardar a -70 grados centígrados, con suero fetal bovino al 2% para su posterior análisis de Bioensayo. (1).

### ANEXO 3. TECNICA DE CULTIVO CELULAR.

1. Se observan las células y se determina si la monocapa está completa y si el cultivo es necesario.

2. Se decanta el medio de las células asépticamente.

3. Agregar 10 ml . de tripsina-verseno al 0.025% (concentración final de la tripsina) para disgregarlas.

4. Esperar el tiempo necesario para que actúe la tripsina (observar al microscopio) hasta que estén redondas, enseguida golpear el costado de la botella, de tal manera que la capa celular se desprenda.

5. Adicionar medio de crecimiento y homogeneizar por pipeteo suave.

6. Preparar botellas (dilución 1:4) guardando relación de superficie con respecto al cultivo original.

7. Agregar medio de crecimiento a cada botella con relación fluido gas (1:8).

8. Homogeneizar la cantidad de suspensión y etiquetar con línea celular, pasaje, fecha, dilución y nombre.

9. Incubar a 37 grados centígrados. (3).

NOTA: Para la preparación de tubos para el bioensayo se realiza conteo celular a razón de 200 000 cel/ml.

Los cultivos en el laboratorio se pueden mantener mediante subcultivos seriados: al subcultivarse se ejerce una presión selectiva, permitiendo que las células más aptas sobrevivan, mientras que las más sensibles puedan desaparecer el cultivo y con ello quizá las características deseadas del mismo. (14).

#### ANEXO 4 METODO DE CONTEO CELULAR.

1. Tripsinizar las células igual que en la técnica de subcultivo celular.

2. Resuspender con 10 ml. de medio y poner en un tubo 0.9 ml. de azul tripano al 0.5% + 0.1 ml. de suspensión celular quedando una dilución 1:10.

3. Por capilaridad llenar la Cámara de Neubauer y contar los cuadrantes donde se leen los glóbulos blancos que son 4 en cada área, leer las 2 áreas (8 cuadrantes) y sacar el promedio.

4. El cálculo se hace como sigue:

(total de células/el no. de cuadrantes) (dil 1:10) (10000)  
= Volumen Final  
    número deseado de células/ml.  
cita (14).

Para evitar en la medida de lo posible, la pérdida de las características de las poblaciones celulares in vitro, se recurre a métodos como la preservación a bajas temperaturas, con lo cual se abate al máximo el metabolismo celular. Este abatimiento se logra mediante la congelación con nitrógeno líquido o congeladores que alcanzan entre - 196 grados centígrados y -70 grados centígrados y adicionando Dimetilsulfóxido al 10%. Con esta temperatura, la actividad enzimática es mínima sin detrimento de la integridad tanto morfológica como fisiológica de la célula, por lo que le permitirá permanecer viable y reproducirse al restablecerse la temperatura óptima.

El proceso de congelación puede ser letal para cualquier tipo de célula, ya que al congelarse, el agua que posee forma cristales que dañan las diferentes estructuras de las células. Por tal motivo se emplean agentes crioprotectores como Glicerol, Dimetilsulfóxido (DMSO), etc., cuya función es proteger a la célula, evitando la formación de cristales. (3).

ANEXO 5 TECNICA PARA EL CONGELAMIENTO DE CELULAS

Y CONTEO CELULAR.

1. Se utiliza el procedimiento de cultivo descrito para el cultivo celular, hasta obtener células disgregadas en suspensión.

2. Contar las células en la Cámara de Neubauer.

3. Se prepara el medio de congelación al 10% de Dimetil sulfóxido(DMSO), y 10% de Suero Fetal de Bovino en MEM de crecimiento y refrigerar.

4. Contar las células en la cámara de Neubauer a razón de  $2 \times 10^6$  exponente 6/ml. Colocar en viales de 2 ml., etiquetar con los siguientes datos:

fecha, línea celular, y número de pase, cerrar herméticamente.

5. Poner los viales durante una hora a 4 grados centígrados, después pasar los viales a menos 20 grados centígrados durante 1 hora, y por último guardar en congelación a - 70 grados centígrados o bien en nitrógeno líquido. (12,14).

## ANEXO 6 DESCONGELAMIENTO DE CELULAS

La descongelación de células se hace de manera opuesta a la congelación, para evitar al máximo la muerte celular (es decir hacerlo rápidamente).

