



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**Presencia de virus entéricos en agua:
efecto de la calidad del agua sobre su
estabilidad e infectividad.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. ANA CECILIA ESPINOSA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART

México, D.F.

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

APOYOS RECIBIDOS

El trabajo de tesis fue realizado con apoyo del proyecto “Calidad microbiológica y química del agua en sistemas acuáticos de la Ciudad de México” CONACYT 32505-T y el proyecto “Evaluación de la desinfección en sistemas acuáticos en función de bacterias, virus y bacteriófagos” DGAPA IN-219303.

Parte del trabajo fue desarrollado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el apoyo del grupo de investigación dirigido por el Dr. Carlos F. Arias Ortiz y la Dra. Susana López Charreton.

Así mismo, se agradece al CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera han colaborado para que este trabajo de tesis llegara a su culminación.

En primer lugar deseo agradecer a la Dra. Marisa Mazari Hiriart por apoyar mi interés de trabajar con virus entéricos (en lugar de fagos), a pesar de que eso tuviera implicaciones con respecto al espacio e infraestructura con la que podíamos contar en el laboratorio. Agradezco el tiempo y esfuerzo dedicados a este proyecto. Muchas gracias por la confianza y paciencia. También por su apoyo para presentar los avances del trabajo en foros internacionales que me permitieron conocer no solo a investigadores del área, sino también porque me han dejado ver el amplio panorama en el que se desarrolla la Virología ambiental, y además porque puedo tener una idea de cual es la condición de México en esta área de estudio.

Quiero agradecer al Dr. Carlos F. Arias Ortíz por brindarme constantemente tiempo, espacio y recursos en su laboratorio, sin los cuales los experimentos de infectividad y qRT-PCR, hubiera sido mas complicado realizarlos. El formar parte de mi Comité Tutorial, su interés y apoyo fueron fundamentales para que el trabajo de tesis llegara a este punto. Gracias por que siempre sentí su disposición para resolver los problemas y para que el proyecto llegara a su conclusión.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por formar parte de mi Comité Tutorial por sus asesorías, y valiosas aportaciones a este trabajo de investigación.

Al Dr. Suresh D. Pillai de *Texas A & M University*, por recibirme en su laboratorio y brindarme el entrenamiento básico para concentrar muestras ambientales de agua subterránea y superficial. Así como, por motivarme para iniciar el trabajo de virus entéricos en matrices vegetales.

A la Dra. Yolanda López Vidal de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su asesoría, por el interés en el avance de mi proyecto, por la lectura crítica de esta tesis y por su entusiasmo para trabajar con una visión de interdisciplina. Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su apoyo y por brindarme un entrenamiento básico en la técnica de PCR.

A los compañeros del IBT-UNAM, por su cordialidad y por ese ambiente de trabajo que motiva. Especialmente a la M en C Rafaela Espinosa por su apoyo en los experimentos con rotavirus, por sus enseñanzas y el tiempo dedicado a mi proyecto. Igualmente agradezco al Dr. Ernesto Méndez por su ayuda e interés en los experimentos con astrovirus. A la Dra. Liliana Maruri por aceptar ayudarme con las PCR en tiempo real a pesar de tener el peso de su propio proyecto de tesis.

Gracias a los miembros del jurado Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dra. Marisa Mazari Hiriart, Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Valeria Souza Saldivar, Dr. Fernando Esquivel,

Dra. Blanca Jiménez Cisneros y al Dr. Ernesto Méndez Salinas, por sus valiosos comentarios y aportaciones.

A mis compañeros de generación por las horas/risa, por la solidaridad en los momentos difíciles (entiéndase baches académicos) y por su colaboración. Por ese inolvidable curso de campo.

A mis compañeros del laboratorio, a los actuales y a los que ya se fueron, por su apoyo, por la horas compartidas, las amenas e interesantes conversaciones, las discusiones y por supuesto el café!. Gracias por confirmar que siempre se aprende algo de los demás.

A Paola Cisneros por su valiosa colaboración durante los muestreos y la concentración de muestras ambientales.

A Elia Karina por ser mi amiga, por escucharme, por su compañía en los momentos tristes y también en los de celebración, gracias.

Agradezco de corazón a mis padres quienes me apoyaron en todos sentidos durante todo el proceso, saben bien que los quiero mucho. Por supuesto este logro también es de ustedes.

A mis hijas Daniela y Eugenia gracias, por ser tan tolerantes conmigo y por disfrutar juntas de las cosas simples que aparentemente son pequeñas.

Por acompañarme en lo que emprendo y por ser tú...gracias Javier.

INDICE

Indice	1
Resumen	3
Abstract	7
Organización de la tesis	11
Capítulo 1	
Introducción	15
Objetivos	
Referencias	
Capítulo 2	
Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública	33
Introducción	
Virus en sistemas acuáticos	
Enfermedades de origen viral relacionadas con agua	
Implicaciones en salud pública	
Métodos para la detección de virus en agua	
Métodos de control	
Conclusiones	
Capítulo 3	
Virus entéricos y bacterias indicadoras para evaluar la calidad del agua en el sur de la Ciudad de México	47
Introducción	
Material y métodos	
Resultados	
Discusión	
Referencias	
Capítulo 4	
Infectividad y estabilidad de rotavirus y astrovirus en agua subterránea y superficial	83
Introducción	
Material y métodos	
Resultados	
Discusión	
Conclusiones	
Referencias	
Capítulo 5	
Consideraciones finales y perspectivas	97

RESUMEN

En esta investigación se evalúa la presencia y actividad de virus entéricos en agua superficial y subterránea, de la zona de Xochimilco ubicada al sur de la Ciudad de México. La zona de estudio tiene importancia histórica y cultural reconocida por la UNESCO, así como ecológica ya que parte del sistema se ha declarado Área Natural Protegida. Además, de ser una zona de importancia por la práctica de agricultura periurbana y la reutilización de agua residual tratada.

Se detectaron enterovirus, rotavirus y astrovirus en agua superficial del sistema lacustre de Xochimilco, utilizando técnicas moleculares. La frecuencia con la que se detectaron los virus muestra una tendencia estacional, siendo la temporada fría-seca (noviembre a febrero), cuando son más frecuentes. En agua subterránea no se detectaron ninguno de los virus considerados. Los enterovirus se presentaron en un mayor número de muestras, siguiendo rotavirus, mientras que astrovirus se presentó en el menor número de muestras.

En laboratorio, se realizaron experimentos para evaluar la infectividad y persistencia de los genomas de rotavirus y astrovirus en agua superficial y subterránea proveniente de la zona de Xochimilco. Por otro lado, se evaluó su tolerancia al cloro como método de desinfección más comúnmente utilizado. La reducción de infectividad fue mayor para astrovirus en comparación con rotavirus, y fue mayor para ambos tipos virales en agua superficial con respecto al agua subterránea. Debido a la correlación obtenida entre la infectividad viral y la persistencia de genomas, los resultados apoyan el uso de genomas para la evaluación de la contaminación viral en agua superficial. Rotavirus y astrovirus son tolerantes a concentraciones de cloro residual de 2 mg/L, mostrando una reducción de infectividad de 0.78 y 1.3 logaritmos respectivamente.

Este trabajo aporta datos para México sobre frecuencia estacional de virus entéricos en agua superficial, en una zona de clima tropical de altura. Se indica que los genomas virales son buenos indicadores de contaminación viral. También, se aporta evidencia de que los niveles de cloro residual establecidos en la norma oficial mexicana (NOM-127-SSA1-1994), no garantizan la desinfección viral del agua para uso y consumo humano.

ABSTRACT

This research project evaluates the presence and activity of enteric viruses in surface and groundwater in the Xochimilco area, located South of Mexico City. The study area is important from historical and cultural perspectives, is recognized by the United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization (UNESCO), as well as its ecological relevance as reflected in its being declared as a Natural Protected Area. It is also a periurban agricultural area, with reuse of treated wastewater.

In samples from this area and utilizing molecular techniques, enterovirus, rotavirus, and astrovirus were detected in surface water of the Xochimilco aquatic system. The frequency with which viruses were detected demonstrated a seasonal tendency, with the dry-cold season (the months of November to February) exhibiting highest frequency of virus presence. No virus studied was detected in groundwater. Regarding their relative abundance, viruses were present in water samples in the following decreasing order: enterovirus; rotavirus, and astrovirus.

Laboratory experiments were performed to evaluate rotavirus- and astrovirus-genome infectivity and persistence in both surface and groundwater from the study area. On the other hand, tolerance to chlorination, the most common disinfection method, was also evaluated. Infectivity reduction was higher for astrovirus as compared with rotavirus for both viral types in surface water as compared with groundwater. Based on the correlation obtained between viral infectivity and genome persistence, results support genome utilization for viral contamination evaluation in surface water. Rotavirus and astrovirus are tolerant toward residual chlorine concentrations of 2 mg/L, registering infectivity reduction from at 0.78 and 1.3 logarithms, respectively.

This research provides data for Mexico concerning enteric-virus seasonal frequency in surface water in a highland tropical area. Viral genomes are good viral-contamination indications, and also supply evidence that chlorine levels established by the Mexican regulations (NOM-127-SSA1-1994) with respect to current residual chlorine levels do not guarantee viral disinfection for water for human use and consumption.

ORGANIZACION DE LA TESIS

Esta tesis esta organizada en cinco capítulos, como se describe a continuación.

Se presentan antecedentes sobre el desarrollo de la Virología ambiental como un área del conocimiento que estudia a los virus en matrices como agua, suelo, aire y alimentos. Cómo éstas intervienen en su presencia, infectividad y dispersión, incluso de una matriz a otra. Se revisa la idea de considerarlos contaminantes cuando se trata de virus humanos que son eliminados por individuos infectados y que constituyen un riesgo potencial para la población expuesta. El manejo del agua como un elemento básico en la presencia y dispersión de los agentes virales, es analizado en el contexto de una población humana en crecimiento que demanda agua y alimentos, pero que también produce aguas residuales que pueden afectar directa e indirectamente el agua para consumo y para la producción de alimentos. El uso de indicadores bacterianos deja clara la necesidad de incluir a los virus entéricos o algún indicador de su presencia en las normas de calidad de agua para consumo. Por último, se revisan los efectos sobre salud pública y los sistemas de vigilancia epidemiológica, que para el caso de infecciones virales enfrenta una carencia de información específica, lo que impide dimensionar adecuadamente el problema (Capítulo uno).

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de analizar la situación en la que se encuentra la investigación sobre virus en sistemas acuáticos. Se analizan algunos trabajos sobre la presencia de virus en sistemas acuáticos marinos, salobres y dulces. Se revisan los métodos comúnmente utilizados para su concentración a partir de agua con diversas características, así como también los métodos para la detección de virus entéricos. Por otro lado, se revisa cuál es el impacto de los virus entéricos sobre la salud humana, resaltando la necesidad de realizar investigación en esta área en México, así como en otros países tropicales (Capítulo dos).

Se presentan los resultados de los muestreos de agua superficial utilizada para riego agrícola y agua subterránea utilizada para consumo, que fueron

analizados con el propósito de detectar enterovirus, rotavirus y astrovirus. Paralelamente se realizan ensayos para la cuantificación de bacterias indicadoras (coliformes) de contaminación fecal que se utilizan para la evaluación de calidad del agua de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas (Capítulo tres).

Se realizaron experimentos para determinar el tiempo durante el cual rotavirus y astrovirus permanecen infecciosos y estables, al ser inoculados en agua superficial y agua subterránea. Ambos tipos de agua se mantuvieron en condiciones similares a las naturales. Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos para determinar la tolerancia de los virus al cloro, desinfectante comúnmente utilizado, considerando los límites superior e inferior de cloro residual que señala de norma oficial para agua de uso y consumo humano (Capítulo cuatro).

A manera de consideraciones finales, se revisan los aportes de esta tesis y los retos futuros, tanto metodológicos, como de integración interdisciplinaria. Lo anterior se propone como una opción para evitar las visiones parciales de una problemática ambiental global que requiere de soluciones globales y cada vez más urgentes (Capítulo cinco).

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Virología ambiental

El interés sobre la presencia de virus animales en el ambiente y su relación con agua, suelo, aire y alimentos, así como su transmisión hacia a otros hospederos, ha motivado un desarrollo constante de la Virología ambiental.

Los inicios de la Virología ambiental como disciplina científica se remontan a más de 60 años atrás con los primeros trabajos de detección de poliovirus en agua de diferentes tipos y en monos a los que se les infectó artificialmente y que desarrollaron la enfermedad (Paul *et al.*, 1940; Paul y Trask, 1942; Rao y Melnick, 1986).

En la década de 1940 la poliomielitis empezó a ser considerada una infección entérica debido a que el virus fue aislado de heces fecales de pacientes enfermos y de portadores sanos. Fue a partir de éste hallazgo que surgió la pregunta sobre si era posible que el virus de la poliomielitis se transmitiera a través del agua (Maxcy, 1943). En los siguientes años se realizaron investigaciones sobre la presencia y la infectividad de poliovirus en agua residual y se encontró que grandes cantidades de virus estaban presentes en el agua y que además permanecían infecciosos por varias semanas (Metcalf *et al.*, 1995). El descubrimiento de coxsackievirus y echovirus, que tenían en común con poliovirus características físicas, químicas y que su hábitat también era el tracto intestinal humano, dieron la pauta para reconocerlos dentro de una misma familia (Metcalf *et al.*, 1995).

Los brotes de enfermedades de origen viral han sido eventos importantes en la historia de la Virología ambiental, ya que han representado oportunidades para avanzar en el conocimiento de estos agentes. Por ejemplo, en la epidemia de hepatitis en Nueva Delhi entre diciembre de 1955 y enero de 1956 que afectó a 29,000 personas, se estableció que el origen fue el consumo de agua contaminada seis semanas antes del brote epidémico. Al entender cual fue la fuente de contaminación del agua, en la planta potabilizadora que abastecía a la ciudad, se trató el agua con floculantes y se adicionaron altas dosis de cloro, con el fin de evitar infecciones bacterianas y virales en los consumidores. Sin embargo, no fue posible impedir esta histórica epidemia de hepatitis viral, que

años después se identificó que la causa fue el virus de hepatitis E (Viswanathan, 1957; Wong *et al.*, 1980). La magnitud del brote epidémico motivó a que en 1958 se creara *National Environmental Engineering Research Institute* (www.neeri.res.in). Posteriormente Joseph L. Melnick y Craig Wallis fundaron el grupo de Virología ambiental de *Baylor College of Medicine* en Houston (Rao y Melnick, 1986).

En 1965 se realizó el primer congreso internacional sobre Virología ambiental en Cincinnati con el título de “Transmission of viruses by the water route”, dirigido a la necesidad de desarrollar métodos para la detección de virus en agua, la identificación de dosis infecciosas, así como conocer su supervivencia bajo condiciones que las bacterias no toleran (Berg, 1967; Gerba y Goyal, 1982).

En la década de 1970 se aportaron datos importantes acerca del papel de ostras y almejas en la transmisión de enfermedades virales, llegando a la conclusión de que, si éstos organismos se desarrollan en agua contaminada con heces fecales humanas, acumulan virus entéricos y los consumidores pueden infectarse al comerlos crudos o mal cocidos. En 1988 se registró en Shanghai la epidemia más grande asociada al consumo de ostras en la que enfermaron 300,000 personas (Cooksley, 2002).

En el congreso internacional “Virus in water” que se llevó a cabo en la Ciudad de México en 1974, se revisaron los avances metodológicos de la década y se discutieron propuestas acerca de cual debería ser la cantidad permisible de virus en agua. La Organización Mundial de la Salud (WHO) propuso que el agua para consumo humano debería tener 0 virus/10 L de agua; Melnick propuso que para agua de uso recreativo el límite fuera de no más de 1 unidad formadora de placa (UFP) por 40 L y de no más de 1 UFP por 400 L en agua para consumo humano; Berg propuso que no debería existir un límite permisible. En esta misma reunión se discutió que los límites permisibles de virus en agua deberían considerarse para el agua que se utilizara en el cultivo de almejas y ostras, en riego agrícola y en uso de agua reciclada (Rao y Melnick, 1986).

En 1982 se realizó otro simposio internacional “Virus Entéricos en Agua”, en Israel. En esa ocasión se discutió sobre los esfuerzos y costos para tener agua

libre de virus, y si éstos eran justificables en términos de salud pública. Al final no se llegó a establecer un estándar y la discusión continúa abierta. No obstante, en países como Estados Unidos y Canadá, dentro de sus regulaciones para agua potable, se ha establecido que el tratamiento de potabilización debe garantizar la remoción/inactivación del 99.99% de los virus (USEPA, 2001; FPT, 2008).

Posteriormente ocurrieron avances importantes en cuanto a los métodos de detección y de concentración de virus a partir de muestras ambientales. Se reconoció al virus de hepatitis E (VHE) como entérico, capaz de producir epidemias de origen hídrico; se desarrollaron métodos para concentrar virus de hepatitis A (VHA) en agua; se reconoció la relación de VHA en epidemias de origen hídrico; se demostró la relación de rotavirus humano en diarreas infantiles; se recuperaron adenovirus, calicivirus y astrovirus en heces de niños con gastroenteritis aguda; se reconoció que brotes de hepatitis y gastroenteritis pueden de ser causados por la transmisión de virus entéricos desde el ambiente. Se sugirió que la población humana está expuesta a virus entéricos a través de varias rutas como son: el consumo de ostras y mariscos cultivados en agua contaminada; consumo de vegetales cultivados con agua residual o residual tratada, o fertilizados con heces fecales o lodos provenientes de plantas de tratamiento; uso de aguas recreativas contaminadas y consumo de agua contaminada (WHO, 1989; Metcalf *et al.*, 1995; WHO, 2003). Esquemáticamente estas relaciones pueden mostrarse como se representa en la Figura 1.

En la actualidad la investigación en Virología ambiental se enfrenta a retos como el estudio de norovirus que es reconocido como unos de los principales agentes causales de gastroenteritis por consumo de agua y alimentos contaminados (Lodder y de Roda, 2005) y que no se ha logrado cultivar en laboratorio, lo cual dificulta la realización de estudios de persistencia, infectividad y tolerancia en diversas condiciones ambientales. Otro caso es el del virus de hepatitis A, del que también se desconocen sus tiempos de persistencia en el ambiente.

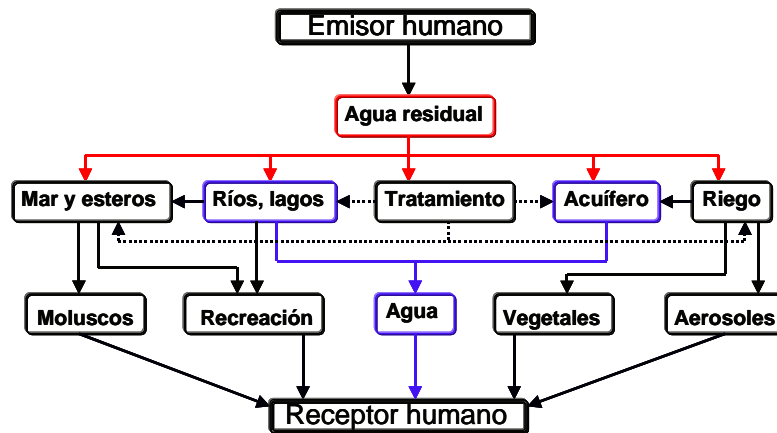


Figura 1. Transmisión de virus entéricos a partir de diferentes componentes ambientales. (Adaptado a partir de Pina, 2001).

Por otro lado, a pesar de que se han logrado interesantes aproximaciones, aún no se cuenta con un agente viral que pueda ser utilizado como indicador de contaminación viral fecal en agua y alimentos.

Los métodos y tecnología de PCR en tiempo real y secuenciación, permiten identificar, cuantificar y establecer el origen de brotes epidemiológicos, sin embargo, a nivel de vigilancia epidemiológica tanto en países desarrollados como en desarrollo, es difícil que estas herramientas puedan ser utilizadas de manera rutinaria debido a los costos y a la necesidad de personal altamente calificado. En este sentido, los estudios de evaluación de riesgo están siendo útiles para explorar y analizar el significado epidemiológico de la presencia y actividad de virus en el ambiente.

A mediados de la década de 1990, en Estados Unidos se convocó a la comunidad científica para que propusieran microorganismos que han sido detectados en agua y que son relevantes en términos de salud; una primera lista se publicó en 1998 por la Agencia de Protección al Ambiente (USEPA) a la que se le denominó “Candidate Contaminant List Microbes” (CCL1). En febrero del 2008 se publicó el borrador de la CCL3, donde se han incluido a 1,415 microorganismos de los cuales 219 son virus (USEPA, 2008).

En Europa, en la sesión de junio del 2006 de COST (*European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research*) se propuso la creación y operación de una red europea de Virología ambiental y de alimentos (ENVIRONET). La red tiene como objetivo incrementar el conocimiento del papel de los alimentos y del ambiente en la transmisión de virus entéricos. Para lograr este objetivo se han organizado grupos de trabajo que se dedicarán a cuatro temas principales: 1) riesgos virales actuales y emergentes; 2) métodos analíticos; 3) análisis de datos y 4) estabilidad de virus (COST, 2006). La iniciativa ENVIRONET da una idea de la creciente importancia de estos temas, los cuales han sido poco atendidos en países en desarrollo.

Virus ¿contaminantes ambientales?

Existe una amplia diversidad de virus que son parte de los sistemas acuáticos naturales y que desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de las comunidades planctónicas, sin que representen peligro para el hombre, dado que tienen hospederos específicos (Bofill-Mas *et al.*, 2005), principalmente bacterias y otros microorganismos (Wang y Wang, 1991). Las concentraciones de virus en cuerpos de agua sin aparente contaminación fecal son de entre 10^6 y 10^8 partículas virales por mL (Bergh *et al.*, 1989; Wommack *et al.*, 1992; Weinbauer *et al.*, 1993; Marie *et al.*, 1999). Estos agentes juegan un papel importante tanto en el intercambio genético como en la regulación de las poblaciones de los organismos que infectan (Bofill-Mas *et al.*, 2005).