Temperatura de descongelación de células.

1. Se calienta el medio de crecimiento a 37 grados centígrados y se vierten 8 ml. en una botella de 25 cm<sup>2</sup>.
2. Se saca el vial del REVCO, y se desinfecta con alcohol, vertir el contenido a la botella con pipeteo suave.
3. Se resuspenden y se incuban a 37 grados.
4. Al día siguiente, cuando las células se han adherido a la botella y comienzan a crecer se les cambia el medio para eliminar el crioprotector con el cual se congelaron.(3).

ANEXO 7 FUNDAMENTO DE LOS METODOS PARA LA DETECCION DE VIRUS EN MUESTRAS CONCENTRADAS.

BIOENSAYO EN TUBO.

Los métodos más aceptados acualmente para detectar virus en agua, son aquellos que miden el efecto citopático en cultivos celulares. El efecto se puede medir por la alteración de la monocapa de células sembradas en tubos o en botellas con el método de unidades formadoras de placa.

En la técnica de infección en tubos en medio líquido, los virus se difunden libremente en el medio produciendo un efecto generalizado en la monocapa.

En forma diferente por el método de unidades formadoras de placa (UFP), cuando se infecta la monocapa en medio sólido; esto es cubriéndola con agar, el efecto se produce como un círculo detectable al teñir las células con un colorante específico.

En esta técnica se produce la formación de placas líticas y esto ocurre po el hecho de que los virus sólo pueden difundirse radialmente, infectando así sólo a las células adyacentes. (12).

ANEXO 7.1 DETECCION DE VIRUS POR EL METODO DE ENSAYO EN TUBO.

Este método se recomienda para la detección de muestras que puedan contener baja cantidad de virus o con virus que presenten crecimiento lento como Echovirus.

Si las muestras se inoculan en tubos con células y no se presenta muerte celular, se cosechan nuevamente para aumentar la cantidad de virus posibles en la muestra (aumento de título viral) (12).

ANEXO 7.2 TECNICA DE ENSAYO EN TUBO CON CELULAS VERO, HEP 2C Y RD.

1. Se decanta el medio de los tubos en condiciones asépticas.

2. Se infectan 2 tubos de cada una de las líneas celulares (Vero, Hep2c y RD)., con 0.4 ml. de la muestra original, previamente marcados y etiquetados y se les adiciona 1.5 ml. de medio de mantenimiento.

3. Se incuban a 37 grados centígrados, observándolos al microscopio diariamente y los tubos que presenten efecto citopático positivo se congelan para conservar título viral, y al 7o. día se congelan todos para hacer el siguiente pase, se hace un pase nuevamente y se infectan los tubos confluentes con la mezcla (pool), de los tubos que se infectaron inicialmente y se congelaron; en vez de infectar con las muestras originales.

4. Se hace un pase nuevamente en cultivos celulares en tubo, infectándose con la mezcla de los tubos congelados de la primera inoculación de la misma forma, para aumentar el título viral en algunos casos y en otros para que aparezca el efecto citopático, si es que existe virus. Se pueden repetir los pases dos veces más para confirmar, esto se realiza utilizando medio de mantenimiento. (11).



ANEXO 8. TITULACION DE VIRUS POR EL METODO DE DOSIS INFECTIVA PARA CULTIVO DE TEJIDOS AL 50%. (DICT 50%).

Quando un virus ha sido aislado, el siguiente paso es conocer su potencia, medida en términos de su actividad, es decir determinar la cantidad mínima necesaria en un virus que produce una respuesta específica en un huésped determinado y que suele ser de todo o nada.

A la determinación cuantitativa de la actividad viral se llama Titulación. La titulación de un virus se parece a una cuenta viable bacteriana, ya que la multiplicación viral, nos da como resultado una amplificación de los efectos producidos por la mínima cantidad de virus llamado unidad infectiva. Corresponde a un solo elemento, ya sea un virión o una molécula de ácido nucleico infecciosa, por lo que el título de una infección viral se da en términos del número de unidades infectivas por unidad de volumen.

Este procedimiento, requiere de sistemas sensibles, que permiten discriminar con facilidad la respuesta positiva, que puede ser la presencia o daño en un cultivo celular etc. (8).

Quando se trabaja con organismos vivos, ya sea en animales o cultivos celulares, que en apariencia son iguales, en relación a la edad, peso, etcétera, la respuesta no es homogénea, ya que en cualquier población existen individuos resistentes y otros muy susceptibles, por lo que es necesario hacer la determinación al 50%, es decir, se emplea un método estadístico, que permita eliminar los extremos y determina el título en la región de la curva, donde la relación Dosis-respuesta es lineal.

El título del virus, calculado de esta manera, corresponde a la inversa de la dilución de dicho virus, en donde la mitad de los individuos o cultivos inoculados dan respuesta positiva. Si el sistema utilizado son cultivos celulares, el título se expresa en dosis infectiva para cultivos de tejidos al 50% (DICT 50%).

La titulación de partículas virales requiere en la mayor parte de los casos métodos indirectos, dado que es difícil, complicado o muy caro visualizar los virus directamente. Estos métodos se basan en la propiedad de los viriones de

provocar una acción biológica específica que es posible cuantificar.

Se utilizan dos tipos de métodos para evaluar la acción de una población de partículas virales:

1. Los de tipo enumerativo, que consisten en contar el número de lesiones específicas provocadas por los virus.

2. Los de tipo cuántico o de todo o nada, que miden la relación del número de respuestas positivas (presencia de lesiones específicas), con respecto al total de muestras posibles. (1).

A una técnica de inoculación en un sistema sensible, se le asocia un método de cálculo, de esta forma el tipo enumerativo se aplica a la técnica de placas; en tanto que el tipo cuántico, se haya ligado a los métodos de inoculación en medio líquido.

Sin embargo, los diferentes métodos de cálculo, no tienen las mismas ventajas. Así en el tipo enumerativo, la precisión ( y por tanto el intervalo de confianza) es función del número de lisis o de placas líticas observadas. Se desconoce la probabilidad de multiplicación viral en una mezcla de viriones, y es imposible preveer el número de agregados de virus, que provocan una sola placa de lisis, y como consecuencia el análisis de varianza no puede ser aplicado sistemáticamente al comparar resultados. El tipo cuántico, por el contrario, tiene la ventaja de dar un resultado cuya precisión depende ante todo del número de inóculos realizados en cada nivel de dilución y en estas condiciones el análisis de varianza para comparar resultados puede aplicarse en la mayor parte de los casos. Con un número suficiente de inóculos, la estimación de tipo cuántico responde a las cualidades que se le pueden exigir:

- dar resultados confiables (intervalo de confianza pequeño)
- es convergente ( los resultados son mejores cuando el número de individuos es observado o analizados aumenta).
- es poco o no sesgada.

Entre las metodologías del grupo cuántico se tiene la que utiliza como precedente los resultados suministrados por la inoculación a monocapas celulares de una suspensión viral diluida y subdividida en numerosas fracciones, observándose los tubos y/o frascos donde haya sucedido una destrucción celular, estimando el número más probable de unidades citopáticas. La validez del cálculo reposa en dos hipótesis esenciales:

- la presencia de un virus es suficiente para provocar una destrucción de la monocapa celular, y la viabilidad total significa la ausencia de virus.

- los virus se distribuyen al azar en la muestra, lo que significa que cada virus tiene la misma probabilidad de encontrarse en el inóculo dado.

El principio de este método se denomina principio de máxima verosimilitud.

El número más probable de unidades citopáticas, se calcula generalmente a partir de un conjunto de resultados positivos obtenidos para diluciones sucesivas. Es estimado por el valor máximo de la función de verosimilitud  $L(U)$ , que en cada valor de la densidad viral  $U$  asocia la probabilidad de aparición del triplete de resultados utilizados. La ecuación a resolver es compleja y requiere del uso de un ordenador.

Como se mencionó en un principio, el estimado de partículas virales depende del tipo viral buscado y del método utilizado. El número de virus entéricos que producen un claro efecto citopático es pequeño, por lo que se han desarrollado los siguientes métodos para detección de células infectadas cuando hay ausencia de degeneración. (5).

ANEXO 8.1 TECNICA DE TITULACION DE VIRUS..

1. Disgregación y siembra de las células.

a) Proceder de acuerdo a la técnica de disgregación celular descrita en la técnica de cultivo de células.

b) Tomar una alícuota de la suspensión y contar las células en una cámara de Neubauer.

c) Ajustar la suspensión a 250 000 cel/ml.

d) Adicionar 50 microlitros de la suspensión celular ajustada en cada uno de los pozos de la microplaca.