Pero en cuanto a virus humanos, grandes cantidades son excretados por individuos infectados, sin que necesariamente hayan desarrollado la enfermedad, sus heces y orina contienen altas densidades de virus que al integrarse a las aguas residuales se consideran contaminantes ambientales (Bofill-Mas *et al.*, 2005). Las densidades de partículas virales que se han reportado en agua contaminada son variables y dependen no solo de las condiciones del ambiente que les rodea, sino también del tamaño y las condiciones sanitarias de la población humana emisora (Figura 2). De esta manera los centros urbanos constituyen fuentes de contaminación viral hacia el ambiente debido

principalmente a la cantidad de partículas virales que pueden ser liberadas, y que representan un riesgo a la salud para la población expuesta. Si bien su presencia en el ambiente puede no ser algo extraordinario, ya que para poder ser transmitidos de un individuo a otro tienen que dejar al primero y permanecer en alguna matriz ambiental hasta ser ingeridos e infectar a otro, sí son extraordinarias las propiedades que les permiten permanecer infecciosos por periodos prolongados, tolerando diversas condiciones ambientales, lo cual les favorece al tener mayor oportunidad de transmisión entre un hospedero y otro.

Así, la transmisión de un virus entéricos depende no solo de la interacción con su hospedero, sino también de su interacción con el ambiente que rodea a su hospedero (Rzezutka y Cook, 2004). Además, los virus entéricos presentan dosis infecciosas bajas; su detección en el ambiente no es sencilla; pueden tolerar tratamientos convencionales de desinfección y ciertos tratamientos de aguas residuales; y el origen de la exposición humana puede ser tan diverso como suelo, agua, alimentos y aerosoles (Figura 1).

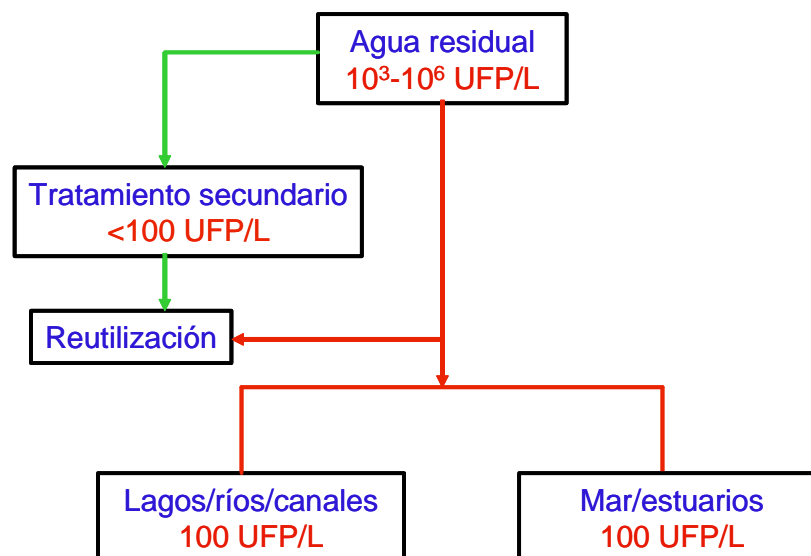


Figura 2. Cantidad de virus entéricos que se han reportado en agua de diferente calidad. (Fuentes: WHO, 2003; USEPA, 2004; Pina, 2001).

El conocimiento disponible sobre su presencia y persistencia en el ambiente es limitado con respecto a lo que se sabe de las bacterias patógenas (Pina, 2001).

Además, la información publicada se refiere predominantemente a países europeos, Estados Unidos y otros países desarrollados, mientras que se ha realizado poco trabajo en América Latina y países en desarrollo. En México, son escasos los datos que contribuyen al entendimiento de la permanencia y persistencia en el ambiente de este tipo de virus, que ayuden a comprender el impacto que pueden tener sobre la población y den elementos para su control.

El manejo del agua: un elemento básico

La contaminación viral del agua no solo ofrece argumentos para identificar un problema que debe atenderse, sino también abre una ventana para cuestionarnos acerca de cómo estamos usando los ecosistemas y si las formas en las que hemos resuelto los problemas sanitarios siguen siendo adecuadas, esto ante hechos como una población en continuo crecimiento, un incremento en la demanda de agua y alimentos, con una subsecuente producción de desechos (WHO, 2006).

La descarga de agua residual a cuerpos de agua con el propósito de eliminarlas, es una práctica muy antigua y común en muchos lugares del mundo. Este hecho supone consecuencias tales como la contaminación fecal de fuentes superficiales y subterráneas de abastecimiento de agua para consumo humano. Por otro lado, las redes de drenaje que permiten desalojar las aguas residuales de centros urbanos, también son una fuente potencial de contaminación fecal de agua subterránea, al sufrir daños o por un mantenimiento inadecuado. Si consideramos que a nivel mundial una parte importante del agua para consumo humano es agua subterránea (Howard y Gelo, 2003), es posible imaginar que la contaminación de los acuíferos con aguas residuales implicaría un serio problema de salud pública.

Sin embargo, el tratamiento de agua residual previo a ser descargadas en cuerpos de agua receptores, es una opción que permite eliminar parte de los contaminantes del agua, dependiendo del sistema y la tecnología de tratamiento. El resultado sería agua que puede ser reutilizada, hasta más de una vez y una disminución en la contaminación ambiental.

La reutilización del agua no es una práctica novedosa ya que desde tiempos remotos para diversas civilizaciones era usual, sobretodo en lugares donde el agua era un recurso limitante (Beucheler *et al.*, 2006). Se realiza mediante agua residual cruda y agua residual que ha recibido algún tipo de tratamiento, antes de ser usada nuevamente. Uno de los principales reusos es en agricultura, actividad en la que la reutilización de agua tiene como ventaja adicional el aporte de nutrientes como nitrógeno y fósforo, mismos que incrementan la productividad agrícola y reduce costos por concepto de fertilizantes (Jiménez y Garduño, 2001). En este sentido el agua residual ya sea tratada o cruda, constituye un recurso importante y una alternativa de solución para la enorme demanda de agua de la agricultura. El agua residual es en un 99% agua y se estima que en el mundo al menos 10% de la población consume productos agrícolas regados con agua residual (WHO, 2006).

No obstante, existe la preocupación sobre los efectos en la salud pública que pueden derivar de una reutilización inadecuada del agua (Tanaka *et al.*, 1998), por ejemplo en el riego de vegetales que se consumen crudos y la exposición directa o indirecta de la población al agua de reuso.

Los contenidos de algunos virus entéricos en agua residual se han evaluado, y se ha encontrado que son muy variables, respondiendo a factores como tamaño de la población emisora, estado de salud de la población, zona geográfica, temporada del año, tipo viral, así como tipo de agua (Rzezutka y Cook, 2004). Debido a esta heterogeneidad de condiciones ambientales, aún no se cuenta con una metodología universal que permita evaluar la contaminación viral de sistemas acuáticos o del medio acuático en sí.

Indicadores de calidad del agua

El concepto de indicador de calidad del agua nace en el siglo XVII a partir de la necesidad de detectar la contaminación fecal del agua (Medema *et al.*, 2003). Desde entonces los agentes indicadores han sido bacterias coliformes. Con el transcurso de los años se han ido estableciendo estándares de calidad del agua

para consumo humano considerando la concentración de bacterias coliformes que no implique un riesgo importante para la salud.

Sin embargo, las enfermedades de origen hídrico no solo son causadas por bacterias, sino también por virus, parásitos y protozoarios. El reporte de brotes de enfermedades virales asociadas al consumo de agua que cumplía con los estándares bacterianos de calidad han dejado claro que las bacterias no son adecuadas como indicadoras de presencia viral (Medema *et al.*, 2003).

Los virus en particular tienen características de permanencia en el ambiente distintas a las de las bacterias indicadoras. Esto es especialmente relevante cuando se trata de los tratamientos de desinfección, ya que los virus son significativamente más tolerantes con respecto a las bacterias indicadoras que son altamente sensibles (Payment *et al.*, 2003).

Aunque en la actualidad no se tiene algún agente indicador de contaminación viral, se cuenta con algunas propuestas que continúan siendo evaluadas como son enterovirus, genomas virales y bacteriófagos. La desventaja del uso de enterovirus como indicadores es que, a menos que haya algún brote infeccioso, no son excretados de forma regular y al utilizarse masivamente poliovirus tipo 1 como vacuna, las muestras positivas solo refieren la presencia del tipo vacunal sin discriminar la de algún otro virus entérico (Rao y Melnick, 1986).

La detección de genomas virales es la forma más confiable, dado que directamente se detecta el virus entérico de interés. No obstante, utilizar este tipo de detección no es factible como método de rutina, dados los requerimientos de infraestructura y personal especializado. En cuanto a los bacteriófagos de bacterias entéricas se han propuesto a los colífagos somáticos, a los F-específicos y a los fagos de *Bacteroides fragilis*. Los primeros tienen la desventaja de ser menos tolerantes que los virus entéricos a los procesos de desinfección de agua; los F-específicos son poco frecuentes en heces humanas, sin embargo, se han encontrado en altas concentraciones en aguas residuales, lo que sugiere que puedan multiplicarse en el ambiente; y los fagos de *Bacteroides fragilis* han presentado buenas características como potencial indicador de contaminación viral fecal, se excreta en altas concentraciones, no se multiplica en el ambiente, su

tolerancia a la desinfección es superior a la de poliovirus y otros bacteriófagos, aunque menor que la del VHA (Pina, 2001).

Otras investigaciones se han propuesto como indicadores virales. Actualmente continúan las contribuciones a fin de evaluar a fondo las características que favorecen o no a los indicadores potenciales de la presencia y actividad de virus entéricos en agua.

Efectos sobre salud pública

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cada año mueren 13 millones de personas por enfermedades de origen hídrico y que la mayoría de estas muertes suceden en países en desarrollo (Arnone y Walling, 2007).

En México, de acuerdo con datos de la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2005a) la incidencia de enfermedades diarreicas ha venido disminuyendo en los últimos 20 años, lo cual se asocia con las acciones de desinfección masiva de agua del Programa Agua Limpia de la Comisión Nacional del Agua en 1990 (CNA, 2003), mismo que se implementó como respuesta a los brotes de cólera en el país a principios de la década de 1990.

En México la cloración es el método mas ampliamente utilizado para la desinfección de agua destinada al consumo humano. La acción oxidante del cloro inactiva significativamente a las bacterias, de modo que la disminución de enfermedades diarreicas se debe a una mejor calidad bacteriológica del agua que se ofrece a la población. No obstante, aún se reportan más de 4 millones de casos anuales en la categoría de “Infección intestinal debida a virus o mal definidas” (Secretaría de Salud, 2005b, 2006, 2007), sin que se haga la distinción de los casos de enfermedad provocada por virus entéricos importantes en términos epidemiológicos, como es el caso de rotavirus. De manera que no se cuenta con información sobre la incidencia de diarreas específicamente de etiología viral.

La relación entre la presencia de virus entéricos en el ambiente y los eventos de enfermedad es difícil de establecer, sin embargo, tal asociación se ha logrado encontrar en casos de brotes epidemiológicos a partir del análisis

molecular de virus detectados en agua o en alimentos y de virus detectados en individuos enfermos (Divizia *et al.*, 2005).

El riesgo de infección por virus entéricos presentes en agua está relacionado con el tipo de virus, edad y salud del hospedero. Se ha estimado que las dosis infecciosas de virus entéricos van de 1 a 10 partículas infecciosas (Mocé, 2004). Pina (2001) cita un trabajo de 1988 en el que Gerba y Haas estimaron que el riesgo de infección por 1 UFP/1000 L de enterovirus en agua para consumo humano, bajo el supuesto de que un individuo consume 2 L de agua cada día, era aproximadamente de 1:10,000 personas/año.

A pesar de que en México las enfermedades diarreicas ya no ocupan un sitio entre las diez principales causas de muerte en la población mexicana, no se debe perder de vista que en niños menores de 1 año el 15% de las muertes son causadas por enfermedades diarreicas, respiratorias y de nutrición (Secretaría de Salud, 2005a); con una diferencia importante de acuerdo con la entidad. Mientras que en Chiapas el 30% de las muertes se debe a diarreas, infecciones respiratorias o desnutrición, en Nuevo León o Aguascalientes las mismas enfermedades son causa del 7% de las muertes (Secretaría de Salud, 2005).

En México se han realizado pocos estudios de presencia de virus entéricos en diferentes matrices ambientales (Deetz *et al.*, 1984; Espinosa *et al.*, 2008) y no hay antecedente de trabajos relacionados con la infectividad de este tipo de agentes en ambientes acuáticos. Además, la información epidemiológica pública no permite conocer la incidencia de infecciones entéricas de origen viral y su relación con la ingesta de agua contaminada.

PERSPECTIVA DEL ESTUDIO

El conocimiento de los niveles de contaminación bacteriológica de origen fecal de diversos sistemas acuáticos a partir de la cuantificación de bacterias indicadoras, ha mostrado no reflejar la situación en cuanto a la contaminación de agentes como los virus entéricos, además de otros como protozoarios y helmintos, de importancia para la salud pública. Es así como el presente trabajo de tesis fue

concebido para evaluar la presencia de virus entéricos en agua subterránea y superficial, así como los periodos de tiempo que pueden permanecer en estos tipos de agua y constituir un riesgo de infección para la población expuesta.

En México se ha trabajado poco en el área de la Virología ambiental, y considero que el deterioro ambiental que enfrenta el país y en particular la megaciudad de México, resalta la necesidad de abordar estos temas y de generar información que contribuya para hacer frente a la problemática de salud que se puede derivar de un ambiente poco saludable.

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

1. Determinar la presencia de rotavirus, enterovirus y astrovirus en agua superficial y subterránea de la Zona de Xochimilco
2. De acuerdo con la frecuencia de rotavirus, enterovirus y astrovirus en agua de la zona de Xochimilco, establecer si su presencia corresponde con algún patrón estacional.
3. Determinar experimentalmente el tiempo en el que rotavirus y astrovirus, inoculados en agua superficial y subterránea, son físicamente estables y su genoma es detectable por métodos moleculares.
4. Determinar el efecto del agua superficial y subterránea sobre la actividad infecciosa de rotavirus y astrovirus.
5. Determinar el efecto del cloro sobre la actividad infecciosa de rotavirus y astrovirus.

REFERENCIAS

Arnone, R. D. y J. P. Walling. 2007. Waterborne pathogens in urban watersheds. *Journal Water and Health* 5(1):149-162.

Berg, G. 1967. Transmission of viruses by the water route. Based on a symposium, Cincinnati, Ohio, December 1965. Interscience, Wiley. New York. 502 p

Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak y M. Heldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340 (6233): 467-468.

Beucheler, S., Devi G. y Keraita B. 2006. *Wastewater use for urban and peri-urban agriculture*. En: R. van Veenhuizen. Cities farming for the future. Urban Agriculture for Green and Productive Cities. IIRR/RUAF/IDRC.

Bofill-Mas, S., P. Clemente-Casares, N. Albiñana-Giménez, C. Maluquer de Motes Porta, A. Hundesa Golfá y R. Girones Llop. 2005. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista Española de Salud Pública* 79(2): 253-269.

Comisión Nacional del Agua (CNA), 2003. Evaluación del Programa Agua Limpia. Convenio CNA-SGIHU/02/2003. Federación de Colegios de Ingenieros Civiles de la República Mexicana A. C. México. 175 p

Cooksley, W. G. E. 2000. What did we learn from the Shanghai hepatitis A epidemic?. *Journal of Viral Hepatitis* 7(supl 1):1-3.

COST European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research 2006. European network for environmental and food virology (ENVIRONET). Committee of Senior Officials (CSO). <http://www.cost.esf.org>

Deetz, T. R., E. M. Smith, S. M. Goyal, C. P. Gerba, J. J. Vollet III, L. Tsai, H. L. Dupont y B. H. Keswick. 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Research* 18(5): 567-571.

Divizia, M., R. Gabrielli, A. Macaluso, B. Bagnato, L. Palombi, E. Buonomo, F. Cenko, L. Leno, S. Bino, A. Basha y A. Panà. 2005. Nucleotide correlation between HAV isolates from human patients and environmental samples. *Journal of Medical Virology* 75:8-12.

Espinosa, A. C., M. Mazari-Hiriart, R. Espinosa, L. Maruri-Avidal, E. Méndez y C. F. Arias. 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42(10-11):2618-2628.

FPT Committee on drinking water. 2008. Guidelines for Canadian drinking water quality. Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment. Health Canada.

Gerba, C y S. Goyal. 1982. Methods in environmental virology. Marcel Dekker, Inc. New York. 377 p

Howard, K.W.F. y K.K. Gelo. 2003. Intensive use in urban areas: the case of the megacities. In: Llamas, R., Custodio, E. (Eds). Intensive Use of Groundwater. Challenges and Opportunities. Rotterdam, The Netherlands: A.A. Balkema. pp 35-58.

Jiménez B. y H. Garduño. 2001. Social, Political and Scientific Dilemmas for Massive Wastewater Reuse in the World. En: *Navigating Rough Waters: Ethical Issues in the Water Industry*. Davis and McGin editors. Edited by AWWA.

Lodder, W. J. y A. M. de Roda Husman. 2005. Presence of norovirus and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3):1453-1461.

Marie, D., C. P. D. Brussaard, R. Thyraug, G. Bratbak y D. Vaultot. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 45-52.

Maxcy, K. F. 1943. Hypothetical relationship of water supplies to poliomyelitis. *American Journal of Public Health* 33: 41-45.

Medema, G. J., P. Payment, A. Dufour, W. Robertson, M. Waite, P. Hunter, R. Kirby y Y. Andersson. 2003. Safe drinking water: an ongoing challenge. En: OECD y WHO. Assessing microbial safety of drinking water. Improving Approaches and Methods. IWA Publishing. London, UK. 295 p

Metcalf, T. G., J. L. Melnick y M. K. Estes. 1995. Environmental Virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology- A trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* 49:461-487.

Mocé, L. 2004. Avencos metodològics en la detecció de virus entèrics en aigües. Tesi Doctoral. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, España.

Paul, J. R., J. D. Trask, y S. Grad. 1940. II Poliomyelitic virus in urban sewage. *Journal of Experimental Medicine* 71: 765-777.

Paul, J. R. y J. D. Trask. 1942. Occurrence and recovery of the virus of infantile paralysis from sewage. *American Journal of Public Health* 32(3): 235-239.

Payment, P., M. Waite y A. Dufour. 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. En: OECD y WHO Assessing microbial safety of drinking water. Improving Approaches and Methods. IWA Publishing. London, UK. 295 p

Pina, S. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Tesis para optar por el grado de Doctora en Biología. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

Rao, V. C. y J. L. Melnick. 1986. Environmental Virology. American Society of Microbiology. Washington, USA. 88 p

Rzesutka, A. y N. Cook. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews* 28(2004): 441-453.

Secretaría de Salud, 2005a. Salud: México 2004. Información para la rendición de cuentas. Talleres Gráficos de México. Mexico D. F. 229 p

Secretaría de Salud, 2005b. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica semana 52. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>

Secretaría de Salud, 2006. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica semana 52. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>

Secretaría de Salud, 2007. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica semana 52. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>

Tanaka, H., T. Asano, E. D. Schroeder y G. Tchobanoglous. 1998. Estimating the safety of wastewater reclamation and reuse using enteric virus monitoring data. *Water Environment Research* 70(1):39-51.

USEPA, 2001. National Primary Drinking Water Standards. EPA 186-F-01-007

USEPA, 2004. Guidelines for water reuse. EPA/625/R-04/108. Washington D C 450 p

Viswanathan, R. 1957. Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956): a critical study in epidemiology. *Indian Journal of Medical Research* 45: 1-29.

Wang, A. L. y C. C. Wang. 1991. Virus of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 7(4):76-80.

Weinbauer, M. G., D. Fuks y P. Peduzzi. 1993. Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the Northern Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12): 4074-4082.

Wommack, K. E., R. T. Hill, M. Kessel, E. Russek-Cohen y R. R. Colwell. 1992. Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 2965-2970.

Wong, D. C, R. H. Purcell, M. A. Sreenivasan, S. R. Prasad, K. M. Pavri. 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 2:876-879.

World Health Organization (WHO). 1989. Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture: Measures for public health protection. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and Fresh Waters. Geneva, Switzerland. 220 p

World Health Organization (WHO). 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Volume 2 Wastewater use in agriculture. Geneva, Switzerland. 213 p

CAPITULO 2

Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública

Publicación en revista internacional arbitrada:

Espinosa A C, C F Arias, M Mazari Hiriart. 2004. Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica* 14(2):166-178.

Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública**Virus in aquatic systems and public health implications**

Ana Cecilia Espinosa-García,¹
Carlos F. Arias-Ortiz²
y Marisa Mazari-Hiriart¹

¹ Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 3er Circuito Exterior Ciudad Universitaria. Apartado Postal 70-275. Coyoacán, 04510 DF. México. E-mail: mazari@servidor.unam.mx

² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Apartado Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos 62210. México

Espinosa-García A.C., C. F. Arias-Ortiz., y M. Mazari-Hiriart 2004. Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica* 14 (2): 166-178.

RESUMEN

El aprovechamiento de los recursos hídricos por el hombre, ha despertado interés sobre la presencia de virus en sistemas acuáticos debido al riesgo que representan para la salud pública. Se realiza una revisión sobre la presencia de virus en diferentes sistemas acuáticos, las enfermedades causadas por virus humanos y sus síntomas, incluyendo enterovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus, adenovirus y virus de hepatitis A. Se analizan también las implicaciones para la salud en relación con la normatividad vigente para agua de uso y consumo humano, así como para agua residual tratada y reutilizada. Se trata el impacto de las enfermedades virales relacionadas con uso y consumo de agua en la población, mencionando la situación en México. Se describen los métodos que se emplean para la detección de virus, así como los métodos más comunes de desinfección para agua de uso y consumo humano, con un enfoque específico sobre contaminación viral. Se concluye que los virus entéricos capaces de persistir en el ambiente tienen el potencial de causar efectos severos en la salud, especialmente de la población infantil. Los resultados de esta revisión sugieren que en México y otras zonas tropicales se deben realizar investigaciones para conocer cual es la situación en cuanto a contaminación viral del agua subterránea, superficial y agua residual tratada para reúso. Es relevante evaluar como agentes indicadores de contaminación viral fecal a los enterovirus y bacteriófagos con la intención de incluirlos en los estándares de calidad del agua.