2. Titulación del virus o muestra problema.

a). Preparar diluciones logarítmicas en base 10 de la muestra original, desde 10 a la menos 1 hasta 10 a la menos 10. obteniendo un volumen final de 4.5 ml. de cada dilución.

b) Tomar 100 microlitros de cada dilución y depositarlos en cada uno de los pozos de la microplaca. Utilizar 8 pozos por dilución.

c).- No olvidar incluir los testigos negativos y los positivos. Para el testigo positivo utilizar 100 microlitros por pozo del virus polio tipo 1, y para el testigo negativo emplear 100 microlitros de suspensión celular, con medio de mantenimiento.

d) Incubar la microplaca a 37 grados centígrados en la atmósfera de la incubadora.

e). Observar diariamente al microscopio anotando los pozos que presenten efecto citopático.

f).- Calcular el título de la muestra por el Método de Spearman-Karber. (8).

#### ANEXO 9. METODO DE SPEARMAN-KARBER.

Este método se utilizó para sacar los títulos de las muestras.

La fórmula de Karber es un método que emplea puntuaciones numéricas para valorar las respuestas positivas y negativas del daño celular. El 50% en el punto final puede ser utilizado en varios tipos de reacciones, la que si interesa es virus y cultivo de tejidos, en la cual DICT 50% representa la dosis que se necesita para producir cambios citopáticos en el 50% de los cultivos inculados.

La fórmula para calcular el título de una suspensión de virus es la siguiente:

$$\log \text{ del punto final } 50\% = m - (f)(d) (s - 0.5)$$

donde:

m = logaritmo de la dilución que contiene la mayor concentración del virus.

(f)(d) = logaritmo del factor de dilución

s = suma de los porcentajes positivos a cada dilución.

0.5 = constante utilizada en todos los casos. (8).

Ejemplo de Titulación del virus Polio Tipo 1

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P	Cálculos
10 exp-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		10/10=1.0
10 exp-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		10/10=1.0
10 exp-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		10/10=1.0
10 exp-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		10/10=1.0
10 exp-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		10/10=1.0
10 exp-6	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0		6/10=0.6
10 exp-7	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0		1/10=0.1
10 exp-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0/10=0
10 exp-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0/10=0
10 exp-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0/10=0
Control celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		Sumatoria s= 5.7

$$\text{Log50\%} = m - f(d) [s - 0.5]$$

$$= -1 - (+1) [5.7 - 0.5]$$

$$= -1 - 1 [5.2]$$

$$= -1 - 5.2$$

$$\text{Log50\%} = -6.2$$

$$\text{Volumen inoculado} = 0.1 \text{ mL}$$

$$\text{Título} = 10 \text{ exp } 6.2 / 0.1 \text{ mL}$$

ANEXO 10. IDENTIFICACION DE ENTEROVIRUS POR NEUTRALIZACION  
(BATERIAS DE MELNICK).

Se utilizan los sueros del Lim- Benyesch-Melnick (LBM), pools identificados con las letras de la A a la H para la identificación de 37 enterovirus.

Procedimiento.

De cada microplaca se podrán identificar 4 muestras simultáneamente, en las columnas de 1, 2, 3, 4. respectivamente corriéndose por duplicado.

Del lado derecho se identificarán perfectamente cada antisuero.

Las cavidades sobrantes se utilizarán como controles, así tenemos en E una dilución 1:2 del virus, el cual estará previamente ajustado a una dilución de 10 a la - 5 en la fila 10.

En la fila 11 y 12 estará marcado con E1 y E2, las cuales representarán las diluciones 1:20 y 1:200 respectivamente.

Estos controles se harán para cada muestra..

Para cada muestra a identificar será necesario la titulación del virus, la cual se ha realizado previamente.

El material deberá estar perfectamente limpio y esterilizado.

Preparación de la muestra para su identificación.

1. Descongelar la muestra que deberá estar a - 70 grados centígrados y agitar uniformemente.

2. Hacer una dilución de la muestra viral 10 a la -5 en solución salina.

3. De esta dilución partir para las diluciones ( 1:2, 1:20, 1:200).

4. Estas diluciones se harán como controles, por lo que se harán para cada muestra.

5. Adicionar de la dilución de trabajo ( dilución 10 a la menos 5 de la muestra) 0.025 mililitros a cada una de las cavidades de la microplaca.

6. Para los controles se adicionarán 0.05 mililitros de cada una de las diluciones.

7. Posteriormente adicionar 0.025 mililitros de cada antisuero en la fila correspondiente.

8. Agitar la placa e incubar a 37 grados centígrados durante dos horas.

9. Preparación de la suspensión celular ajustada a 50000 células / mL.

10. Después de la incubación, agregar 0.2 mililitros de la suspensión celular.

11. Agitar perfectamente e incubar a 37 grados centígrados, observar las microplacas al tercero, quinto y séptimo día, para valorar el efecto citopático.

12. En caso de no ser posible la identificación con virus, se realizará nuevamente la prueba, utilizando el virus a 200 DICT50%. (6).



## CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. APHA., 1981., Standard Methods for the examination of the water and wastewater, 15a. Ed., Washington., D.C.

2. ARNASON., et., al, 1984, Acute Inflammatory Lemylia-nating, Polyneuropathies in: Dyck P. J. Thomas, Lambert G, Bunge R, Edits. Preripheral Neuropathy p. 2050-2100. 2a-Edition, Phyladelphia, Saunders, C.

3. BARRON, R, 1989, Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Departamento de Microbiología, México, D.F.

4. BITTON, G. 1980, Introduction to environmental Virolgy, J. Wiley & Sons, New York, p. 326.

5. BLOCK, S. et al, 1982, Methodes de quantification in analyse virologique des eaux technique et Documentation Lavoisier, Paris France, p. 113-142.

6. CLEMENT, O, 1970, Termoestabilidad de la Cepa L.S.C. Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Título Biólogo.

7. CUNO, 1992, The Filtration Source Book, Cuno Inc, 400, Research Parkawag Meriden, C.T. 06450 U.S.A.

8. CUNNINGHAM, Ch, 1971, Virología Práctica, 6a. Edición, Edit. Acribia, Zaragoza España.

9. CHALAPATI, M. et. al, 1986, Human Viruses in sediments, sludges, & soils, Bolletin of the World Organization. 64(1) L.14.

10. DAVIS, D., et al., 1983, Tratado de Microbiología, 2a. Edición, Salvat Editores, 1304-1329.

11. DE LEON, R. et al., 1988, Curso Internacional sobre Virología y Parasitología de Aguas Residuales, Universidad de Arizona, Tucson, E.U.A., 26 sep- 7 oct.

ESTA TESIS NO PUEDE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

12. D.G.C.O.H., 1984, Establecimiento de la Metodología para el análisis de virus en muestras de agua potable y renovada en el L.C.C., 3.33.2.526.4.33.2.819.
13. D.G.C.O.H., 1984, Identificación de virus en agua potable, Informe Técnico, 6.33.1.1.0347.
14. D.G.C.O.H., 1986, Manual de muestreo y análisis de agua potable, residual y renovada, Vol. VII, Informe Técnico, 6.33.1.0.426.
15. D.G.C.O.H., 1990, Manual de muestreo y análisis de agua potable, residual y renovada, Vol., VIII, Informe Técnico. 6.33.1.0926.
16. ELISHAHAR, M., et al, 1990, Benefit of intravenously administered immune serum globulin in patients with O Willain-Barré Syndrome, The Journal of Pediatric 116(1120-1125).
17. FEACHEM, G., et al, 1982, Enterovirus en el Medio Ambiente, Foro Mundial de la Salud 3(2) 104-206.
18. FENNER & W., et al, Virología Médica, R.Ed. La Prensa Médica Mexicana. p. 314-331.
19. FERNANDEZ, A, 1991, Detección de bacterias coliformes fecales y virus entéricos en Rábano (*Raphanus sativum*) irrigados con agua renovada del Canal de Acalpixca de Xochimilco, Tesis Profesional, Universidad Motolinía, Tesis I. en Alimentos.
20. FIORE, L. et al, 1989, Antigenic & Biochemical characterization of poliovirus tipe 2 isolated from two cases of paralytic disease, Intervirology, 27:196-204.
21. FULGINIT, U., et al, 1984, Inmunizaciones en la Práctica Médica, El Manual Moderno, México, p. 144-145.
22. GOYAL, S. et al, 1982, Concentration of virus from water by membrane filters, Inc Gerba & Eds, Manual Dekler, New York, p. 59-116.