Palabras clave: virus humanos, sistemas acuáticos, gastroenteritis, calidad del agua.

ABSTRACT

The use of the hydraulic resources by humans raised the interest on the presence of virus in aquatic systems, due to the public health risk they represent. We present a revision on the occurrence of virus in different aquatic systems, the diseases caused produced by human virus and their symptoms, including enterovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus, adenovirus and hepatitis A virus. Implications in public health in relation with the existing regulations for human use and consumption, as well as residual treated and reused water, are analyzed. We mention the impact of viral diseases related the water for human use and consumption, giving some idea of Mexico's situation. The methods used for the detection of virus, as well as the common methods for water disinfection used for human with a specific focus on viral contamination. We conclude that human viruses capable to persist in the environment have severe effects, specially for infants. The results of this revision suggest that research should be conducted in Mexico and other tropical areas to know what is the situation with viral contamination in groundwater, fresh-water and treated wastewater for reuse. It is relevant the evaluation of enterovirus as indicators of the presence of viral fecal contamination and bacteriophages intending to include them in the water quality standards.

Key words: human virus, aquatic systems, gastroenteritis, water quality.

INTRODUCCIÓN

El agua desempeña un papel importante tanto en las actividades humanas como en los sistemas naturales. El aumento de la población mundial ejerce una presión cada vez mayor sobre este recurso provocando una severa degradación e imponiendo límites para la producción agrícola e industrial, así como mayores riesgos para la población humana (Nash, 1993; Postel *et al.*, 1996; Fernández-Jauregui, 1999). Debe considerarse además que en diferentes regiones del mundo existe una disparidad entre la población y los recursos hídricos disponibles (Tabla 1).

En relación con la calidad microbiológica del agua, se puede decir que los microorganismos son poco conocidos para el público, excepto en el contexto de patogenicidad o descomposición de alimentos (Pace, 1997). En las últimas décadas, el empleo de las técnicas de biología molecular en estudios microbiológicos ha transformado el entendimiento de la diversidad y evolución de la vida de los microorganismos. Los ecólogos microbianos han descubierto que los ecosistemas poseen una enorme diversidad de especies de microorganismos que puede rebasar el número de especies de plantas y animales conocidas. La abundancia de virus en aguas superficiales es de 10^{10} partículas/L, esto es de 5 a 25 veces la abundancia de bacterias (Fuhrman, 1999).

El estudio sobre los virus en las comunidades acuáticas se ha venido incrementando en las últimas décadas (Jiang & Paul, 1998; Wommack *et al.*, 1999; Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000). Los trabajos sobre virus en sistemas acuáticos, especialmente sistemas marinos, muestran que éstos son abundantes, incluso excediendo el número de bacterias, lo que sugiere una importante participación en la dinámica de estos sistemas (Proctor, 1997; Weinbauer & Höfle, 1998; van Hannen *et al.*, 1999).

Debe hacerse la diferencia entre los microorganismos que de manera natural forman parte de un sistema acuático y los que están presentes sin ser parte de él (Yates *et al.*, 1985). Este sería el caso de aguas residuales, con un alto contenido de microorganismos, que son descargadas a cuerpos de agua naturales. Eventualmente la presencia de agentes patógenos puede representar un problema de salud pública, con especial énfasis en enfermedades gastrointestinales, que en muchos casos son de etiología viral (Nasser & Oman, 1999).

En teoría, todos los organismos son susceptibles de ser infectados frecuentemente por más de un tipo de virus, de modo que los virus son probablemente los agentes más diversos de la Tierra (Fuhrman, 1999). Por esta razón se considera importante llevar a cabo una revisión sobre la presencia de virus en sistemas acuáticos, haciendo énfasis en los virus patógenos humanos que representan un riesgo para la salud pública y la limitante que esto representa para el uso y explotación del recurso agua. El objetivo de este trabajo es presentar el estado actual de la investigación sobre la pre-

sencia de virus en sistemas acuáticos y sus implicaciones tanto ambientales como de salud pública

VIRUS EN SISTEMAS ACUÁTICOS

La abundancia de virus animales y bacteriófagos (virus bacterianos), en sistemas acuáticos es variable, de acuerdo con los sitios de muestreo, profundidad y estación del año. Se han reportado datos que van del orden de 10^7 a 10^{11} partículas/L en agua marina superficial (Fuhrman, 1999). El número de virus, de manera similar a las bacterias, decrece aproximadamente un orden de magnitud entre aguas costeras ricas en nutrientes y el mar abierto pobre en nutrientes. También se reporta una disminución de entre cinco y diez veces en la zona eufótica a profundidades de 500 m y aún más para profundidades abismales. Como ocurre con las bacterias, los mares fríos son más ricos en poblaciones virales en comparación con las aguas templadas y cálidas. Además, el agua intersticial asociada con los sedimentos es más rica en virus que el agua subyacente (Fuhrman, 1999). En la tabla 2 se muestran algunos reportes sobre la abundancia viral en diferentes sistemas acuáticos.

Sobre la abundancia de virus humanos en sistemas acuáticos, debido a su importancia epidemiológica, existen trabajos que se han centrado en el desarrollo de métodos de detección y cuantificación (Tabla 3).

A pesar de que el agua para uso y consumo humano se desinfecta en muchos países, los virus humanos, en especial los entéricos son más resistentes a dichos tratamientos que las bacterias coliformes, que son utilizados como indicadores de calidad de agua a nivel mundial. Vaughn y Novotny (1991) reportan que poliovirus resiste más de 100 veces al ácido hipocloroso que *Escherichia coli*. En otros trabajos se ha mostrado que el agua, tanto dulce como salobre, libre de coliformes, puede contener virus o protozoarios (Vantarakis & Papapetropoulou, 1998; Grabow *et al.*, 1999; Payment *et al.*,

Tabla 1. Disponibilidad de los recursos hídricos y población a nivel mundial. (Con base en Fernández-Jauregui, 1999).

Región	Población (%)	Recursos hídricos (%)
América del Norte y Central	8	15
Europa	13	8
Asia	60	35
América del Sur	6	26
África	13	11
Australia y Oceanía	<1	5

Tabla 2. Abundancia de virus en sistemas acuáticos.

Sitio de estudio	Abundancia viral*	Referencia
	(virus/ml)	
Chesapeake Bay, EUA	10.1 X 10 ⁶	Bergh <i>et al.</i> , 1989
Korsfjorden, Alemania	6.1 X 10 ⁶	Bergh <i>et al.</i> , 1989
Raunefjorden, Alemania	4.8 X 10 ⁶ a 9.9 X 10 ⁶	Bergh <i>et al.</i> , 1989
Lago Plusse, Alemania	5 X 10 ⁶ a 2.5 X 10 ⁸	Bergh <i>et al.</i> , 1989
Raunefjorden, Alemania	5 X 10 ⁶ a 1.3 X 10 ⁷	Bratbak <i>et al.</i> , 1990
Chesapeake Bay, EUA	2.6 X 10 ⁶ a 1.4 X 10 ⁸	Wommack <i>et al.</i> , 1992
Mar Adriático, Croacia- Italia	1.2 X 10 ⁶ a 8.7 X 10 ⁷	Weinbauer <i>et al.</i> , 1993
Río Danubio, Austria	1.2 X 10 ⁷ a 6.1 X 10 ⁷	Mathias <i>et al.</i> , 1995
Lago Konstans, Alemania	1 X 10 ⁷ a 4 X 10 ⁷	Hennes y Simon, 1995
Lago Plusse, Alemania	2 X 10 ⁶ a 1.9 X 10 ⁷	Weinbauer & Hötle., 1998
Canal Inglés	1.6 X 10 ⁷ a 1.8 X 10 ⁷	Marie <i>et al.</i> , 1999
Pacífico Ecuatorial	3.9 X 10 ⁶ a 5.3 X 10 ⁶	Marie <i>et al.</i> , 1999
Mar Mediterráneo	1.5 X 10 ⁶ a 2.3 X 10 ⁶	Marie <i>et al.</i> , 1999

2000) y que los virus entéricos persisten por semanas incluso meses (Nasser & Oman, 1999).

En un individuo infectado, una vez que los virus se han replicado en el tracto gastrointestinal, gran número de partículas son excretadas con las heces fecales que son canalizadas al drenaje (Gilgen *et al.*, 1997). Poliovirus, por ejemplo, se ha encontrado en concentraciones del orden de 10⁶ unidades formadoras de placa por gramo de heces (PFU/g) y puede estar presente en aguas residuales, especialmente en países en donde el poliovirus vivo es utilizado para vacunación (Abad *et al.*, 1994; Bergstein-Ben Dan *et al.*, 1997; Sarmiento-Pérez *et al.*, 1999). Para rotavirus se ha detectado una concentración del orden de 10¹⁰ PFU/g de heces (Yates *et al.*, 1985) y para el caso de hepatitis A la concentración es de 10⁹ PFU/g (Nicand *et al.*, 1998).

Tratándose de virus entéricos humanos, en general el número de partículas que pueden ser excretadas por individuos infectados es de 10⁸ a 10¹⁰ PFU/g de heces (Abbaszadegan *et al.*, 1999), y en agua residual pueden estar presentes más de 140 serotipos diferentes de virus entéricos (Gantzer *et al.*, 1998; Nicand *et al.*, 1998). Por lo tanto, el agua representa un vehículo con un impacto potencial real para la transmisión de enfermedades (Edwald, 1994), cuyo control es importante. Los tipos de virus que se pueden encontrar en el agua son diversos (Tabla 4). Los factores relevantes que influyen y controlan tanto la supervivencia como la migración de los virus son: el clima (temperatura y precipitación), el tipo de suelo y muy importante el tipo viral (Yates *et al.*, 1985). Otros aspectos relacionados con la

presencia de virus entéricos en agua están relacionados con el número de habitantes en una población, sus hábitos de higiene, la prevalencia de infecciones en la comunidad y la temporada del año (Kopecka *et al.*, 1993).

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL RELACIONADAS CON AGUA

Dentro las enfermedades de transmisión hídrica las de etiología viral llaman la atención, pues aunque el medio acuático no es su hábitat natural de los virus, en él se dispersan fácilmente y pueden permanecer activos de semanas a meses (Abad *et al.*, 1994). Además, existen virus humanos que sobreviven a los sistemas tradicionales de desinfección y tratamiento del agua (Gerba & Rose, 1990). Entre los virus humanos capaces de persistir en el ambiente debido a su resistencia a las condiciones no favorables se encuentran: enterovirus (Gantzer *et al.*, 1998), rotavirus, virus de hepatitis A (LeGuyader *et al.*, 1994), astrovirus (Pintó *et al.*, 1996), calicivirus (Gilgen *et al.*, 1997) y adenovirus, todos ellos de importancia en salud pública (Gerba & Rose, 1990; Kapikian & Chanock, 1991; Nicand *et al.*, 1998).

Enterovirus. Se reconocen como causa importante de infecciones agudas, especialmente del sistema nervioso central, como meningitis y encefalitis, así como en infecciones subagudas y crónicas del sistema cardiovascular como pericarditis, miocarditis y cardiomiopatías (Kämmerer *et al.*, 1994; Gilgen *et al.*, 1995; Sarmiento-Pérez *et al.*, 2000). La ruta de transmisión de estas enfermedades es fecal-oral, por contacto directo con enfermos, consumo de agua y alimentos contaminados (Melnick, 1996a).

Tabla 3. Abundancia de virus humanos en sistemas acuáticos

Sitio de estudio	Abundancia virus (PFU/L)	Tipo de virus	Referencia
Saint Lawrence River, Canadá	<0.3 a 62.3	virus entéricos	Payment <i>et al.</i> , 2000
Río Missouri, EUA	0.1	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Río Sena, Francia	191	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Río Támesis, Inglaterra	22	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Ríos Avon y Sowe, Inglaterra	620	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Río Besos, España	55	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Río Lobregat, España	55	virus entéricos	Gerba & Rose, 1990
Auckland, Nueva Zelanda	2667 a 233*	enterovirus	Gerba & Rose, 1990
Auckland, Nueva Zelanda	<6 a 276**	enterovirus	Gerba & Rose, 1990
Achaia (marina), Grecia	0.29 a 0.39	enterovirus	Vantarakis & Papapetropoulou, 1998
Chapala, México	4.1	rotavirus y	Deetz <i>et al.</i> , 1984
	0.55	enterovirus	Deetz <i>et al.</i> , 1984
Chapala (servida), México	0.8-10.5	rotavirus y	Deetz <i>et al.</i> , 1984
	1-1.35	enterovirus	Deetz <i>et al.</i> , 1984

PFU= unidades formadoras de placa

* agua residual, ** agua residual tratada en efluente a zona marina

El género *Enterovirus* se encuentra dentro de la familia *Picornaviridae*. A éste género pertenecen *poliovirus*, *coxsackievirus*, *echovirus* y los *enterovirus* del 68 al 71 (Stanway, 1990; Rotbart, 1995; Rueckert, 1996). Los *Enterovirus* fueron de los primeros virus detectados en agua en 1940, a partir de agua contaminada por heces fecales (Melnick, 1996b) y desde entonces se identificó el potencial que tiene el agua como vehículo para la dispersión de virus humanos (Griffin *et al.*, 2003).

Rotavirus. La familia *Reoviridae* incluye a los rotavirus. Se dividen en seis grupos (A a F). Los aislados de humanos se clasifican en los grupos A, B y C. El grupo A, que a su vez tiene dos subgrupos I y II (Christensen, 1995; Estes, 1996), es causante de diarrea severa en niños (Padilla-Noriega *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2002). Un aspecto particular de los rotavirus es que codifican para una proteína (NSP4) que se ha sugerido tiene una actividad similar a la de una enterotoxina (Christensen, 1995; López & Arias, 2001).

La enfermedad se adquiere por el consumo de alimentos o agua contaminados y se desarrolla después de 1 ó 2 días de incubación, presentándose gastroenteritis de manera súbita con vómito y diarrea, fiebre y en ocasiones dolor abdominal, lo que puede llevar a una deshidratación severa, hospitalización y eventualmente a la muerte, especialmente en niños pequeños (Christensen, 1995). Los rotavirus se

asocian con el 35% al 52% de las diarreas agudas en niños que requieren hospitalización, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo (Kapikian & Chanock, 1991), y el 95% de niños que han alcanzado los 5 años ya han sido infectados (López & Arias, 2001). Este virus es responsable de alrededor de 800,000 muertes de niños menores de 5 años por año, en todo el mundo (Arias *et al.*, 2002; Mota-Hernández *et al.*, 2003). En México rotavirus es el principal agente viral que causa diarrea severa en niños menores de dos años (Villa *et al.*, 1999).

Astrovirus. La familia *Astroviridae* incluye a los astrovirus. Se conocen al menos ocho serotipos de astrovirus humano (Méndez-Toss *et al.*, 2000). Los síntomas de una infección por astrovirus son vómito, dolor abdominal, fiebre y diarrea, misma que puede durar de 7 a 14 días acompañada de excreción de virus (Petric, 1995). Este virus también se ha asociado con enfermedad gastrointestinal que es adquirida por el contacto con personas enfermas, consumo de alimentos o agua contaminados (Matsui & Greenberg, 1996) incluso se considera segundo en importancia, después de rotavirus, como agente causante de diarreas en niños, pero por lo general no requiere de hospitalización (Walter & Mitchell, 2000).

En países en desarrollo se le asocia con el 4% al 10% de los casos de diarrea en niños (Medina *et al.*, 2000). Con

frecuencia en casos de diarrea infantil se ha encontrado una coinfección de astrovirus con rotavirus, lo que complica el entendimiento desde el punto de vista epidemiológico (Walter & Mitchell, 2000).

Calicivirus. Los calicivirus pertenecientes a la familia Caliciviridae incluyen cuatro genogrupos: Lagovirus, Norovirus (virus Norwalk, Snow Mountain), Sapovirus (virus Sapporo) y Vesivirus (ICTV, 2002).

La enfermedad causada por calicivirus se manifiesta con náusea, vómito, diarrea, calambres abdominales, dolor de cabeza y fiebre (Petric, 1995). Se ha reportado que la incidencia de gastroenteritis por el virus Norwalk es más frecuente en los meses fríos (Mounts *et al.*, 2000). La ruta de contagio es fecal-oral, principalmente por ingesta de alimentos y agua contaminados con el virus (Kapikian *et al.*, 1996).

Los calicivirus humanos fueron los primeros agentes virales que se asociaron con gastroenteritis (Petric, 1995) y en particular el virus Norwalk que ocurren en diversos ambientes como hospitales, asilos, guarderías, restaurantes y en cruceros (Mounts *et al.*, 2000).

En muestras de materia fecal se ha encontrado que los calicivirus son tan frecuentes como los rotavirus (Monroe *et al.*, 2000). El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) estima que 23 millones de los casos agudos de gastroenteritis reportados entre 1997 y 2000 se debieron a Norovirus (CDC, 2001).

Adenovirus. Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae. Estos virus se asocian con gastroenteritis, conjuntivitis y enfermedades respiratorias (Van Heerden *et al.*, 2003). Su transmisión depende del serotipo y de la enfermedad asociada pudiendo ser por contacto directo, por vía fecal-oral y por agua (Pina, 2001). En particular los serotipos 40 y 41 se asocian con el 20% de las diarreas infantiles en niños menores de dos años (Favier *et al.*, 2002) y se les reconoce como segundo agente etiológico de diarreas infantiles después de rotavirus (Jiang *et al.*, 2001). Las gastroenteritis se pueden prolongar por 14 días. Se han detectado infecciones asintomáticas y hay un incremento en

la incidencia de gastroenteritis por adenovirus en los meses templados (Petric, 1995). Los serotipos 40 y 41 se han detectado en aguas residuales tanto crudas como tratadas, en agua superficial (Pina *et al.*, 1998) y en agua marina (Vantarakis & Papapetropoulou, 1998).

Hepatitis A. Taxonómicamente este virus se ubica dentro de la familia Picornaviride dentro del género Hepatovirus (Pina, 2001). Una persona infectada por hepatitis A evacua 10⁹ partículas g-1 de heces (Cerdana y Stapleton, 1995; Nicand *et al.*, 1998). La enfermedad presenta síntomas como fiebre, náusea, vómito, anorexia y diarrea, con ictericia que no siempre es aparente (Bosch *et al.*, 2001). El contagio de la enfermedad es por ruta fecal-oral, por contacto con personas enfermas y por consumo de agua y alimentos contaminados (Nicand *et al.*, 1998; Pina, 2001).

Este virus es la causa más común entre las hepatitis en los Estados Unidos, y México esta dentro de la zona endémica de Latinoamérica (Tanaka, 2000).

IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA

Las evaluaciones de calidad del agua en el mundo han estado basadas durante décadas en la determinación de bacterias coliformes de origen fecal, las cuales se usan como indicadores de la presencia de patógenos humanos. Esto presenta serias limitaciones, dado que la presencia de bacterias tiene un valor predictivo bajo o nulo para otros grupos de microorganismos como son los virus y protozoarios (Grabow *et al.*, 2001). En las regulaciones y criterios de calidad del agua de países como Estados Unidos (USEPA, 1999) y la Comunidad Europea (EC, 1980), se incluye la determinación de virus en agua para uso y consumo humano (Grabow *et al.*, 2001) y en ese mismo sentido la Organización Mundial de la Salud recomienda que el agua para consumo humano debe estar libre de enterovirus (WHO, 1996).

El desarrollo de técnicas para la detección de virus en agua ha permitido que las evaluaciones de calidad del agua para diversos usos presenten una nueva perspectiva (Grabow *et*

Tabla 4. Virus humanos que se han detectado en diferentes tipos de agua.

Tipo de virus	Tipo de agua	Sitio	Referencia
Astrovirus	Residual	Sud Africa	Marx <i>et al.</i> , 1998
Adenovirus y enterovirus	Marina	SW Grecia	Vantarakis & Papapetropoulou, 1998
Entéricos y reovirus	Marina/estuarina	Mar Adriático	Muscillo <i>et al.</i> , 1997
Entéricos	Residual	Auckland, N. Zelanda	Green & Lewis, 1999
Adenovirus,	Residual	Barcelona, España	Pina <i>et al.</i> , 1998
Enterovirus,	Dulce (río)	Barcelona, España	Pina <i>et al.</i> , 1998
Hepatitis A	Marina	Barcelona, España	Pina <i>et al.</i> , 1998

al., 2001), en la que se considera a los virus humanos como otros agentes contaminantes (Blumenthal *et al.*, 2000), para los que deben establecerse normas de acuerdo a los riesgos de salud aceptables para la población humana (Rose & Gerba, 1991; Haas *et al.*, 1993).

Para detectar virus humanos en agua se requiere de equipo y de personal especializado, en mayor grado que lo que se necesita para detectar bacterias, por lo que con el propósito de monitorear la calidad viral del agua, se ha planteado el uso de bacteriófagos como modelo de virus entéricos para su posible aplicación como indicadores de contaminación viral (Araujo *et al.*, 1997; Puig *et al.*, 2001).

Debido a la crisis de escasez mundial de agua para uso y consumo humano y considerando que el reúso representa una de las alternativas para responder a la creciente demanda de agua, en años recientes, los esfuerzos se han orientado hacia el reciclaje. Una de las propuestas de reúso es utilizar el agua residual para riego agrícola (Blumenthal *et al.*, 2000), dado que esta actividad representa el mayor consumo de agua, esto es, dos terceras partes del agua a nivel mundial (Postel, 2001). La propuesta resulta económicamente conveniente, no obstante, debe considerarse que existe el riesgo de contaminación fecal viral de los sistemas de agua subterránea subyacentes (Yates *et al.*, 1987) debido a la habilidad de los virus para migrar distancias significativas a través del suelo (McKay *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1998).

El agua destinada para consumo humano básicamente es subterránea, de modo que la contaminación fecal de ésta puede constituir un problema serio de salud (Yates *et al.*, 1987). Lo anterior podría suceder por un reúso de agua residual o superficial contaminada, que no haya recibido previamente un tratamiento adecuado y también por una mala o nula protección de pozos de extracción de agua subterránea (Kopecka *et al.*, 1993; Muscillo *et al.*, 1997; Pallin *et al.*, 1997).

De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades infecciosas provocaron la muerte a 16.3 millones de personas en 1993, de las que 3 millones corresponden a muertes por enfermedades diarreicas (Platt, 1996). Durante 2001 se estimó que 2 millones de muertes fueron causadas por enfermedades diarreicas asociadas con agua (UNESCO, 2003). Además de millones de muertes, es importante considerar los millones de eventos de infección, que sin llegar a ser mortales, también tienen efectos en la calidad de vida de la población (Platt, 1996). La UNESCO (2003) estimó una morbilidad por enfermedades diarreicas de 62 millones de casos para 2001.

Las enfermedades diarreicas de origen no bacteriano afectan a un amplio sector de la población en todo el mundo. En países desarrollados son la causa principal de morbilidad en niños menores de 5 años (Gilgen *et al.*, 1995; Rotbart, 1995) y en los países en desarrollo son la causa principal de morbilidad y mortalidad en ese mismo grupo de edad (Kapikian & Chanok, 1991).

En México la incidencia de enfermedad diarreica por virus ha sido documentada a partir de estudios epidemiológicos (Farkas *et al.*, 2000). Se ha identificado un patrón estacional

en cuanto a los agentes causales de diarrea en niños mexicanos. Durante los meses de verano (calor-lluvias) hay una mayor incidencia de infecciones bacterianas (López-Vidal *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1994; Calva, 1998), mientras que en los meses de otoño-inverno (frío-secas) las diarreas se asocian a virus, principalmente a rotavirus (Le Baron *et al.*, 1990; Calva, 1998; Villa *et al.*, 1999). Rotavirus se reporta como el principal agente causal de diarreas en niños mexicanos menores de dos años durante el invierno, atribuyéndosele entre el 25 y 50% de los casos (Villa *et al.*, 1999).

Jiang y colaboradores (1995) monitorearon a 200 niños mexicanos desde su nacimiento hasta los dos años de edad, para estimar la prevalencia de infecciones por el virus Norwalk, encontrando que la prevalencia de anticuerpos en el suero sanguíneo es del 85% a los dos años de edad, y en un subgrupo del total de niños monitoreados, que fue seguido hasta los cinco años de edad, la seroprevalencia de anticuerpos se incrementó a 100%. Los autores concluyeron que la importancia del virus Norwalk como agente causal de diarreas en niños menores de dos años, puede ser similar a la de rotavirus.

Astrovirus también se ha identificado en episodios diarreicos en niños mexicanos, reportándose que la prevalencia en niños hospitalizados por diarrea es del 2 al 16%, y este porcentaje es entre 5 y 17% al realizar un estudio en una comunidad donde los niños no requirieron hospitalización (Walter *et al.*, 2001). Las infecciones por astrovirus se presentan en los dos primeros años de vida y se detectaron hasta seis tipos presentes simultáneamente en una sola comunidad (Méndez-Toss *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2001).

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS EN AGUA

La cantidad de virus en ambientes acuáticos es variable, de modo que con frecuencia es necesario concentrar muestras de agua para detectarlos (Abbaszadegan *et al.*, 1999). La concentración de muestras por filtración es la más utilizada y se realiza por medio de filtros de membrana, filtros de fibra de vidrio, filtros de membrana con carga negativa o positiva o por medio de cartuchos filtrantes con carga eléctrica (Griffin *et al.*, 2003). Después de la filtración los virus que estén adsorbidos al filtro son eluidos y reconcentrados por una serie de cambios de pH y centrifugación (Abbaszadegan *et al.*, 1999). A partir de las muestras concentradas se detectan las partículas virales presentes por diferentes métodos. Uno de ellos es el método directo, es decir, las partículas virales se caracterizan por su talla y morfología a través de microscopía electrónica (Proctor, 1997). Otro método de conteo directo es por microscopía de epifluorescencia en el que las partículas virales emiten una señal fluorescente, visible al microscopio, cuando al virus se ha unido un fluorocromo (Wommack & Coldwell, 2000).

La infección de células cultivadas con agua ha sido el método más ampliamente usado para detectar virus activos. Sin embargo, el efecto de infección ocasionado por el virus

sobre las células, no es observable para todos los virus (Metcalf *et al.*, 1995; Grabow *et al.*, 2001). No obstante, en la actualidad es el método estándar para detectar virus infecciosos en ambientes acuáticos (Griffin *et al.*, 2003).

Los métodos inmunológicos como ELISA, radioinmuno ensayo e inmunofluorescencia, usados en laboratorios clínicos, también se han probado para el análisis de muestras ambientales. Con estas técnicas se ha identificado virus para los que se cuenta con un anticuerpo específico, pero no es posible saber si se trata de virus infecciosos (Griffin *et al.*, 2003).

Al desarrollarse técnicas con base a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la detección de virus humanos en sistemas acuáticos ha sido rápida, específica y de una sensibilidad de hasta una partícula viral, factores que son fundamentales cuando se trata de virus humanos de interés para salud pública (Grabow *et al.*, 2001). La técnica de transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha sido particularmente importante para la detección de virus de RNA, ya que en teoría se considera que es capaz de detectar este tipo de virus infeccioso o no (Grabow *et al.*, 2001). La especificidad de las técnicas de PCR y RT-PCR radica en que se detectan secuencias de nucleótidos del genoma del virus de interés, aunque no es posible saber si los virus detectados son activos o infecciosos (Sobsey *et al.*, 1998; Abbaszadegan *et al.*, 1999).

Otro método que se ha reportado para la detección de virus en agua es la hibridación, en el que una sonda o un oligonucleotido, con una marca radioactiva o fluorescente, hibrida con la región específica del genoma viral de interés, normalmente este método se utiliza como complemento a fin de confirmar los resultados. Por ejemplo cuando se hace un RT-PCR (Kopecka *et al.*, 1993).

La infección de células seguida de una PCR (ICC-PCR) es un método que tiene como principal ventaja que se amplifica un segmento del genoma de los virus infecciosos (Reynolds *et al.*, 1996). El nivel de sensibilidad es de 1 PFU para enterovirus en un tiempo de análisis de 20 horas, mientras que para virus de hepatitis A la sensibilidad con este método fue de 1 a 10 PFU a las 72 y 96 horas (Reynolds *et al.*, 2001).

PCR en tiempo real es un método que recientemente ha sido adoptado para la detección en agua de astrovirus (Le Cann *et al.*, 2004) y de enterovirus (Donaldson *et al.*, 2002). Su principal ventaja es que es un método cuantitativo ya que los productos de PCR (amplicon) son marcados con fluorescencia cuya señal es proporcional a la cantidad de amplicones producidos (Griffin *et al.*, 2003).

MÉTODOS DE CONTROL

Cloro. El método más utilizado de desinfección del agua a nivel mundial es la cloración. Comúnmente se aplica el cloro como gas, hipoclorito de sodio (NaOCl) e hipoclorito de

calcio (Ca(OCl)₂); éstos últimos pueden aplicarse en solución o como pastillas (Vaughn & Novotny, 1991). Cuando el NaOCl y el Ca(OCl)₂ entran en contacto con el agua se ionizan, dejando disponible al ion hipoclorito (OCl⁻), que se combina con los iones hidrógeno (H⁺) del agua produciendo ácido hipocloroso, que es un potente oxidante a pH 6.5 a 7.0 (Vaughn & Novotny, 1991; Connell, 1996).

El control de bacterias en agua mediante desinfección con cloro, ha sido uno de los mayores avances en términos de salud pública, sin embargo, los niveles de cloro residual que en general establecen las normas de calidad del agua (entre 0.2 y 1.5 mg/L) no siempre son adecuados para eliminar otros agentes patógenos como calicivirus (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003), enterovirus y adenovirus (Junli *et al.*, 1997).

Junli y colaboradores (1997) reportan que seis tipos virales: poliovirus 1, coxsackievirus B, echovirus 11, adenovirus 7, herpes simplex y el virus de las paperas, sólo fueron inactivados al ser sometidos a 7 mg/L de cloro durante 60 minutos. Por otro lado, en la revisión que presentan Vaughn y Novotny (1991) se menciona que poliovirus es 130 veces más resistente al ácido hipocloroso que *E. coli*. Y también observan que rotavirus humano (Wa) y de simio (RRV) fueron los más resistentes al exponerlos a 7 mg/L de cloro, con respecto a poliovirus 1, coxsackievirus B5 y echovirus 1.

Una desventaja más del uso del cloro, es que en presencia de materia orgánica propicia la formación de trihalometanos (THMs) que son potencialmente carcinogénicos (Vaughn & Novotny, 1991; Connell, 1996; Silvano *et al.*, 2000). Los THMs se han asociado con incrementos en la incidencia de cáncer de vejiga (Cantor *et al.*, 1998) y cáncer rectal (Hildesheim *et al.*, 1998) en humanos. Estudios epidemiológicos recientes indican la relación entre una exposición a THMs en agua potable durante el embarazo y la ocurrencia de abortos (Waller *et al.*, 1998) y también defectos del tubo neural (Klotz y Pynch, 1999). En animales se ha encontrado que los THMs producen cáncer en hígado, riñón e intestinos (Dunnick & Melnick, 1993).

Dióxido de cloro. El dióxido de cloro (ClO₂) es un fuerte oxidante, con el agua reacciona formando predominantemente cloritos, cloratos y cloro. Entre el 50 y el 70% del ClO₂ reacciona para formar cloro (Tate y Fox, 1990). En general se ha considerado más eficiente para la inactivación de agentes virales en agua, en comparación con el cloro líquido. El intervalo de pH en el que el ClO₂ es capaz de inactivar virus va de pH 3 a 7, y para los seis tipos virales reportados por Junli y colaboradores (1997) sólo fue necesaria una concentración de 1 mg/L durante 30 minutos.

Ozono. Otro poderoso oxidante que se utiliza para desinfección de agua es el ozono (O₃). Es un gas inestable, moderadamente soluble en agua. Con respecto a la inactivación de virus, el ozono representa una buena alternativa, pues las concentraciones de inactivación para poliovirus son de 0.05 a 0.45 mg/L. El proceso de desinfección se basa en la destrucción de las partículas virales a nivel de proteínas de cápside y de material genómico. Por ejemplo, el daño en poliovirus 1 aparentemente se da en las

proteínas de cápside, en cambio para rotavirus Wa y RRV, el daño es en proteínas de cápside y en los segmentos de RNA (Vaughn & Novotny, 1991).

Este método de desinfección es utilizado en sistemas de distribución de agua en Europa y su uso se ha incrementado en Estados Unidos (Tate & Fox, 1990). Sin embargo, el uso de ozono como desinfectante se recomienda como parte del tratamiento para agua potable, pero no como único método, debido a su moderada solubilidad, aunque tiene la ventaja de presentar niveles residuales que permiten monitorear y garantizar la calidad del agua que se distribuye a la población (Gottschalk *et al.*, 2000). En países en desarrollo es poco usado por ser muy costoso en comparación con otros métodos de desinfección.

Luz UV. Los rayos ultravioleta (UV) para la desinfección del agua se han venido utilizando en Europa para potabilización de agua para consumo humano desde hace 100 años, mientras que en Estados Unidos este método se utiliza para el tratamiento de aguas residuales, considerándolo como un método efectivo para la eliminación de bacterias y virus (Kolch, 1999).

Se ha reportado que en general los virus con genoma formado por una hebra sencilla de material genético son más sensibles a la radiación UV con respecto a los de doble cadena. Igualmente, son más resistentes los virus que tienen DNA que los que tienen RNA, y la sensibilidad se incrementa conforme aumenta el tamaño del genoma (Vaughn & Novotny, 1991). La radiación UV provoca daños en el genoma de los microorganismos presentes en el agua, que resulta en una afectación del proceso normal de replicación (Vaughn & Novotny, 1991). La principal limitante para el uso de este método es que una vez desinfectada el agua no hay niveles residuales de algún compuesto que permita garantizar la calidad de la misma, lo cual representa un problema en caso de contaminación en las redes de distribución (Acher *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

Se reconoce que enterovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus, adenovirus y el virus de hepatitis A, son capaces de persistir en el ambiente acuático con efectos severos en salud. Por estudios epidemiológicos hasta hoy se sabe que en México rotavirus, astrovirus y hepatitis A son agentes patógenos importantes en cuanto a enfermedades virales potencialmente transmitidas por agua.

En México se han publicado pocos estudios sobre virus en sistemas acuáticos, incluso este hecho podría ser extensivo a países en desarrollo. Como se puede observar en la información presentada a lo largo de este trabajo, es en países de zonas climáticamente distintas en donde se han realizado una parte importante de las investigaciones. En este sentido, es recomendable que en México se realicen trabajos orientados a conocer la situación en cuanto a la presencia de virus de importancia para la salud pública en agua subterránea como fuente principal de agua para

consumo de la población. En agua superficial que se aproveche para consumo humano o para riego de alimentos que se consuman crudos o para recreación, así como en agua residual tratada con fines de reutilización.

Por otro lado, se deben revisar las normas oficiales mexicanas vigentes: NOM-127 sobre agua para uso y consumo humano (DOF, 2000), NOM-003 sobre límites máximos permisibles de contaminantes en agua residual tratada para reúso (DOF, 1998) y NOM-001 sobre límites permisibles de contaminantes en aguas residuales que son descargadas en aguas y bienes nacionales (DOF, 1997), a fin de incluir a los virus dentro de los parámetros de calidad de agua que se evalúan periódicamente. En estas normas sólo se contempla a las bacterias coliformes como organismos indicadores de contaminación fecal, sin embargo, estos organismos no indican la presencia de virus. En países como Estados Unidos de América y los integrantes de la Comunidad Europea, ya se realizan monitoreos de calidad viral del agua utilizando la detección de enterovirus como agente indicador de contaminación viral fecal, esta opción podría evaluarse para el caso de México. Otra propuesta que se ha manejado en la literatura es el uso de bacteriófagos como indicadores de contaminación viral fecal, esta opción también sería recomendable evaluarla y poder tener una propuesta concreta para ser considerada en las normas oficiales mexicanas, de acuerdo con la realidad nacional.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada a la primera autora. A la DGAPA-UNAM por el apoyo del proyecto IN219303

REFERENCIAS

- ABAD, F. X., R. M. PINTÓ & A. BOSCH. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology* 60(10): 3704-3710.
- ABBASZADEGAN, M., P. STEWART & M. LECHVALLIER. 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 444-449.
- ACHER, A., E. FISCHER, R. TURNHEIM & Y. MANOR. 1997. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. *Water Research* 31(6): 1398-1404.
- ARAUJO, R. M., A. PUIG, J. LASOBRAS, F. LUCENA & J. JOFRE. 1997. Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution. *Journal of Applied Microbiology* 82: 281-286.
- ARIAS, C. F., P. ISA, C. A. GUERRERO, E. MÉNDEZ, S. ZÁRATE, T. LÓPEZ, R. ESPINOSA, P. ROMERO & S. LÓPEZ. 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. *Archives of Medical Research* 33(2002): 356-361.
- BERGH, D., K. Y. BARSHEIM, G. BRATBAK, & M. HELDAL. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467-468.
- BERGSTEIN-BEN DAN, T., D. WYNE Y J. MANOR. 1997. Survival of enteric bacteria and viruses in Lake Kinneret, Israel. *Water Research* 31(11): 2755-2760.

- BLUMENTHAL, U. J., D. D. MARA, A. PEASEY, G. RUIZ-PALACIOS & R. STOTT. 2000. Guidelines for microbial quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin World Health Organization* 78(9): 1104-1116.
- BOSCH, A., G. SÁNCHEZ, F. LE GUYADER, H. VANACLOCHA, L. HAUGARREAU Y R. M. PINTÓ. 2001. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology* 43(2): 61-65.
- BRATBAK, G., H. MIKAL, S. NORLAND & F. THINGSTAD. 1990. Viruses as patrons in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology* 56(5): 1400-1405.
- CALVA, J. J. 1998. Las enfermedades diarreicas en niños mexicanos. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica*: 12-17.
- CANTOR, K. P., C. F. LYNCH, M. E. HILDESHEIM, M. DOSEMECI, J. LUBIN, M. ALAVANJA & G. F. CRAUN. 1998. Drinking water source and chlorination byproducts-I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology* 9(1): 21-28.
- CDC. 2001. Norwalk-Like viruses. Public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 50(RR-9): 1-13.
- CERDENA, J. B. & J. T. STAPLETON. 1995. Hepatitis A virus. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover & R. H. Tenover (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington. DC., pp 1025-1032.
- CHRISTENSEN, M. L. 1995. Rotavirus. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover & R. H. Tenover (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington. DC., pp 1012-1016.
- CONNELL, G. F. 1996. *The Chlorination/Chloramination Handbook*. AWWA. Denver, CO. 171 p.
- DEETZ, T. R., E. M. SMITH, S. M. GOYAL, C. P. GERBA, J. J. VOLLET III, L. TSAI, H. L. DUPONT & B. H. KESWICK. 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Research* 18(5): 567-571.
- DOF. 1997. NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. DOF 6 de enero de 1997.
- DOF. 1998. NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-003-ECOL-1997. Límites máximos permisibles para aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. DOF 21 de septiembre de 1998.
- DOF. 2000. MODIFICACIÓN A LA NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. DOF 22 de noviembre de 2000.
- DONALDSON, K. A., D. W. GRIFFIN & J. H. PAUL. 2002. Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Research* 36(2002): 2505-2514.
- DUNNICK, J. K. Y R. L. MELNICK. 1993. Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: Experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *Journal of the National Cancer Institute* 85(10): 817-822.
- EC. 1980. Council Directive of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/ EEC). *Official Journal European Community* No. L229: 11-22.
- EDWARD, P. W. 1994. *Evolution of infectious disease*. Oxford University Press, Oxford 298 p.
- ESTES, M. 1996. Rotaviruses. In: Fields, B. N., D. M. Knipe y P. M. Howley.(Eds.). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, pp 1625-1655.
- FARKAS, T., X. JIANG, M. L. GUERRERO, W. ZHONG, N. WILTON, T. BERKE, D. O. MATSON, L. K. PICKERING & G. RUIZ-PALACIOS. 2000. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in mexican children. *Journal Medical Virology* 62: 217-223.
- FAVIER, A. L., G. SCHOEHN, M. JAQUINOD, CH. HARSÍ & J. CHROBOCZEK. 2002. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* 293: 75-85.
- FERNÁNDEZ-JAUREGUI, C. A. 1999. El agua como fuente de conflictos: repaso de los focos de conflictos en el mundo. *Revista Cidob d'Afers Internationals* 1999 (45-46):72-80.
- FUHRMAN, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects, *Nature* 399(6736): 541-548.
- GANTZER, C., A. MAUL, J. M. AUDIC & L. SCHWARTZBROD. 1998. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages and Bacteroides fragilis phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4307-4312.
- GERBA, C. P. Y J. ROSE. 1990. Viruses in source and drinking water. In: Mcfeter, G. A. (Ed.). *Drinking Water Microbiology*. Springer Verlag, New York, pp 380-396.
- GILGEN, M., B. WEGMLER, R. BURKHALTER, H. P. BUHLER, U. MULLER, J. LUTHY & U. CANDRIAN. 1995. Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4): 1226-1231.
- GILGEN, M., D. GERMANN, J. LÜTHY & PH. HÜBNER. 1997. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus and small round structured viruses in water samples. *International Journal of Food Microbiology* 37(2-3): 189-199.
- GOTTSCHALK, C., J. A. LIBRA & A. SAUPE. 2000. *Ozonation of water and waste water*. Wiley-VCH. Weinheim, Germany (RFG), 189 p.
- GRABOW, W. O. K., K. L. BOTMA, J. C. DE VILLIERS, C. G. CLAY, & B. ERASMUS. 1999. Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bulletin World Health Organization* 77(2): 973-980.
- GRABOW, W. O. K., M. B. TAYLOR & J. C. DE VILLIERS. 2001. New methods for the detection of viruses call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology* 43(12): 1-8.
- GREEN, D. H. & G. D. LEWIS. 1999. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Water Research* 33(5): 1195-1200.
- GRIFFIN, D. W., K. A. DONALDSON, J. H. PAUL & J. B. ROSE. 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews* 16(1): 129-143.