23. HAY, R. 1988, Catalogue cell Lines & Hibridomas, American Type Culture Collection 6th, Edition, 408 p.
24. JAUREGUI, E. 1986, Incidence of respiratory illness and air pollution levels in Mexico City, Memorias, Simposium sobre clima y salud humana OMS/DMM/PNUMA/ Nëm-
25. JAUREGUI, E. 1987, El deterioro de la Calidad del aire en el valle de México, 1940-1987, Centro de Ciencias U.N.A.M. Congreso Saneamiento Ambiental, El Gran Reto, Qro. Qro., Agosto, 1987.
26. JAUREGUI, E. 1983, Visibility trends in Mexico City, Ed. Kunde, Vol. 37 296-299.
27. JAWETZ, E. 1985, Microbiología Médica, Ed. El Manual Moderno, México, D.F., 588 p.
28. L.C.C., 1990, Curso de Virología, Parasitología organizado por la Comisión Nacional del Agua, para empleados y técnicos del Laboratorio Central de Control de la Calidad del Agua, Jun-Jul.1990.
29. LEAL, L, 1987, Calidad del aire en el area metropolitana de Monterrey Nvo. León, México, Congreso Nacional de Saneamiento Ambiental, El Gran Reto, Qro. Qro. 10-13-08-87.
30. LENNETTE, E. 1979, Diagnostic procedures for viral, rickettsial & chlamydial infections, 5a. Ed. American Public Health Association.
31. MANJARREZ, E. 1991, Virus Sincitial Respiratorio, Revista del INER, V.4 (203-208).
32. MELNICK, J. 1986, Enteroviruses, Chapter XV.
33. MELO, M. 1991, Utilización del Método de Concentración ácida para aislar el virus causante de parálisis flácida en niños de los cuales no se aisló por el método clásico de cultivo directo. Tesis Profesional. U.N.A.M, F.E.S. Cuautitlán QFB.

34. MOTA, F. 1991, Boletín Mensual de Epidemiología, V. 6 (160-163).
35. NELSON, W., 1977, Tratado de Pediatría, V. I 6a. Ed., Salvat Editores. (975-989).
36. O.M.S., D.G.E., 1988, Guía de Procedimientos seguidos para el aislamiento, identificación y serología de poliovirus/enterovirus.
37. PAYMENT, P., et al, 1989, Coliphages & enteric viruses in the particulate phase of river water V. 34 No. 7 Journal Canadian of Microbiology (907-910).
38. PAYMENT, P., 1988, Viruses removal by drinking water treatment processes critical reviews in environmental control, Issue I. V. 19, Quebec, Canadá.
39. PHAFF, H., 1981, Industrial Microorganism. Scintific American. 245:(52-65).
40. PLAN HIDRAULICO, 1980, Por Delegación: Alvaro Obregón, Azcapotzalco, Iztapalapa, Tlalpan y Venustiano Carranza, D.D.F., D.G.C.O.H.
41. RAO, Ch, et al, 1986, Human viruses in sediments, sludges and soils. Bolletin of the world health organization 64(1):1-14
42. ROPPER, A., 1988, Camphylobacter diarrea & Guillein-Barré Syndrom, Anch Neurol, 45-604.
43. SABIN, A., 1981, Paralytic poliomyelitis: Old dogmas & new perspectives. Rev. Infectology 3(3) 543-564.
44. SAURI, A., 1988, Modelo para un plan maestro de la administración de la Calidad del aire en el Valle de México, Tecnológico del Medio Ambiente, S.A. de C.V.

45. SOKOLOVA, T., 1991, Aktivavoet fermentov sistemy interferona, Pri virusa y Kh zaboaye vaniya Kh. Byulleten Eksperimentalnoy biologii i meditsiny 5:515-516.

46. SPILLMAN, S., 1987, Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment, applied and environmental microbiology. Sep. V-53 No. 9 (2077-2081)

47. TAPIA, R., 1990, Encuesta Nacional de Seroepidemiología II, Poliomiélitis. V. 5 No. 8.

48. VEGA, F., 1990, Las infecciones agudas de las vías respiratorias en niños, Rev. Facultad Medicina, U.N.A.M. 30:6 Nov.Dic. (421-423).