- GUERRERO, L., J. J. CALVA, A. L. MORROW, R. VELÁZQUEZ, F. TUZ-DZIB, Y. LÓPEZ-VIDAL, H. ORTEGA, H. ARROYO, T. G. CLEARY, L. K. PICKREING, & G. RUIZ-PALACIOS. 1994. Asymptomatic Shigella infections in a cohort of mexican children younger than two years of age. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 13: 597-602.
- HAAS, C. N., J. B. ROSE, C. GERBA Y S. REGLI. 1993. Risk Assessment of Virus in Drinking Water. *Risk Analysis* 13(5): 545-552.
- HENNES, K. P. & M. SIMON. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1): 333-340.
- HILDESHEIM, M. E., K. P. CANTOR, C. F. LYNCH, M. DOSEMECI, J. LUBIN, M. ALAVANJA, & G. F. CRAUN. 1998. Drinking water source and chlorination by products-II. Risk of colon and rectal cancers. *Epidemiology* 9(1): 29-35.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMIC OF VIRUSES (ICTV). 2002. *ICTVdb Index of viruses*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>
- JIANG, S. C. & J. H. PAUL. 1998. Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microbial Ecology* 35(3): 235-243.
- JIANG, S., R. NOBLE & W. CHU. 2001. Human adenovirus and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1):179-184.
- JIANG, X., D. O. MATSON, F. R. VELÁZQUEZ, J. J. CALVA, W. M. ZHONG, J. HU, G. M. PALACIOS & L. K. PICKERING. 1995. Study of Norwalk-related viruses in mexican children. *Journal Medical Virology* 47(4): 309-316.
- JUNLI, H., W. LI, R. NENQI, L. X. LI, S. R. FUN & Y. GUANLE. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Research* 31(3): 455-460.
- KÄMMERER, U., B. KUNKEL & K. KORN. 1994. Nested PCR for specific detection and rapid identification of human Picornaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 32(2): 285-291.
- KAPIKIAN, A. Z. Y R. M. CHANOCK. 1991. Viral gastroenteritis. In: Evans, A. S. (Ed.). *Viral infections in humans*. Plenum Medial Book Co. New York, pp 293-340.
- KAPIKIAN, A. Z., M. K. ESTES & R. M. CHANOCK. 1996. Norwalk group of viruses. In: Fields, B. N., D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, pp 783-810.
- KLOTZ, J. B. & L. A. PYRCH. 1999. Neural tube defects and drinking water disinfection by-products. *Epidemiology* 10(4): 383-390.
- KOLCH, A. 1999. Disinfecting drinking water with UV light. *Pollution Engineering* 31(10): 34-36.
- KOPECKA, H., S. DUBROU, J. PREVOT, J. MARECHAL & J. M. LÓPEZ-PILA. 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 1213-1219.
- LE BARON, C.W., J. LEW, G. I. GLASS, J. M. WEBER, G. RUIZ-PALACIOS Y THE ROTAVIRUS STUDY GROUP. 1990. Annual Rotavirus Epidemic Patterns in North America. *Journal of the American Medical Association* 264(8): 983-988.
- LE CANN P., S. RANARIJAONA, S. MONPOEHO, F. LE GUYADER & V. FERRE. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology* 155(2004): 11-15.
- LE GUYADER, F., E. DUBOIS, D. MENARD & M. POMMEPUY. 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60(10): 3665-3671.
- LÓPEZ, S. & C. F. ARIAS. 2001. Los Rotavirus. In: Martínez-Romero, E. & J. C. Martínez-Romero (Eds.). *Microbios en línea*. Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno. UNAM. México. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
- LÓPEZ-VIDAL Y., J. J. CALVA, A. TRUJILLO, A. PONCE DE LEÓN, A. RAMOS, A. M. SVENNERHOLM & G. RUIZ-PALACIOS. 1990. Enterotoxins and Adhesins of *Enterotoxigenic Escherichia coli*: Are They Risk Factors fro Acute Diarrhea in the Community. *Journal of Infectious Diseases* 162: 442-447.
- MARIE, D., C. P. D. BRUSSAAND, R. THYRHAUG, G. BRATBAK Y D. VAULOT. 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 45-52.
- MARX, F. E., M. B. TAYLOR & W. O. K. GRABOW. 1998. The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human astroviruses in environmental water. *Water Research* 32(7): 2147-2153.
- MATHIAS, C. B., A. K. T. KIRSCHNER & B. VELIMIROV. 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10): 3734-3740.
- MATSUI, S. M. & H. B. GREENBERG, 1996. Astroviruses. In: Fields, B. N., D. M. Knipe, & P. M. Howley(Eds.). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, pp 811-824.
- McKAY, L., J. A. CHERRY, R. C. BALES, M. T. YAHYA Y C. P. GERBA. 1993. A Field Example of Bacteriophages as Tracers of Fracture Flow. *Environmental Science and Technology* 27(6): 1075-1079.
- MEDINA, S. M., M. F. GUTIÉRREZ, F. LIPANDRI & J. E. LDERT. 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3481-3483.
- MELNICK, J. L. 1996A. Current status of poliovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9(3): 293-300.
- MELNICK, J. L. 1996B. My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annual Review of Microbiology* 50: 1-24.
- MENDEZ-TOSS, M., P. ROMERO-GUIDO, M. E. MUNGUÍA, E. MÉNDEZ & C. ARIAS. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *Journal of General Virology* 81(12): 2891-2897.
- METCALF, T. G., J. L. MELNICK & M. K. ESTES. 1995. Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology- a trip of over 50 years. *Annual Review Microbiology* 49: 461-487.

- MONROE, S. S., T. ANDO & R. I. GLASS. 2000. Human enteric caliciviruses—An emerging pathogen whose time has come. *Journal of Infectious Diseases* 181(Suppl 2): S249-251.
- MOTA-HERNÁNDEZ, F., J. J. CALVA, C. GUTIÉRREZ-CAMACHO, S. VILLA-CONTRERAS, C. F. ARIAS, L. PADILLA-NORIEGA, H. GUISCAFRÉ-GALLARDO, L. GUERRERO, S. LÓPEZ, O. MUÑOZ, J. F. CONTRERAS, R. CEDILLO, I. HERRERA & F. I. PUERTO. 2003. Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children. *Journal of Clinical Microbiology* 41(7): 3158-3162.
- MOUNTS, A. W., T. ANDO, M. KOOPMANS, J. S. BRESEE, J. NOEL & R. I. GLASS. 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases* 181(Suppl 2): S284-287.
- MUSCILLO, M., A. CARDUCCI, G. LA ROSA, L. CANTIANI Y C. MARIANELLI. 1997. Enteric virus detection in Adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Research* 31(8): 1980-1984.
- NASH, L. 1993. Water quality and health. In: Gleick, P. H. (Ed.) *Water in Crisis. A Guide to the World's Fresh Water Resources*. Oxford University Press. New York, pp 25-39.
- NASSER, A. M. & S. D. OMAN. 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research* 33(7): 1748-1752.
- NICAND, E., R. TEYSSOU & Y. BUISSON. 1998. Le risqué fécal viral en 1998. *Virologie* 2(2): 103-116.
- PACE, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276(5313): 734-740.
- PADILLA-NORIEGA, L., M. MENDEZ-TOSS, G. MENCHACA, J.F. CONTRERAS, P. ROMERO-GUIDO, F. I. PUERTO, H. GUISCAFRE, F. MOTA, I. HERRERA, R. CEDILLO, O. MUÑOZ, J. CALVA, M. L. GUERRERO, B. S. COULSON, H. B. GREENBERG, S. LÓPEZ & C. F. ARIAS. 1998. Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology* 36(6): 1688-1692.
- PALLIN, R., A. P. WYN-JONES, B. M. PLACE & N. F. LIGHTFOOT. 1997. The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 67(1): 57-67.
- PAYMENT, P., A. BERGE, M. PRÉVOST, B. MÈNARD & B. BARBEAU. 2000. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Canadian Journal Microbiology* 46(6): 565-576.
- PETRIC, M. 1995. Caliciviruses, astroviruses and other diarrheic viruses. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Tenover & R. H. Tenover (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, DC., pp 1017-1024.
- PINA, S. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Barcelona, España 280 p.
- PINA, S., M. PUIG, F. LUCENA, J. JOFRE & R. GIRONES. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenoviruses detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3376-3382.
- PINTÓ, R. M., F. X. ABAD, R. GAJARDO & A. BOSCH. 1996. Detection of infectious astrovirus in water. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5): 1811-1813.
- PLATT, A. E. 1996. Infecting ourselves: How environmental and social disruptions trigger disease. *World Watch paper 129*. Worldwatch Institute, Washington, DC. 79 p.
- POSTEL, S. L., G. C. DAILY & P. R. EHRLICH. 1996. Human appropriation of renewable fresh water. *Science* 271: 785-788.
- POSTEL, S. 2001. Growing more Food with less Water. *Scientific American. February 2001*: 34-37.
- PROCTOR, L. M. 1997. Advances in study of marine viruses. *Microscopy Research and Technique* 37(2): 136-161.
- PUIG, A., R. ARAUJO, J. JOFRE & J. FRIAS-LÓPEZ. 2001. Identification of cell wall proteins of *Bacteroides fragilis* to which bacteriophage B40-8 binds specifically. *Microbiology* 147(2): 281-288.
- REYNOLDS K. A., C. P. GERBA & LL. PEPPER. 1996. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1424-1427.
- REYNOLDS K. A., C. P. GERBA, M. ABBASZADEGAN & LL. PEPPER. 2001. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology* 47(2): 153-157.
- ROSE, J. B. Y C. P. GERBA. 1991. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Water Science and Technology* 24(2): 29-34.
- ROTBART, H. A. 1995. Enterovirus. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Tenover, F. C. Tenover & R. H. Tenover (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, DC, pp 1004-1011.
- RUECKERT, R. R. 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B. N., D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, pp 609-654.
- SARMIENTO-PÉREZ, L., P.MÁS-LAGO, I. AVALOS-RENDÓN, R. PALOMERA-PUENTES, J. BARRIOS-OLIVERA, & M. BELLO-CORREDOR. 1999. Valoración de una novedosa tecnología para la detección de enterovirus en aguas negras. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 51(3): 166-171.
- SARMIENTO-PÉREZ, L., I. AVALOS-RENDÓN, Y. RAMOS-VALDÉS, P. MÁS-LAGO, M. BELLO-CORREDOR, R. PALOMERA-PUENTES & J. BARRIOS-OLIVERA. 2000. Detección rápida de enterovirus mediante un método directo de reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 52(1): 15-20.
- SILVANO, M., D. FERETTI, C. COLLIVIGNARELLI, L. GUZZELLA, I. ZERBINI, G. BERTANZA & R. PEDRAZZANI. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research* 34(17): 4261-4269.
- SOBSEY, M. D., D. A. BATTIGELLI, G. A. SHIN & S. NEWLAND. 1998. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology* 38(12): 91-94.

- STANWAY, G. 1990. Structure, function and evolution of picornaviruses. *Journal of General Virology* 71(11): 2483-2501.
- TANAKA, J. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18(200):S57-S60.
- TATE, C. H. & K. FOX-ARNOLD. 1990. Health and aesthetic aspects of water quality. In: Pontius, F. W. (Ed.). *Water quality and treatment*. AWWA. McGraw-Hill, New York, pp 63-154.
- THOMPSON, S. S., M. FLURY, M. V. YATES & W. A. JURY. 1998. Role of the air-water-solid interface in bacteriophage sorption experiments. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1): 304-309.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., C. N. HAAS, J. JACANGELO & C. P. GERBA. 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3979-3985.
- UNESCO. 2003. Water for people water for life. United Nations World Water Development Report. World Water Assessment Programme. Barcelona, Spain 36 p.
- USEPA. 1999. Safe Drinking Water Is In Our Hands. Office of Water. EPA815-F-99-004. August 1999: 1-26.
- VAN HANNEN, E. J., G. ZWART, M. P. VAN AGTERVELD, H. J. GONS, J. EBERT & H. J. LAANBROEK. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 795-801.
- VAN HEERDEN, J., M. M. EHLERS, W. B. VAN ZYL, & W. O.K. GRABOW. 2003. Incidence of adenovirus in raw and treated water. *Water Research* 37(2003): 3704-3708.
- VANTARAKIS, A. C. & M. PAPAPETROPOULOU. 1998. Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Research* 32(8): 2365-2372.
- VAUGHN, J. M. & J. F. NOVOTNY. 1991. Virus inactivation by disinfectants. In: Hurst, C. J. (Ed.). *Modeling the environmental fate of microorganisms*. U.S. EPA. American Society for Microbiology, pp 217-241.
- VILLA, S., H. GUISCAFRÉ, H. MARTÍNEZ, O. MUÑOZ & G. GUTIÉRREZ. 1999. Mortalidad estacional por diarrea entre niños mexicanos. *Bulletin of the World Health Organization* 77(5): 375-380.
- WALLER, K, S. H. SWAN, G. DELORENZE & B. HOPKINS. 1998. Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology* 9(2): 134-140.
- WALTER, J. E. & D. K. MITCHELL. 2000. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Current Opinion Pediatrics* 12(3): 275-279.
- WALTER, J. E., D. K. MITCHELL, M. L. GUERRERO, T. BERKE, D. O. MATSON, S. S. MONROE, L. K. PICKERING & G. RUIZ-PALACIOS. 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from periurban community of Mexico City. *Journal Infectious Diseases* 183: 681-686.
- WEINBAUER, M. G., D. FUKS & P. PEDUZZI. 1993. Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the Northern Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12): 4074-4082.
- WEINBAUER, M. G. & M. G. HÖFLE. 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 431-438.
- WHO. 1996. *Guidelines for drinking water quality*: volume 2. Health criteria and other supporting information. 2nd Ed. World Health Organization, Geneva, pp 10-99.
- WOMMACK, K. E., R. T. HILL, M. KESSEL, E. RUSSEK-COHEN & R. R. COLWELL. 1992. Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 2965-2970.
- WOMMACK, K. E., J. RAVEL, R. T. HILL & R. R. COLWELL. 1999. Hybridization analysis of Chesapeake Bay viroplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 241-250.
- WOMMACK, K. & R. R. COLWELL. 2000. Viroplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(1): 69-114.
- YATES, M. V., C. GERBA & L. M. KELLEY. 1985. Virus persistence in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 49(4): 778-781.
- YATES, M. V., S. R. YATES, J. WAGNER & C. P. GERBA. 1987. Modeling virus survival and transport in the subsurface. *Journal Contamination Hydrology* 1: 329-345.

Recibido: 15 de octubre de 2003.

Aceptado: 11 de junio de 2004.

CAPITULO 3

Virus entéricos y bacterias indicadoras para evaluar la calidad del agua en el sur de la Ciudad de México

Sometido a revista internacional arbitrada:

Espinosa A C, C F Arias, S Sánchez-Colón, M Mazari-Hiriart. Seasonal presence of enteric viruses and indicator bacteria for evaluating water quality in the South region of Mexico City. *Science of the Total Environment* (Ref. STOTEN-S- 08-02195)

Seasonal presence of enteric viruses and indicator bacteria for evaluating water quality in the South region of Mexico City

Ana C. Espinosa^a, Carlos F. Arias^b, Salvador Sánchez-Colón^c, and Marisa Mazari-Hiriart^{a*}

^a Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacan, 04510 México, D.F., México.

*Corresponding author: Marisa Mazari-Hiriart. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacan, 04510 México, D.F., México. Phone (5255) 56228998. Fax (5255) 56228995.

Email mazari@servidor.unam.mx

^b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México.

^c Consultoría Ambiental y Estadística, Cerrada de Cortés 43, Colonia Campestre Tlacopac, San Ángel, 01049 México, D.F., México.

Running title

Virus and indicator bacteria in water

Abstract

Bacteria used as indicators for pathogenic microorganisms in water are not considered adequate as enteric virus indicators. Surface water from Xochimilco, a tropical highland system located in the South of Mexico City that receives rainwater, treated and non-treated wastewater used for irrigation, and groundwater used for drinking by those living in the Southern area of Mexico City, was studied. The seasonal presence of rotavirus, astrovirus, enterovirus, coliform bacteria, and faecal enterococci was determined during annual cycles in 2001 and 2002. Enteric viruses in concentrated water samples were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Bacteria analyses of the water samples was carried out following membrane filtration, plating onto selective media and then counting for three bacterial types. The presence of viruses and bacteria in the water used for irrigation showed no relationship between current bacterial indicator detection and viral presence. In addition, rotavirus and enterovirus showed significant seasonal differences in water used for irrigation, although this was not the case for astrovirus. Coliform bacteria and faecal enterococci did not show any particular trend. The seasonal viral presence for this tropical highland system is similar to data previously reported for temperate zones.

Key Words: Enteric virus, indicator bacteria, irrigation, water source, coliforms.

Introduction

At present, public health concerns remain focused on waterborne diseases, with gastroenteritis considered highly relevant due to incidence data in both developed and developing countries. A diversity of enteric bacteria and viruses has been detected in water, and has been associated with outbreaks of waterborne gastroenteritis.

Since the late 19th century, bacteria have been used as indicators of water quality (Medema et al., 2003). Although there are reports concerning the inadequacy of bacteria as microbiological water quality indicators (Skraber et al., 2004), it has been recognized that they are good indicators of a broad bacterial group, or pathogens, and regular human microbiota. Nevertheless, bacteria alone offer limited information regarding microbiological water quality as they do not reflect the presence of enteric viruses or protozoa (Borchardt et al., 2003).

The presence of viruses and other pathogens in the environment is a sign of faecal pollution that poses potential risk for the exposed population, since such pathogens do not constitute normal gastrointestinal flora, and are only excreted by sick individuals (Abad et al., 1997). Rotavirus is recognized as being responsible for diarrheal disease in young children with a worldwide mortality rate of 600,000 per year (Parashar et al., 2006). Astrovirus is also considered one of the most important agents of viral gastroenteritis (Foley et al., 2000; Gofti-Laroche et al., 2003) and is ranked second after rotavirus as the major cause for diarrheal disease in young children and adults (Matsui and Greenberg, 1996). While the actual contribution of rotavirus to total incidence of diarrheal disease is between 25% and

52%, astrovirus is much lower being responsible for between 5% and 10% of cases (Méndez and Arias, 2007).

In Mexico, during autumn and winter that occurs in the cold-dry season, rotavirus has been reported as the main etiologic agent of diarrheal disease in children aged 2 years and under, and as has already been mentioned is responsible for approximately 25%–50% of all cases (LeBaron et al., 1990; Villa et al., 1999). Epidemiological studies show a seasonal incidence of bacterial diarrheal disease mainly during the summer months that coincides with the warm-rainy season (Calva, 1998; Guerrero et al., 1994; López-Vidal et al., 1990).

It is important to consider enteric viruses in water quality studies not only because of their incidence as causal agents for diarrheal disease (LeBaron et al., 1990; Parashar et al., 2006), but also due to their characteristics that allow them to survive in the environment for long periods of time, and tolerate changing environmental conditions (Espinosa et al., 2008; Skraber et al., 2004).

Although it is not possible to establish a direct relationship between epidemiological and environmental data, it is important to consider microbial water quality in terms of water use. Furthermore, it is vital to assess the potential risk to the exposed population, especially in developing countries, considering that recycled water has been associated with the presence and re-emergence of waterborne diseases worldwide (Baggi et al., 2001).

Mexico is one of the main countries that reuse wastewater for irrigation over an area of land calculated to be 180,000 ha (Jiménez, 2006). This practice is likely to increase, and therefore, it would be advisable to assess water quality in terms of

viral composition and load in order to decrease the associated-risk to the population, considering food is grown under wastewater irrigation systems.

The aim of this study was to identify the presence of rotavirus, enterovirus, astrovirus, and indicator bacteria in a tropical highland system supplying the Southern area of the Mexico City Metropolitan Area (MCMA) with water for irrigation and drinking.

Materials and Methods

Mexico City Metropolitan Area (MCMA)

The study area is located in the South of the MCMA. It is a tropical highland aquatic system located at 2240 masl, between 19°02' and 20°12' N and 98°28' and 99°32' W, covering an area of 1,479 km². The average annual temperature is 16°C, but the temperature fluctuates greatly during the day with an average maximum of 25°C and minimum of 8°C. The rainy season mainly occurs during the summer and autumn months (May to October), while the rest of the year remains dry.

Study area

This study was carried out in the Xochimilco area, which is a remnant of a pre-hispanic lacustrine system located South of the MCMA. A network of canals supports the chinampas, one of the most ancient agro-ecological systems, with a high production of flowers and vegetables, and where the natural environment maintains it as a fertile area for agriculture (Crossley, 2004). In addition, it is one of the most diverse systems known to date in Mexico. Up to 100 years ago, the drainage of the Basin of Mexico desiccated most of the lacustrine area (Armillas, 1971). This water drainage system also led to a significant reduction in the chinampa area, which measured up to 20,000 hectares during the 15th Century (Canabal-Cristiani et al., 1995), but now has become highly urbanized, leaving only around 2,000 ha, almost half of which remains cultivable.

The canal system has evolved from a natural ecosystem into a completely managed system, supported mainly by treated wastewater (reclaimed water). Nonetheless, the system is recharged by rainwater during the rainy season,

together with natural drainage from the surrounding mountains, and a supply of untreated domestic wastewater. To reduce flood risk, reclaimed water volume is discharged from the wastewater treatment plants to the canal system, which accounts for approximately 995 L/sec during the dry season and 881 L/sec during the rainy season (Aguilar et al., 2006).

Agriculture and farming remain the main activities in this area with water being pumped from the canals for surface irrigation. Flowers and vegetables are cultivated in the area with some of the latter being eaten raw. There are some domestic animals, as well as “conservation areas” that have been invaded by squatter settlements, a common practice as part of the urbanization process in developing countries.

The area also represents an important source of water for the Southern region of the MCMA via a series of extraction wells located in the transition area, where soil material allows water filtration. However, during the last three decades, urbanization has raised other problems, such as areas sealed off by houses and streets, which limit the capacity and volume of soil-filtration and aquifer recharge. In addition, there is an apparent inefficiency in the treatment of increasing levels of wastewater that is channeled to the irrigation canals or filtered into the aquifer system. This situation reflects what is happening in many developing countries around the world, threatening the quality of water that is available for the most important of uses: drinking and agricultural irrigation.

Water samples

The presence of rotavirus, enterovirus and astrovirus, as well as the abundance of indicator bacteria in the water source and in water used for irrigation

was determined from samples obtained during the cold-dry (November to February) and warm-rainy (May to October) seasons in 2001 and 2002. These seasonal categories were defined according to two meteorological parameters: temperature and rainfall (CNA, 2001; 2002). Samples from water used for irrigation were obtained from ten sampling points, randomly selected from a regular grid of 250 observation points covering the Xochimilco canal network, set up for previous studies in the area (Mazari-Hiriart et al., 2008). For viral detection, a 20 L volume was collected at each sampling point for each season per year. Samples for bacteriological analyses were collected at a depth of 40 cm in 1 L sterile polypropylene flasks.

Water source samples were obtained from ten wells randomly selected from the total of 60 wells that form part of the Mexico City water supply system, located in the Xochimilco area. Samples were taken directly from the wells prior to chlorine disinfection. For each season and year, 1200 L of water was filtered through a 1MDS electropositive filtering cartridge at each well (CUNO, Meriden, CO). Within six hours of sampling, the cartridges were transported cold (4°C) to the laboratory. For bacterial analyses, 1 L samples were taken in sterile polypropylene containers. At each sampling point, pH, temperature and conductivity were measured using a portable YSI 3500 pH-conductivity meter (Yellow Spring, OH) and dissolved oxygen measured by a YSI 51B oxygen meter (Yellow Spring, OH). In the laboratory, the 80 water samples (10 samples from irrigation water and 10 water source samples, both taken each season for two years) were analyzed for the following enteric viruses: enterovirus (EV); rotavirus (RV); and astrovirus (AST);

and for indicator organisms including total coliform (TC), faecal coliform (FC), and faecal enterococci (FE), as described below.

RNA extraction and cDNA synthesis

Water samples were filtered through electropositive Virosorb 1MDS cartridges (CUNO, Meriden, CO). Once water samples were concentrated to a 30 mL volume, RNA was extracted using a Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and chloroform. Aliquots of 300 μ L of water were mixed with 300 μ L of PBS 1X and shaken vigorously five times, leaving the vials on ice for 1 minute between each shaking, and then centrifuged at 12,000 X g for 5 minutes. The upper phase containing RNA was transferred and 500 μ L of Trizol added, gently mixing for 1 minute before replacing on ice. This procedure was repeated five times.

Subsequently, 100 μ L of chloroform was added gently and shaken vigorously for five times. Following centrifugation at 12,000 X g for 5 minutes, the upper phase was recovered and incubated with the same volume of isopropanol at 4°C for 30 minutes, and then centrifuged for 15 minutes at 12,000 X g at 4°C. The pellet was washed with 1 mL of absolute ethanol and centrifuged for a further 5 minutes at 12,000 X g at 4°C. Finally, the pellet was dried at room temperature and re-suspended in 20 μ L RNase free water, and stored at -70°C until reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis took place.

cDNA synthesis (RT reaction) was performed in a 20 μ L reaction volume containing 1 μ L of RNA, 1 μ L of 5 pM primer, and 9.9 μ L nuclease-free water (Invitrogen, Carlsbad, CA) at 70°C for 10 minutes. Subsequently, 8.1 μ L of a mix containing 4 μ L of 5x first strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 2 μ L 0.1 M DTT, 2 μ L 5 mM dNTPs and 20 U Super Script II reverse

transcriptase (Invitrogen) was added. The reaction was carried out at 42°C for 1 hour and subsequently at 70°C for 15 minutes.

cDNA amplification

Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a 25 µL volume with a mix of 17.27µL nuclease-free water, 2.5 µL 10X buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% w/v gelatin], 1.6 µL 5 mM dNTPs, 1 µL of 25 pM of each primer, and 0.625 U of Ampli Taq Polymerase (Roche). The primers used to amplify the conserved region for group A that codes for the VP7 structural protein of rotavirus (RV) were as follows: forward (5-GGCTTTAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3) and reverse (5-GATCCTGTTGGCCATCC-3) (LeGuyader et al., 1994), for enterovirus (EV) the highly conserved region among picornaviruses 5' NCR forward (5-TCCGGCCCCTGAATGCGG-3) and reverse (5-CACCGGATGGCCAATCCAAT-3) (LeGuyader et al., 1994), and for astrovirus (AST) the conserved region of ORF2 forward (5- GGTGTCACAGGACCAAACC-3) and reverse (5-TTAGTGAGCCACCAGCCATC-3) (Noel et al., 1995).

The amplification conditions included denaturation at 94°C for 1 minute and 33 cycles at 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds and 72°C for 25 seconds, with a final elongation at 72°C for 7 minutes. Agarose gels were stained with ethidium bromide and examined under ultraviolet light.

Bacteriological water analyses

Bacteriological analyses of TC, FC, and FE were carried out according to the membrane filtration method using selective media and following standard procedures (APHA, 1998). The bacteriological culture media used in this study are

considered official in the APHA and Mexican regulations to enumerate indicator bacteria (APHA, 1998; DOF, 2006).

Statistical analysis

Data were analyzed using a generalized linear model approach (Crawley, 1993; 2005). First, differences between years, between seasons and between seasons within each year (year x season interaction) were tested for the presence of viruses and the abundance of indicator bacteria. For viruses, the response variable (presence/absence) was assumed to follow a Bernoulli distribution; the abundance of bacteria was assumed to follow a Poisson distribution. A full factorial model with Year (2001 vs. 2002) and Season (cold-dry vs. warm-rainy) factors was attached to each response variable (presence of rotavirus, enterovirus and astrovirus; abundance of TC, FC, and FE) separately. Statistical significance was determined by the change in deviance that its deletion from the model produced, which approximately follows a Chi-square distribution (Crawley, 1993).

Second, in order to examine the relationship between the presence of viruses or the abundance of bacteria with the physicochemical water variables recorded, log-linear (for bacteria abundance) or logit (for viral presence), separate models were attached to each response variable (abundance of TC, FC, and FE; presence of rotavirus, enterovirus and astrovirus) with each environmental variable (temperature, conductivity, pH and dissolved oxygen concentration) allowing these models to be considered as predictors. For viral models, the abundance of indicator bacteria (i.e., TC, FC and FE) was also included as a predictor. In each case, the significance of predictor variables in their relationship to the response

variables was identified in the same way as before, i.e. considering the change in deviance that its deletion from the model produced.

Results

Water used for irrigation

Deviance analysis resulting from the generalized linear model approach showed no significant differences between years, between seasons, nor between seasons within each year in terms of AST presence. However, there were significant differences between seasons when the presence of both EV and RV were considered. The presence of these pathogens was significantly more frequent during the cold-dry season (0.75 and 0.35, respectively) than in the warm-rainy season (0.10 and 0.05, respectively) (Fig. 1).

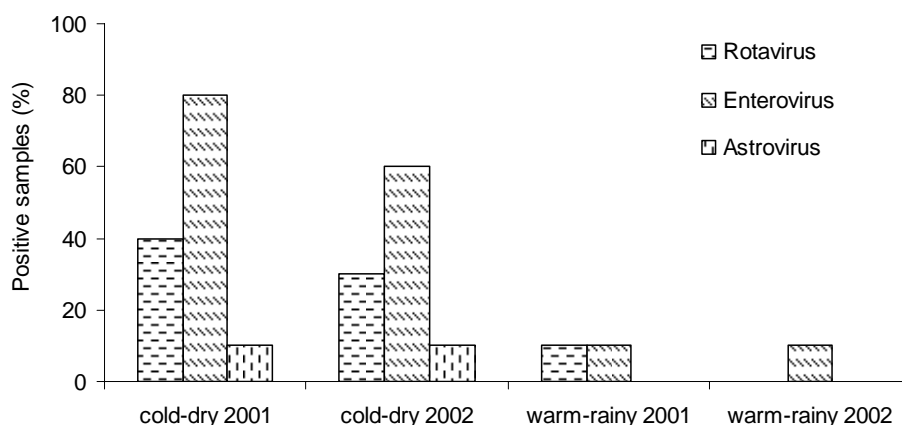


Fig. 1 - Percentage of RT-PCR positive samples for rotavirus (RV), enterovirus (EV) and astrovirus (AST) in water used for irrigation over annual cycles (2001 and 2002). The Astrovirus genome was not detected either of the two warm-rainy seasons, and the genome rotavirus was not detected during the 2002 warm-rainy.

The presence of AST and RV showed no significant relationship with any of the environmental variables recorded (pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen concentration) or with the abundance of bacterial indicators. By contrast,

EV presence was significantly related to temperature (Fig. 2) but not to the abundance of any of the bacterial indicators.

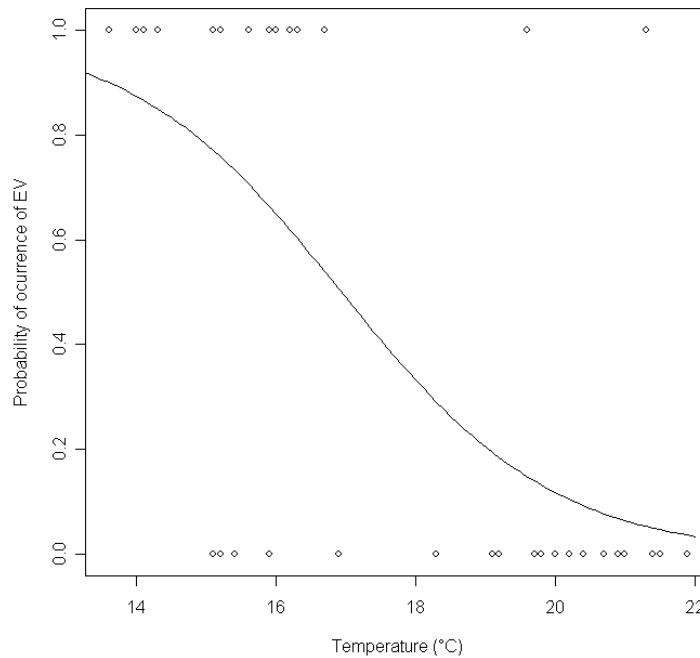


Fig. 2 - Relationship between EV presence and temperature in irrigation water. Points represent reported values (1 = presence, 0 = absence), while the continuous curve represents the logit model describing the relationship between the probability of EV presence and temperature: $P = \frac{\exp(11.1268 - 0.657 \cdot \text{Temperature})}{1 + \exp(11.1268 - 0.657 \cdot \text{Temperature})}$.

As for bacterial indicators, all samples were positive for the three bacterial groups, indicating continuous faecal contamination of the water used for irrigation. Deviance analysis showed no significant differences between years, between seasons, or between seasons within each year when the abundance of faecal coliform (FC) or faecal enterococci (FE) was considered. However, there was a significant relationship between the abundance of these bacterial groups and pH,

when the water pH increased, bacterial abundance decreased. By contrast, there were significant differences in the abundance of TC between years and between seasons. TC were significantly more abundant in 2001 than in 2002, and slightly higher during the dry season than during the rainy season (Fig. 3). However, the abundance of TC was not significantly related to any of the environmental variables (pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen concentration).

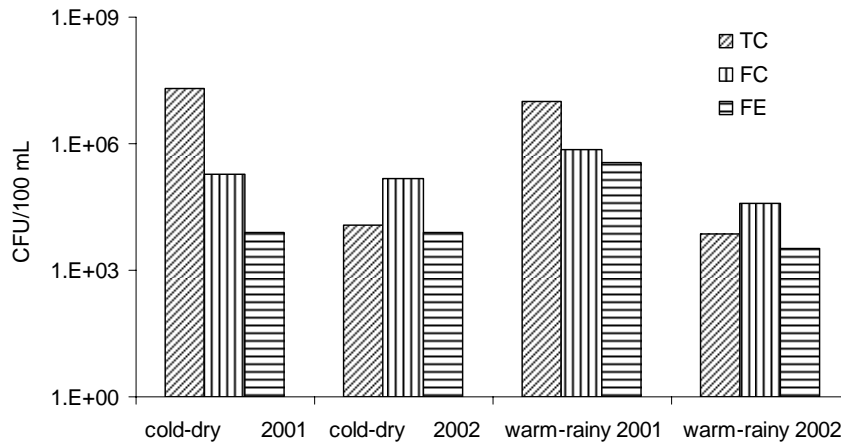


Fig. 3 - Counts of total coliforms (TC), faecal coliforms (FC) and faecal enterococci (FE) in water used for irrigation over two seasons each year. Bacterial counts were determined by filtration membrane method and standard culture media.

Water used for drinking

No viruses were detected in the drinking water wells prior to chlorination. According to the physicochemical parameters: pH; temperature; dissolved oxygen concentration; and conductivity; there were no differences in prevailing conditions

for each sampling station. This demonstrated that there was no seasonal difference in the conditions pertaining to these drinking water sources.

Indicator bacteria were detected in the pre-chlorinated drinking water samples. Results of TC, FC, and FE presence (Table 1) show that FE were most frequently isolated and most abundant, with 5 positive samples in 2001 and 13 positive samples in 2002. In terms of FE abundance, deviance analysis showed no significant difference between years, between seasons or between seasons within each year. Similarly, no significant relationship was found between the abundance of FE and any of the environmental variables (pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen concentration). There were significant differences between years and between seasons in both TC and FC abundance. These bacteria were significantly more abundant in 2002 than in 2001, and showed a higher presence during the dry season than the rainy season. TC and FC abundance were also significantly related to variation in conductivity.

Table 1. Indicator bacteria in water source. Total samples for year and season, and their total counts (CFU/100mL) for TC (total coliforms), FC (faecal coliforms) and FE (faecal enterococci).

Year/season	TC		FC		FE	
	+/n	CFU/100mL	+/n	CFU/100mL	+/n	CFU/100mL
2001						
warm-rainy	0/10	0	1/10	1	1/10	1
cold-dry	1/10	1	0/10	0	4/10	101
2002						
warm-rainy	2/10	24	1/10	1	7/10	370
cold-dry	4/10	404	4/10	53	6/10	216

+/n positive samples with respect to total number of samples

Physicochemical parameters

The physicochemical parameters recorded were temperature, conductivity, pH, and dissolved oxygen. Average values for each season, year, and water type are shown in Table 2.

Table 2. Average physicochemical parameters registered in water source samples and samples of water used for irrigation.

Parameter	2001		2002	
	Warm-rainy	Cold-dry	Warm-rainy	Cold-dry
Irrigation				
Temperature (°C)	20.77	15.26	19.90	15.15
pH	7.53	7.85	7.92	7.78
Conductivity (μS/cm)	658.00	711.00	477.20	727.10
Dissolved oxygen (mg/L)	3.27	2.82	3.93	3.94
Water source				
Temperature (°C)	16.86	15.83	16.02	16.41
pH	6.95	6.78	7.83	7.34
Conductivity (μS/cm)	379.30	315.40	463.30	293.10
Dissolved oxygen (mg/L)	3.48	4.57	3.52	3.09

When water used for irrigation was considered, the two-way variance analysis showed no significant differences between seasons or between years in terms of average pH or average dissolved oxygen concentration. The averages used in the analysis were mean averages. By contrast, average temperature during the cold-dry season was significantly ($p < 0.001$) lower than during the warm-rainy season. Significant variations between seasons within each year in terms of average conductivity were also found; in 2001 there were no significant differences between seasons, but in 2002, average conductivity was significantly

higher during the cold-dry season; suggesting that there is a variation between years for some parameters.

For water source samples, analyses showed no significant variations in terms of average temperature. By contrast, there were significant differences between years ($p < 0.001$) and between seasons ($p < 0.01$) in terms of average pH. Significant variations between seasons within each year for average dissolved oxygen concentration were also found. In 2001, average conductivity was significantly higher during the warm-rainy season, whereas in 2002 there were no significant differences between seasons. Finally, average conductivity was significantly higher ($p = 0.011$) during the cold-dry seasons.

Discussion

The Basin of Mexico where the study area of Xochimilco is located has been classified by García (1968) and Rzedowski (1979) as a tropical highland with an altitude of 2240 masl and climatic conditions with a cold-dry autumn and winter followed by a warm-dry spring and a warm-wet summer.

The current study used two basic meteorological parameters to define the seasonal categories (cold-dry and warm-rainy); temperature and rainfall as reported by the official National Meteorological System (Sistema Meteorológico Nacional) (CNA, 2001; 2002).

During the study period, viral detection and bacterial counts under these particular climatic conditions were higher in water used for irrigation, while water source samples showed no enteric viral presence and reduced bacterial counts; these differences will be discussed.

Water used for irrigation

The recorded temperatures relating to water used for irrigation varied significantly between seasons, with a lower temperature being recorded in the cold-dry season each year. During the cold-dry season the average low was 4°C with an average precipitation of less than 10 mm (CNA, 2001; 2002). During this period, the conditions in the canal network have an effect on the presence of both bacteria and enteric viruses. First, pathogens are more concentrated in the lower levels of water compared with the warm-rainy season; second, despite a higher concentration of organic matter (Mazari-Hiriart et al., 2008), the low temperature can affect bacterial activity (Barcina et al., 1986) and favour the presence of enteric viruses (Ward et al., 1986). These observations were supported by the results of

the current study for RV and EV, which showed a higher presence during the cold-dry season. Conversely, AST was present in only 10% of the samples. The variation between the frequencies of different viruses could be due to structural characteristics of the viruses in that the RV capsid presents three protein layers as compared with only one for AST. The higher frequency of EV (the most frequent of the three viruses studied) could be related to the massive polio vaccination campaigns that are undertaken in Mexico three times a year for children under 5 years of age. In previous studies, polio vaccine (types 1, 2, and 3) was isolated from both wastewater and river water 2 or 3 months following the vaccination campaign (Jiménez et al., 2001; Yoshida et al., 2002; Pavlov et al., 2005). Other studies are needed to ensure that the EV detected in the samples of water used for irrigation corresponded to the type of vaccine used around that time. Although this was not the aim of the current study, corroboration of campaign vaccine types in the water would provide clear evidence of viral faecal contamination.

In the warm-rainy season, the temperature can reach an average of 24°C (CNA, 2001; 2002), while rainfall can top 1,500 mm. At the beginning of the rainy season, two natural processes are evident in the canal system: soil washing and water dilution. Soil washing promotes an increase in both bacterial density and bacterial count in the water, while towards the middle of the rainy season, bacterial density decreases due to dilution. It could be argued that enteric viruses could present the same dynamic, but there is an important difference. The temperature during the warm-rainy season favours bacterial growth while the protein elements of enteric viral particles could be damaged by rising temperatures, as proved previously (Raphael et al., 1985; Hurst et al., 1989) when EV and RV were studied

in fresh water at 22°C and 20°C. Therefore, the time of sampling is very important to avoid skewed data; because if samples are taken at the beginning of the warm-rainy season, the bacteria count or enteric virus detection would probably be greater than they would be later in the season. In the current study, the sampling times were programmed for the middle of the rainy season, with the results reflecting a situation when there is water dilution.

RV, EV and AST were practically absent during the warm-rainy season in both years. The rainfall, plus a significant increase in temperature compared with that of the cold-dry season, can better explain the presence of these viruses in the water used for irrigation from this tropical highland area. As an aside, solar irradiation, especially UVB (320-280 nm), has recently been reported as an important parameter that affects viral presence and infectivity (Hijnen et al., 2006; Davies-Colley et al., 2005), and therefore, this is another environmental parameter that should be included in future studies.

Whereas high counts of all indicator bacteria in water used for irrigation were recorded in the cold-dry and the warm-rainy seasons, the number of TC was significantly higher in 2001, while FC and FE counts were found at similar levels in both years. In 2002, TC presence was lower than that of FC and FE. It is important to point out that TC is a group that includes enteric and non-enteric bacteria (Toranzos et al., 2007), and the lower TC counts could be related to interference of non-coliform bacteria that inhibit coliform bacteria growth, as has been shown by Burlingame et al. (1984), when m-Endo medium is used. Moreover, FC cultivated in m-FC medium at 44.5°C have been reported to promote non-E. coli thermophilic growth (Chao et al., 2003), which can produce a FC overestimation or false

positive result. The culture media used are those recommended by Standard Methods (APHA, 1998) and also correspond to the official Mexican methods (DOF, 2006) for the enumeration of TC and FC in the water samples. However, the use of other methods to measure indicator bacteria that show more specific results, mainly for water from tropical and subtropical areas (Chao et al., 2003), is recommended for subsequent studies.

The bacterial counts in water used for irrigation may be associated with human faecal contamination considering that the canal network is supported by rain water together with treated and non-treated wastewater. Additionally, livestock such as pigs and chickens are kept in backyards, as well as domestic pets such as cats and dogs, which contribute also to the contamination of the irrigation water. The TC and FE counts could also be associated with migratory waterfowl, especially during the autumn and winter seasons, which correspond to the cold-dry season in Mexico and which provide winter nesting sites for a large number of migratory birds due to the climatic conditions and food supply. The existence of the protected conservation areas in the region also help in promoting the migration of birds to Xochimilco (Meléndez, 2005).

Although this suburban area is totally managed, it can be compared with areas in which there has been little human impact where coliform bacteria have been detected and considered natural flora (Rivera et al., 1988; Luther and Fujioka, 2004). As a reference, the presence of bacteria in Magdalena River, which is also located in the Basin of Mexico, was compared. The upper river section is inside a natural conservation area and is relatively free of human activity or impact, as compared with other sections along the same river within the urban area. Total

coliform bacteria, faecal bacteria and enterococci counts were reported at 10^3 CFU/100 mL levels. If the Magdalena River were to be taken as a negative control, bacterial contamination in the Xochimilco system would be determined as mainly exogenous with incidence levels at three or more orders of magnitude than another water system in the same geographical area.

The official rainfall registers (CNA, 2001; 2002) showed peculiarities for the warm-rainy seasons in 2001 and 2002. Although the rainy season is well defined, the overall yearly distribution varies and such variation may account for the changing indices of viral and bacterial counts. In 2001, the annual precipitation was 824 mm, of which 70% fell in the warm-rainy months. However, in 2002, annual precipitation was 774 mm but 90% of it fell in the same warm-rainy months. These differences can be seen in figures 1 and 3, as can the presence of viruses and bacteria for each year, which show a higher incidence in 2001 than 2002.

Studies of diarrheal disease caused by rotavirus and astrovirus in young children from Southern Mexico City (Villa et al., 1999; Walter et al., 2001) showed higher rates in the autumn and winter months (Villa et al., 1999). This increased incidence reflects the findings of the current study in which viral presence is higher in the cold-dry season.

Mexico is considered to be an important country with respect to wastewater recycling with more than 180,000 ha irrigated exclusively with non-treated wastewater, and almost 70,000 ha with treated wastewater (Jiménez, 2006). This practice does not appear to be on the wane and it is envisaged that more land will make use of wastewater as a source for irrigation in the future. Mexican regulations (DOF, 1997; 1998; 2004) and World Health Organization guidelines for

irrigation (WHO, 1989) consider ≤ 1000 CFU/100 mL coliform bacteria as an acceptable limit for the irrigation of land that is used to grow vegetables. However, according to the results discussed here, this limit has been exceeded in Southern Mexico City. The enteric virus and bacterial survival on vegetable surfaces has been studied (Rzezutka and Cook, 2004), and it has been determined that surface contamination can remain infectious for days or even weeks, a fact that constitutes a serious health risk for agricultural workers, as well as for consumers (Koopmans et al., 2003).

Water source

RV, EV and AST were not detected in the water source during the seasons and years studied. Nevertheless, the importance of this area as a drinking water source for Southern Mexico City makes it vital to monitor the viral presence regularly.

Indicator bacteria were detected in the 10 wells studied and although there were positive samples in 2001 and 2002, there did not appear to be any seasonal trend. The higher FE frequency suggests that these could be better bacterial contamination indicators as compared with TC and FC levels in this region. The MCMA wells are located in the so-called transition area, where sedimentary soil composition is known to favour water infiltration. This can affect groundwater quality because the sewage system is insufficient for the growing population of these areas, and does not exist at all in squatters settlements. Therefore, an event such as sewer breakage, which is frequent, could explain the presence of indicator bacteria in the drinking water sources, as well as being important for viral contamination that has severe public health implications. Groundwater as a source

for drinking water presents more stable conditions as compared with surface water; non-solar irradiation and relatively low temperatures are favourable for enteric viral presence and infectivity (Espinosa et al., 2008). In these circumstances, preventive actions should be taken.

Also, the results for enteric viral presence in water used for irrigation suggest an apparent seasonal pattern, with higher incidence during autumn and winter compared with the summer months. This concurs with epidemiological data, at least for rotavirus. Nevertheless, it is relevant to consider that the number of samples was low and they do not offer a concrete conclusion about a strong seasonal enteric viral pattern in water used for irrigation.

Finally, although indicator bacteria are always present in water used for irrigation and as a source for drinking water, it is necessary to assess the bacterial contribution from different animal and human origins, and apply specific methods for the existing tropical conditions, to offer some kind of framework for similar locations worldwide.

Conclusions

1. Viral genome presence in irrigation water, for the specific tropical highland system studied, is similar to that previously reported for temperate zones, during colder months mainly.
2. The climatic conditions and altitude prevailing in the study site favour the permanence of enteric viruses in irrigation water, nevertheless, the area is located at tropical latitude, for which conditions are different to those

reported in other studies in tropical areas, which tend to show no significant seasonal difference.

3. The abundance of indicator bacteria in irrigation water shows the continuous raw residual water supply to the aquatic system. Abundance did not show a seasonal trend.
4. The detection of indicator bacteria in the water source for drinking water shows the contribution of faecal matter to the aquifer and reinforces the need for an adequate disinfection process in order to ensure good water quality in the public supply system.

Acknowledgments

A.C. Espinosa was a recipient of a graduate student fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México). The authors would like to acknowledge the support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) in enabling them to carry out project 32505-T from 1999–2001, and the Dirección de Asuntos del Personal Académico of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for financial support with grant IN-219303 from 2003–2005. We also wish to thank P. Islas, P. Cisneros, and J. Aguilar for their invaluable help in the field and laboratory work.

References

1. Abad FX, Pintó RM, Villena C, Bosch A. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:3119-3122.
2. Aguilar A, Espinosa AC, Caraballo C. El manejo del agua. Tema central en Xochimilco. In: Caraballo C, editor. *Xochimilco, Un proceso de gestión participativa*. UNESCO, México, 2006, pp. 183-198.
3. Armillas P. Gardens on swamps. *Science* 1971; 174:653-661.
4. APHA. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. APHA, AWWA, Washington, D.C. 20th edition, 1998.
5. Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment lack correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol* 2001; 152:743-751.
6. Barcina I, Arana I, Iriberry J, Egea L. Factors affecting the survival of *E. coli* in a river. *Hydrobiol* 1986; 141:249-253.
7. Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:1172-1180.
8. Burlingame GA, McElhany J, Bennett M, Pipes WO. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47:56-60.
9. Calva JJ. Las enfermedades diarreicas en niños mexicanos. *Asoc Mex Infectol Microbiol Clin* 1998; 1998:12-17.
10. Canabal-Cristiani B, Torres-Lima PA, Burela-Rueda G. Xochimilco, espacio productivo y social. In: Rojas-Rabiela T (ed) *Presente, Pasado y Futuro de las Chinampas*. CIESAS. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco, A.C., México DF, 1995, pp. 181-200.

11. Chao KK, Chao CC, Chao WL. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36:288-293.
12. CNA. <http://smn.cna.gob.mx/> 2001. May 2008.
13. CNA. <http://smn.cna.gob.mx/> 2002. May 2008.
14. Crawley MJ. *Statistics. An introduction using R.* John Wiley, New York 2005,
15. Crawley MJ. *Glim for ecologists.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993,
16. Crossley PL. Sub-irrigation in wetland agriculture. *Agric Human Values* 2004; 21:191-205.
17. Davies-Colley RJ, Craggs RJ, Park J, Sukias JPS, Nagels JW, Stott R. Virus removal in a pilot-scale “advanced” pond system as indicated by somatic and F-RNA bacteriophage. *Water Sci Technol* 2005; 51:107-110.
18. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México, D. F., 6 de enero, 1997.
19. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, NOM-003-SEMARNAT-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. México, D. F., 21 de septiembre, 1998.
20. Diario Oficial de la Federación. Ley Federal de Derechos. Disposiciones aplicables en materia de aguas nacionales 2005. Capítulo VIII. Agua. México, D. F., 1 de diciembre, 2004, pp. 186-189.
21. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, NMX-AA-102-SCFI-2006. Calidad de Agua - Detección Enumeración de Organismos Coliformes, Organismos Coliformes Termotolerantes y Escherichia coli Presuntiva- Método de Filtración en Membrana. México, D. F., 21 de agosto, 2006.

22. Espinosa AC, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Mazari-Hiriart M, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in drinking and irrigation water. *Water Res* 2008; 42:2618-2628.
23. Foley B, O'Mahony J, Morgan SM, Hill C, Morgan JG. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J Clin Virol* 2000; 17:109-117.
24. García E. Los climas del Valle de México. Colegio de Posgraduados. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo. México. Serie sobretiros 1968; 6:1-34.
25. Gofiti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Demanse D, Genoulaz O, Seigneurin JM, Zmirou D. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *J Clin Virol* 2003; 27:74-82.
26. Guerrero L, Calva JJ, Morrow AL, Velásquez R, Tuz-Dzib F, López-Vidal Y, Ortega H, Arroyo H, Cleary TG, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Asymptomatic *Shigella* infections in a cohort of Mexican children younger than two years of age. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:597-602.
27. Hijnen WAM, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* 2006; 40:3-22.
28. Hurst CJ, Benton WH, McClellan KA. Thermal and water sources effects upon the stability of enterovirus in surface freshwaters. *Can J Microbiol* 1989; 35:474-480.
29. Jiménez P, Más P, Sarmiento L, Bello M, Palomera RE, Barrios J. Aportes al conocimiento acerca de la permanencia y circulación del poliovirus vacunal en el ambiente. *Rev Cubana Med Trop* 2001; 53:118-121.
30. Jiménez B. Irrigation in developing countries using wastewater. *Int Rev Environ Strat* 2006; 6:229-250.
31. Koopmans M, Vennema H, Heersma H, van Strien E, van Duynhoven Y, Brown D, Reacher M, Lopman B, European Consortium on Foodborne Viruses. Early identification

of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1136-1142.

32. LeBaron CW, Lew J, Glass GI, Weber JM, Ruiz-Palacios G, the Rotavirus Study Group. Annual Rotavirus Epidemic Patterns in North America. *JAMA* 1990; 264:983-988.

33. LeGuyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:3665-3671.

34. López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, Ponce de León A, Ramos A, Svennerholm AM, Ruiz-Palacios G. Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*: are they risk factors for acute diarrhea in the community? *J Infect Dis* 1990; 162:442-447.

35. Luther K, Fujioka R. Usefulness of monitoring tropical streams for male-specific RNA coliphages. *J Water Health* 2004; 2:171-181.

36. Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996, pp. 811-824.

37. Mazari-Hiriart M, Ponce-de-León S, López-Vidal Y, Islas-Macías P, Amieva-Fernández RI, Quiñones-Falconi F. Microbiological Implications of Periurban Agriculture and Water Reuse in Mexico City. *PLoS ONE* 2008; 3:e2305 doi:10.1371/journal.pone.0002305.

38. Medema GJ, Payment P, Dufour A, Robertson W, Waite M, Hunter P, Kirby R, Andersson Y. Safe drinking water: an ongoing challenge. In: OCDE, WHO, editors. *Assessing microbial safety of drinking water. Improving approaches and methods*. IWA Publishing, Cornwall, 2003, pp. 12-47.

39. Meléndez A. Avifauna de Xochimilco. In: *Diagnóstico Integrado. Proyecto para la identificación participativa de un Plan de Rehabilitación integral del Patrimonio Cultural de Xochimilco*. UNESCO Ref. 912/ MEX / 3001. 2005, pp. 30-33.

40. Méndez E, Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. Lipincott Willimas and Wilkins, Philadelphia, 2007, pp. 981-1000.
41. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:797-801.
42. Parashar UD, Gibson ChJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:304-306.
43. Pavlov DN, Van Zyl WB, van Heerden J, Grabow WOK, Ehlers MM. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Res* 2005; 39:3309-3319.
44. Raphael RA, Sattar SA, Springthope VS. Long-term survival human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol* 1985; 31:124-128.
45. Rivera SC, Hazen TC, Toranzos GA. Isolation of fecal coliform from pristine sites in a tropical rain forest. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:513-517.
46. Rzedowski J. Clima. In: Rzedowski J. and Calderón de Rzedowski G. (eds.) *Flora fanerogámica del Valle de México*, Vol.1. Compañía Editorial Continental. México, 1979, pp. 27-36.
47. Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:441-453.
48. Skrabber S, Gassiolloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res* 2004; 38:2927-2933.
49. Toranzos GA, McFeters GA, Borrego JJ, Savill M. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking water. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL,

Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD, editors. Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington D. C. 2007, pp. 249-264.

50. Villa S, Guiscafré H, Martínez H, Muñoz O, Gutiérrez G. Mortalidad estacional por diarrea entre niños mexicanos. Bull World Health Organ 1999; 77:375-380.

51. Walter JE, Michell DK, Guerrero ML, Berke T, Matson DO, Monroe SS, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus Diarrhea among Children from a Periurban Community of Mexico City. J Infect Dis 2001; 183:681-686.

52. Ward RL, Knowlton DR, Winston PE. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. Appl Environ Microbiol 1986; 52:450-459.

53. World Health Organization. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. WHO Technical Report Series 778. WHO Press, Geneva, Switzerland, 1989, 74 p.

54. Yoshida H, Horie H, Matsuura K, Kitamura T, Hashizume S, Miyamura T. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. J Gen Virol 2002; 83:1107-1111.

CAPITULO 4

Infectividad y persistencia del genoma de rotavirus y astrovirus en agua subterránea y superficial

Publicación en revista internacional arbitrada:

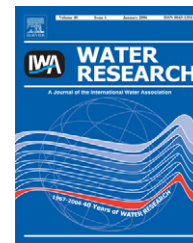
Espinosa A C, M Mazari Hiriart, R Espinosa, L Maruri Avidal, E Méndez, C F Arias. 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42(10-11): 2618-2628.

CAPITULO 4

Infectividad y persistencia del genoma de rotavirus y astrovirus en agua subterránea y superficial

Publicación en revista internacional arbitrada:

Espinosa A C, M Mazari Hiriart, R Espinosa, L Maruri Avidal, E Méndez, C F Arias. 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42(10-11): 2618-2628.

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water

Ana Cecilia Espinosa^{a,1}, Marisa Mazari-Hiriart^{a,*}, Rafaela Espinosa^{b,2},
Liliana Maruri-Avidal^{b,2}, Ernesto Méndez^{b,2}, Carlos F. Arias^{b,2}

^aInstituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tercer Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico DF

^bInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico DF

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2007

Received in revised form

7 January 2008

Accepted 11 January 2008

Available online 29 January 2008

Keywords:

Rotavirus

Astrovirus

Genome

Surface water

Groundwater

Infectivity

ABSTRACT

In this work, we have characterized the survival of Rhesus rotavirus (RRV) and human astrovirus Yuc8 in clean groundwater and contaminated surface water, as well as in phosphate-buffered solutions maintained in the same conditions as the environmental waters, and have compared the dynamics of virus inactivation with the persistence of the viral genomes, as determined by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, we also studied the tolerance of these viruses to chlorine disinfection. The reduction of infectivity of astrovirus was higher than for rotavirus, and also higher for both viruses in surface water as compared to groundwater. The enterobacterial content of the water as well as extrinsic factors, such as temperature and light, correlated with the stability of virus infectivity, and with the persistence of the virus genetic material, suggesting that molecular techniques to detect and quantify viral genomes would be suitable for the detection of viruses in water. The virus infectivity persisted in both types of water as well as in chlorine for times longer than previously reported. No decrease of infectivity was observed after 15 days of incubation in either type of water and the viruses remained infectious for months in groundwater. After 120 min in groundwater containing 2 mg/L of free chlorine, the infectivity of rotavirus and astrovirus was reduced by 0.78 and 1.3 logs, respectively. The longer persistence of viruses in this study could result from a combination of factors, including aggregation of the virus.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The occurrence of enteric viruses in environment, in water, soil, and food, is well documented (Koopmans et al., 2002; Metcalf et al., 1995; Yates et al., 1985), and they have been

associated with waterborne gastroenteritis of nonbacterial origin by consumption of fecal-contaminated water (Divizia et al., 2004; Boccia et al., 2002; Villena et al., 2003). Several viral pathogens have been involved in these outbreaks, including rotaviruses, which are the single most important cause of

*Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 8998; fax: +52 55 5616 1976/+52 55 5622 8995.

E-mail addresses: acespino@ecologia.unam.mx (A.C. Espinosa), mazari@servidor.unam.mx (M. Mazari-Hiriart), espinosa@ibt.unam.mx (R. Espinosa), maruri@ibt.unam.mx (L. Maruri-Avidal), ernesto@ibt.unam.mx (E. Méndez), arias@ibt.unam.mx (C.F. Arias).

¹ Tel.: +52 55 5622 8998; fax: +52 55 5616 1976.

² Tel.: +52 777 329 1615; fax: +52 777 317 2388.

severe diarrheal illness in infants and young children in both developed and developing countries, accounting for about 50% of these episodes, and causing a worldwide mortality of about 600,000 children per year (Parashar et al., 2006). Also, human astroviruses (HAsTVs), which have been shown in several epidemiologic outpatient studies to be an important cause of viral gastroenteritis in infants and young children, second only to rotavirus, and far more frequent than adenovirus (Cruz et al., 1992; Herrmann et al., 1991); they have been associated with outbreaks in day-care centers for children (Mitchell et al., 1999) and adults (Marshall et al., 2007), and have been reported to affect otherwise healthy persons exposed to astrovirus-contaminated food or water (Oishi et al., 1994; Utagawa et al., 1994). The incidence of astrovirus infections has been estimated between 5% and 10% in children with gastroenteritis (Méndez and Arias, 2007). Caliciviruses are also important intestinal pathogens that cause severe infections, mostly related with epidemic gastroenteritis that involve patients of all ages, and they have been reported to be responsible for 5–66% of the outbreaks in particular regions (Green, 2007).

Use of coliform bacteria as indicator of the presence of enteric viruses in water has demonstrated to be inadequate, due to the higher resistance of viruses to environmental conditions (Skraber et al., 2004). This has posed the challenge of finding a suitable indicator of viral contamination, and several options have been considered. One has been the direct identification of viruses in cultured cells; nevertheless, this method is limited to viruses that are not fastidious to grow in cell culture, is labor-intensive, and requires at least 1 week to know the results (Hot et al., 2003). Another option is the use of bacteriophages excreted in human feces, such as somatic coliphages, F-RNA-specific phages, and phages that infect *Bacteroides fragilis*, which in water exhibit similar tolerance to enteric viruses (Gantzer et al., 1998). A third alternative has been to detect the viral genome by molecular methods, which offers the advantages of sensitivity, specificity, and speed, although this method does not discriminate between infectious and noninfectious virus particles (Gregory et al., 2006).

Worldwide, water destined for human consumption and irrigation is a scarce commodity, and it is a fact that in many countries recycling of this precious resource is currently a viable water supply strategy (Blumenthal et al., 2000). At present, wastewater, once treated, represents a potential water source; therefore, it is important to ensure its adequate quality for different human uses. On a global scale, the world population's major drinking water source is groundwater (Howard and Gelo, 2003); thus, its quality assessment should be determined routinely to ensure it is acceptable. One major public health concern regarding first-use water and wastewater reuse lies in the potential risk for occurrence of waterborne diseases as a result of partial or inefficient water treatment (Asano and Cotruvo, 2004), since water represents an important vehicle for the spreading of pathogenic or potentially pathogenic agents (Baggi et al., 2001), among which the enteric viruses pose a special interest due to tolerance to environmental conditions and current disinfection processes (Payment, 1999), like chlorine addition to water, which is the most common and economically viable method for the inactivation of pathogenic agents.

To better understand the possible link between the aquatic environment as a reservoir for viruses and its potential for disease transmission, additional studies are needed to determine the stability of infectious virus particles in water, and their tolerance to conventional disinfection treatments. The aim of this study was to determine the stability of the infectivity of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water, and compare it with the presence of genomic material as an alternative indicator of viral contamination. We also tested the effectiveness of free chlorine to inactivate the viruses at concentrations reported to be used in the drinking water distribution system.

2. Materials and methods

2.1. Water samples

Groundwater and surface water samples from southern Mexico City were used in this work. Groundwater for human supply was obtained from a well system at a depth of 100–300 m, located in the Xochimilco area. Surface water was obtained from a canal system, also in the Xochimilco area, that receives raw wastewater, treated wastewater, and rainfall. In both cases water was collected in autoclaved 1 L polypropylene bottles. Groundwater was collected from five different extraction wells prior to chlorine disinfection, while surface water was collected from five different locations of the canal system. Physicochemical parameters measured *in situ* comprised pH, temperature, dissolved oxygen, electrical conductivity, as well as total coliforms, fecal coliforms and fecal enterococci (APHA, 2005). The physicochemical and microbiological characteristics of the water used in the experiments described are presented in Table 1.

Table 1 – Physicochemical and bacteriological characteristics of groundwater and surface water used for the survival of infectivity and genome persistence experiments

Parameter	Water type	
	Groundwater	Surface water
pH	7.83	7.93
Temperature (°C)	16.12	19.64
Dissolved oxygen (mg/L)	3.72	2.54
Electrical conductivity (µS/cm)	459	470
Total coliforms (CFU/100 mL)	0	12,130
Fecal coliforms (CFU/100 mL)	0	8150
Fecal enterococci (CFU/100 mL)	42	10,360

The measurements were taken prior to rotavirus and astrovirus inoculation.
CFU, colony forming units.

2.2. Cells and viruses

MA104 (rhesus monkey epithelial cells) and Caco-2 (human carcinoma colon cells) were originally obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured in a CO₂ atmosphere at 37 °C, in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with either 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL) for MA104 cells, or with glutamine and 15% fetal bovine serum for Caco-2 cells. Rhesus rotavirus (RRV) was obtained from H.B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA), and propagated in MA104 cells as previously described (Pando et al., 2002). The serotype 8 HAstV strain Yuc8 was propagated in Caco-2 cells as reported (Méndez et al., 2002).

2.3. Virus survival in groundwater and surface water samples

Groundwater and surface water, as well as the control PBS were inoculated with the virus at a final concentration of 5.5×10^6 focus forming units FFU/mL for RRV, and 1.8×10^6 FFU/mL for HAstV. Then, 3-mL aliquots of virus-spiked groundwater, surface water, or PBS, were transferred to 5 mL polypropylene vials. The vials containing groundwater were placed in the dark at 15 °C, while the surface water samples were left at room temperature with a 12h indirect natural light/12h darkness photoperiod; the PBS controls were incubated in the same conditions as groundwater and surface water. Each month, three vials from each water type and their PBS controls were collected. One aliquot from each vial was used to immediately determine the titer of infectious virus (see below), while a second aliquot of the same samples was stored at –70 °C until processed for detection of viral genetic material (see below).

2.4. Virus infectivity assay

The titer of infectious virus in the water samples was determined in confluent cell monolayers grown in 96-well microtiter plates, using serial, 2-fold dilutions of the samples in MEM. Before infection the cells were washed twice with serum-free MEM, and the samples containing either RRV or HAstV Yuc8 were then added to MA104 or Caco-2 cells, respectively, and the virus adsorbed for 1 h at 37 °C. After this time, the inoculum was removed, the plates were washed twice with PBS, and serum-free MEM was restored, followed by further incubation at 37 °C during 14 h for rotavirus, or 18 h for astrovirus. The infected cells were detected by an immunoperoxidase focus infectious assay as described (Guerrero et al., 2000). Briefly, the cells were fixed with 80% acetone in PBS for 30 min, and were subsequently washed twice with PBS, and incubated with rabbit polyclonal sera to either RRV (α -RRV) or to HAstV Yuc 8 (α -Yuc8) for 1 h at 37 °C. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h at 37 °C with peroxidase-labeled protein A (Amersham) diluted 3000-fold in PBS. The cells were washed with PBS, and the peroxidase substrate 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma) was added and incubated at 37 °C for 10 min. Finally, the plates were washed with tap water and dried. Focus forming units

(FFUs) were counted using a Visiolab 1000 station (Biocom, France) (Guerrero et al., 2000).

2.5. Virus genome stability

The genome stability of rotavirus RRV and HAstV Yuc8 in different water types was determined by assessing the presence of viral genome sequences by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR), as described below. At the end of the experimental protocol, the samples that had been kept at –70 °C were processed for extraction of viral RNA with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) as follows: 250 μ L aliquots from two independent tubes corresponding to each time point were mixed, and a fixed volume of a noninfected cell lysate of MA104 cells was added to each mixture as an internal control, and as a carrier for the extraction of RNA. Then, 300 μ L aliquots of the combined samples were mixed with an equal volume of PBS, and 300 μ L of the 1:2 solution were transferred to a different tube, and 500 μ L of Trizol were added, and the mixture vortexed extensively. Subsequently, 100 μ L of chloroform were added and vortexed again. After centrifugation at 12,000g for 5 min, the aqueous phase was transferred to another tube, and an equal volume of isopropanol was added. The tubes were maintained at 4 °C for 30 min, and then centrifuged for 15 min at 12,000g at 4 °C. The RNA collected in the pellet was washed with absolute ethanol and the pellets were dried at room temperature and resuspended in 10 μ L of RNase-free water and stored at –70 °C until use.

2.6. qRT-PCR

The level of viral genomic sequences was determined by one-step qRT-PCR, using an ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) and the following forward (5-GGACGCCGCACTAGATCAATT-3, nucleotides 1038–1058) and reverse (5-GGTCATCATGCTTTACTGGTTCC-3, nucleotides 1168–1146) primers for rotavirus (gene 1, GenBank J04346), and forward (5-GGATACTGAGGTTGCTGTCA-3, nucleotides 1794–1815) and reverse (5-TCAGTCGCTCGATTTCCTTT-3, nucleotides 1893–1872) primers for astrovirus (orf1a, GenBank J04346). Each reaction tube contained 60 ng of total RNA, 12.5 μ L of SYBR Green Master Mix (2 \times) (containing AmpliTaq Gold 5 U/ μ L; Applied Biosystems), 0.125 μ L of reverse transcriptase (50 U/ μ L) (Applied Biosystems), 0.5 μ L of RNase Inhibitor (20 U/ μ L) (Applied Biosystems), and 2 μ L of each primer (2.5 pmol/ μ L) in a total volume of 25 μ L. The reverse transcription step was carried out by incubation of the mixtures at 48 °C for 30 min, and the enzyme was subsequently inactivated at 95 °C for 10 min. Then, 40 PCR cycles were carried out at 95 °C for 15 s, followed by 1 min at 60 °C. The product specificity was assessed by a dissociation protocol carried out from 60 to 95 °C for 30 min. Each sample was assayed by qRT-PCR in triplicate.

2.7. Virus survival in chlorinated groundwater

All glassware employed was maintained overnight in a chlorine solution to satisfy the chlorine demand prior to preparation of the experimental samples. The concentrations

of chlorine tested were 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/L, prepared with chlorine demand-free water, using a stock solution (24 mg/L) of sodium hypochlorite. To reduce cellular debris in the RRV and HAstV cell lysates, these were previously centrifuged at 10,000g for 5 min at 4 °C. Fifteen milliliters of chlorine demand-free groundwater was adjusted with sodium hypochlorite to the chlorine concentrations mentioned above, and maintained in polypropylene tubes. The virus titers in the start samples ranged between 3.4 and 4.2 × 10⁵ FFU/mL for rotavirus, and between 4.5 and 6.1 × 10⁵ FFU/mL for astrovirus; experiments were carried out in duplicate. The viral survival titers, and the free chlorine concentrations in the various samples, were determined at 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, and 120 min post-virus inoculation. Chlorine concentrations were monitored by the *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine method using a DR 2400 spectrophotometer HACH (Loveland, CO). To determine the virus infectious titer, 1 mL from each sample was taken, and chlorine was neutralized with 8 μL of 3 g/L of sodium thiosulfate. Then, MA104 and Caco-2 cells were infected with the RRV- or Yuc8-containing water samples, respectively, and the infectious titer determined as described above. Throughout the experiment, the temperature and the pH were monitored for each sample using an HACH multimeter sension 156 (Loveland, CO). The mean temperature of groundwater was 21.5 °C for RRV and 23.2 °C for HAstV, with a nearly neutral pH mean values of 7.55 and 7.6 for rotavirus and astrovirus, respectively.

2.8. Statistical analysis

MANOVA for repeated measurements test was used to determine whether there were significant differences ($p < 0.05$) in virus titers and the presence of genomic virus material throughout the time span between water and viral type, as well as chlorine concentration. The JMP statistical software (version 3.2.1, SAS Institute) was utilized for data analysis. A correlation analysis was performed using Excel

version 10.0 (Microsoft) to compare infectivity and genome reductions.

3. Results

3.1. The virus infectivity persists longer in groundwater than in surface water

When the infectious titer of the simian rotavirus RRV was determined after incubation in two different types of water tested, it was apparent that it was less affected in groundwater as compared to surface water (Fig. 1). In groundwater the infectivity of the virus was only slightly reduced after 60 days of incubation, although it decreased by about 100-fold at 90 days, and was reduced by about 1000-fold at 150 days, remaining at the same level up to 7 months, the longest time studied (Fig. 1). In contrast, the infectivity of RRV in surface water was already reduced by about 40-fold by day 30, reduced by more than 1500-fold at day 150, and by about 10,000-fold at day 180 (Fig. 1). A 4-log decrease represents the limit of the assay used to detect infectious virus. The reduction of infectivity in both groundwater and surface water was affected not only by the conditions of incubation, but also by components present in both types of water, since the infectivity of the virus in the PBS controls was less reduced than in the corresponding experimental conditions.

The infectivity of astrovirus Yuc8 was also affected less in groundwater than in surface water (Fig. 2). For instance, in groundwater it was reduced by about 10-fold at day 30, as compared to the 10,000-fold reduction observed during the same period of time in surface water. In groundwater the residual infectivity of astrovirus stabilized at 60 days, with about a 2000-fold decrease that was maintained up to day 120. The inactivation of astrovirus infectivity was also accelerated by components present in the water, since at day 30 the residual infectivity in surface water was 1/10,000 of the original virus titer, while in the PBS control it was only

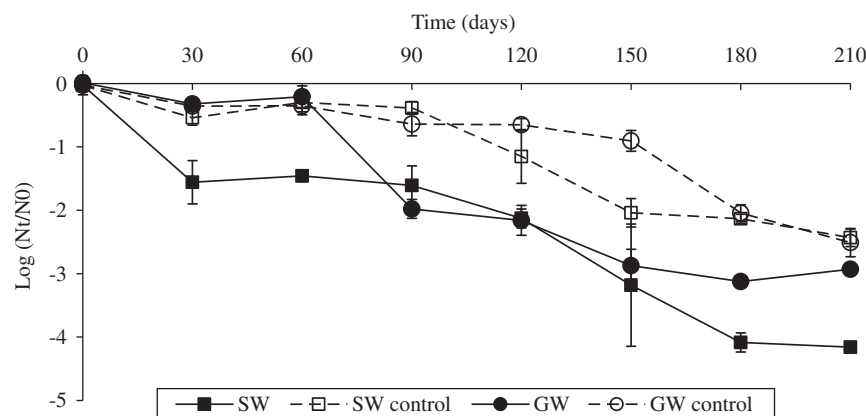


Fig. 1 – Reduction of infectivity of rotavirus RRV in groundwater (GW) and surface water (SW). The values represent the average of duplicates of two independent experiments ± standard deviation. The reduction of infectivity at time 0 was calculated considering N_0 as the original virus titer of the experimental sample (5.5×10^6 FFU/mL). N_t represents the infectious virus titer calculated at the different time points assayed. Virus titration was carried out in MA104 cells.

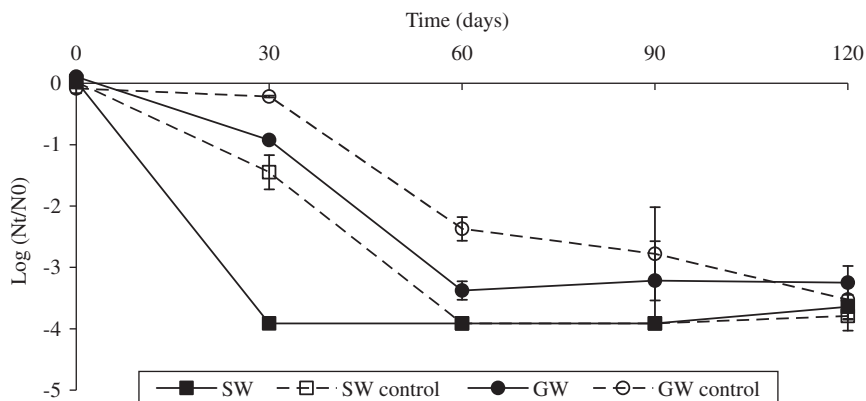


Fig. 2 – Reduction of infectivity of human astrovirus Yuc 8 in groundwater (GW) and surface water (SW). The values represent the average of duplicates of two independent experiments \pm standard deviation. The reduction of infectivity at time 0 was calculated considering N_0 as the original virus titer of the experimental sample (1.8×10^6 FFU/mL). N_t represents the infectious virus titer calculated at the different time points assayed. Virus titration was carried out in Caco-2 cells.

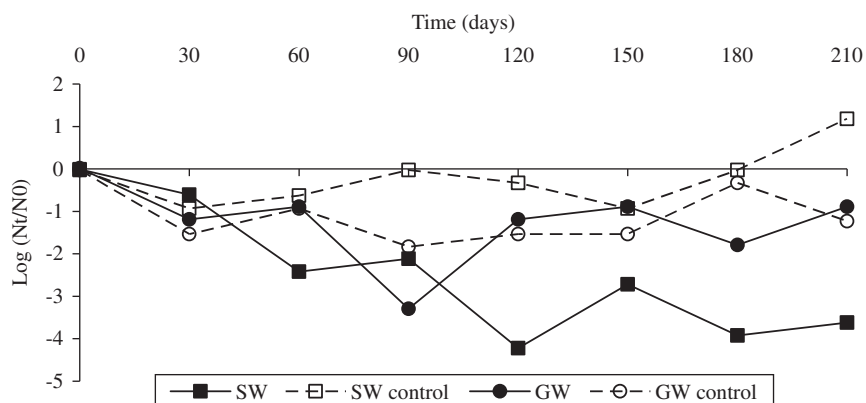


Fig. 3 – Persistence of the rotavirus RRV genome in groundwater (GW) and surface water (SW), determined by quantitative RT-PCR. N_0 and N_t correspond to the number of genomes detected at time 0 and at time t, as judged by amplification of a segment of rotavirus gene 1.

reduced by about 30-fold (Fig. 2). However, it is also clear that the incubation conditions significantly affected astrovirus infectivity, since at day 60 the residual infectivity was the same in both surface water and its corresponding PBS control, and the same occurred for groundwater at day 90. The reduction of virus infectivity was not significant during the first 15 days of incubation (data not shown). In general, the infectivity of rotavirus was more stable than that of astrovirus in both water types.

3.2. The physical integrity of the viral genomes was largely affected by incubation in surface water

Similar to what was observed for the infectivity of the viruses, the stability of the viral genomes (inferred from the detection by qRT-PCR of a fragment of rotavirus gene 1, or of astrovirus orf1a) was much larger in groundwater as compared to surface water (Figs. 3 and 4). Despite the variability of the qRT-PCR data obtained (see the discussion section), it is clear that detection of viral genomic material was reduced by about 7- and 4-fold for rotavirus and astrovirus, respectively, after 5 months of incubation in groundwater, levels of detection

similar to those found in the corresponding PBS controls. On the other hand, the tendency of degradation of the genomic material was larger in surface water than in its PBS control (Figs. 3 and 4). In this type of water, the rotavirus genomic RNA was better preserved than the astrovirus genetic material.

3.3. Correlation between the stability of virus infectivity and the detection of viral genomic material

A reasonably good correlation was found between virus infectivity and the presence of viral genomic material in surface water for both astrovirus and rotavirus. In the case of astrovirus the 4-log decrease in infectivity observed at day 30 was followed by an observed 4-log decrease in genome detection at the next time point assayed (day 60). For rotavirus the inactivation of infectivity was in general paralleled by a reduction in genome number, reaching a 4-log decrease in both parameters by day 180. In groundwater conditions, the physical stability of the virus genome was less affected than the virus infectivity both for RRV and Yuc8, since at the longest time point tested, the genome numbers were reduced about 100- and 400-fold less for rotavirus

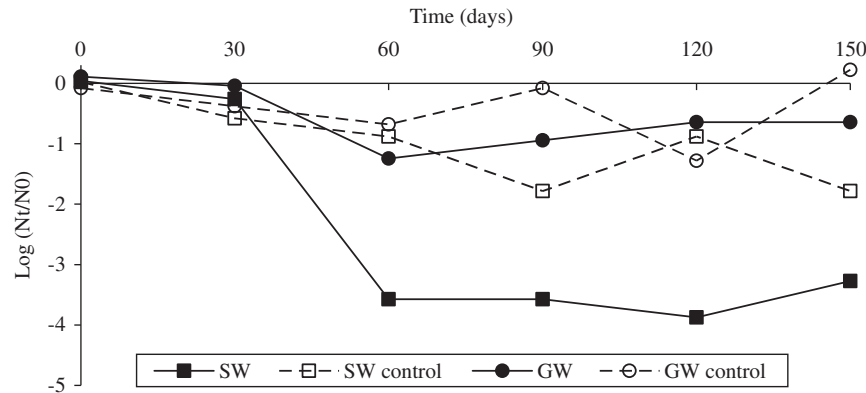


Fig. 4 – Persistence of the HAstV Yuc8 genome in groundwater (GW) and surface water (SW), determined by quantitative RT-PCR. N_0 and N_t correspond to the number of genomes detected at time 0 and at time t , as judged by amplification of a segment of the ORF1a coding region of the virus.

and astrovirus, respectively, than the corresponding virus infectivity. These results suggest that detection of viral genetic material can be an adequate indicator of virus contamination of surface water.

3.4. Virus survival in chlorinated groundwater

To evaluate the tolerance of rotavirus and astrovirus to conventional chlorine water disinfection treatments, we exposed these viruses to free chlorine concentrations commonly used in drinking water distribution systems. For this, groundwater was adjusted with sodium hypochlorite to the indicated residual free chlorine concentrations (Fig. 5), inoculated with either RRV or Yuc8 virus strains, and the virus titers determined at different times for up to 2 h of incubation. In the case of RRV, virus survival was similar in the four lower chlorine concentrations tested (0.1–1.5 mg/L), with a reduction of infectivity of 0.6 logs (4-fold reduction). About 2 mg/L of chlorine had a more evident, although still lower effect on virus infectivity, since it was reduced by 0.4 logs (2.5-fold reduction) after 20 min of incubation, and reached a maximum inactivation of 0.78 log units (6-fold reduction) after 2 h (Fig. 5A). For HAstV Yuc8 the decrease of infectivity was more marked, and directly related to chlorine concentration. At the end of the experimental time, its infectivity in 2 mg/L of chlorine was reduced by 1.3 logs (20-fold reduction) (Fig. 5B). The inactivation level for RRV as compared to that of HAstV showed significant differences ($p < 0.05$) at a chlorine concentration of 2 mg/L, while lower chlorine concentrations exerted a similar effect on viral inactivation.

4. Discussion

The potential risk for the human population to acquire viral infections associated to environmental contamination of different water sources is a relevant public health concern (Green, 2007; Méndez and Arias, 2007; Parashar et al., 2006; Koopmans et al., 2002; Cruz et al., 1992). The risk of transmission of viral diseases through contaminated water depends on the capacity of the viruses to survive for a

sufficient period of time to infect a susceptible host. In this regard, there is a need to study the factors involved in, and the manner in which these exert an effect on, the persistence of infectious virus in different types of environmental water.

In this work, we found that the infectivity of both rotavirus RRV and astrovirus Yuc8 was better preserved in environmental groundwater than in surface water. The most important difference between these two types of water (Table 1) was the presence of abundant enterobacteria in surface water, as compared to the almost enterobacteria-free conditions of groundwater. The inactivation of RRV and Yuc8 in surface water could be associated, at least partially, to the high bacterial content of this type of water, as has been reported previously (Pancorbo et al., 1987; Raphael et al., 1985; Ward et al., 1986). Raphael et al. (1985) reported a higher stability for a human rotavirus in filtered as compared to unfiltered raw water from the Ottawa River, being essentially unaltered after 64 days of incubation in the former, as compared to a 99% reduction in the titer of virus held for 10 days in the unfiltered water. In a different study, Pancorbo et al. (1987) reported that both rotavirus Wa and poliovirus remained infectious in nonpolluted waters significantly longer than in polluted waters. In a more detailed study, Ward et al. (1986) showed that the virucidal activity present in the water could not be separated from microorganisms; in particular, in the case of echovirus 12, they found that the inactivation of virus infectivity correlated with the cleavage of viral proteins by proteolytic bacterial enzymes, followed by the degradation of the capsid-associated viral RNA. In contrast to these studies, no clear distinction was found between survival of rotavirus SA11 in nonpolluted versus polluted freshwater (Hurst and Gerba, 1980).

In addition to the intrinsic biological and chemical differential characteristics of the waters tested, external physical factors associated to the experimental conditions, like temperature and light exposure should also be taken into account for the inactivation of viruses. Groundwater was maintained at 15 °C in the dark, while surface water samples were held at room temperature (the average daily temperature during the study was 24 °C, with a range of 16–30 °C) with a 12 h light/darkness cycle. A more pronounced and/or faster

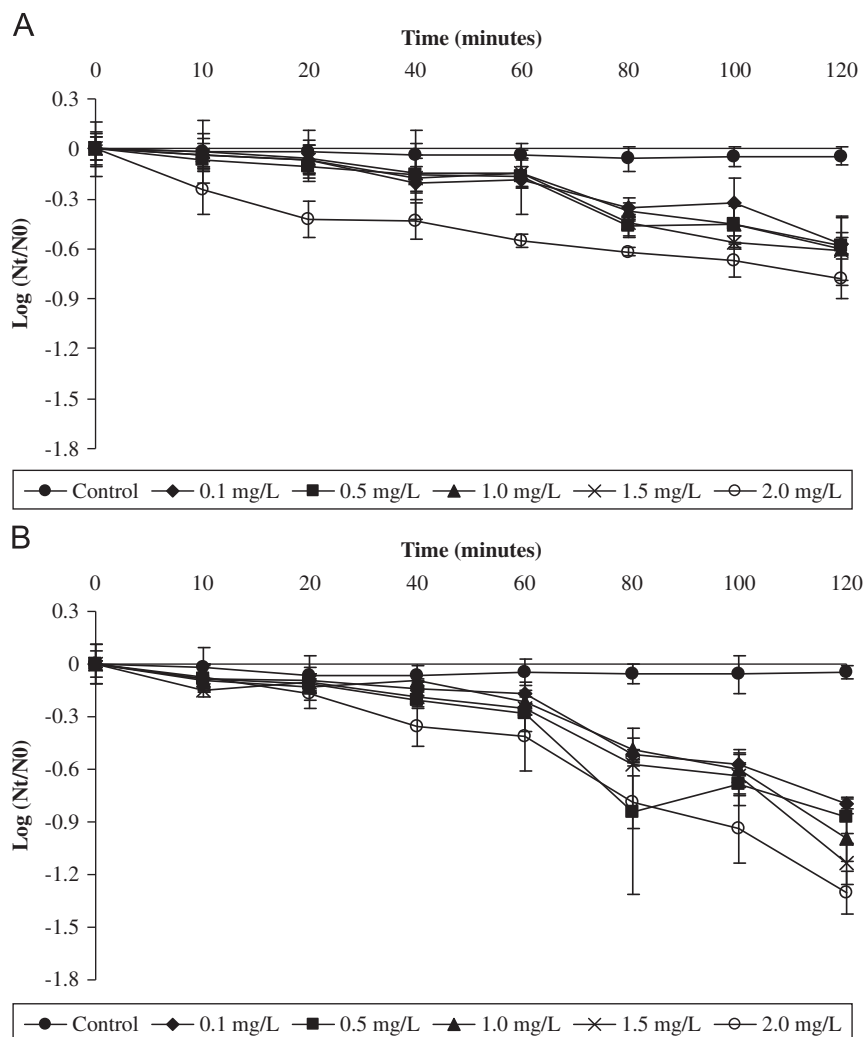


Fig. 5 – Reduction of infectivity of rotavirus RRV (A) and HAstV Yuc8 (B) in groundwater containing the indicated concentrations of free chlorine. The data represent the mean value \pm standard deviation of duplicate samples from two independent experiments. The reduction of infectivity at time 0 was calculated considering N_0 as the original virus titer of the experimental sample (5.5×10^6 FFU/mL). N_t represents the infectious virus titer calculated at the different time points assayed.

inactivation of virus infectivity in different types of water has been found to consistently correlate with higher temperatures (John and Rose, 2005), while the exposure to light is also known to affect the stability of infectious viruses and bacteria, with viruses having a double-stranded genome (like rotavirus) being more stable than those whose genome is single-stranded (like astrovirus) (Sinton et al., 2002; Fujioka and Yoneyama, 2002; Lytle and Sagripanti, 2005). The virus inactivation observed in the PBS controls supports the idea that external physical factors play a role in the decay of infectivity of both RRV and Yuc8, since this decay was larger in PBS incubated under surface water experimental conditions than in groundwater conditions. However, the intrinsic properties of the water (probably bacterial content, among other factors) contribute clearly to virus inactivation, since the decay of viral infectious titer was less thorough (for rotavirus) or delayed (for astrovirus) in the corresponding

PBS controls, as compared to groundwater and surface waters.

The inactivation of rotavirus RRV was significantly lower than that of astrovirus Yuc8 in the two types of water tested, as well as in their corresponding PBS controls, indicating that Yuc8 is more sensitive than RRV to both intrinsic and extrinsic factors. Most of the previous studies have reported higher reduction rates for both rotavirus and astrovirus than those found in the present work. Thus, the stability of SA11 in surface water was found to decrease 2 logs during incubation for 7 days at 27 °C, and 3 logs when incubated for 14 days at 16 °C (Ward et al., 1986). In the work, Ward et al. (1986) evaluated the stability of viruses belonging to four different enterovirus genera, and in agreement with our data, they found that rotavirus was more stable. In a different study, Pancorbo et al. (1987) described that incubation for 9 days in nonpolluted lake water, or polluted creek water, reduced

rotavirus infectivity 0.5 and 2 logs, respectively, and a high pH was found to correlate with the reduction in virus titer. Other studies have reported somewhat longer survival times in distilled water and wastewater under laboratory conditions in the absence of light; 7–13 days were required for 1-log decrease at 26 °C, and 80 days for 1-log reduction at 8 °C (McDaniels et al., 1983). Caballero et al. (2004) found that the infectivity of rotavirus Ito was reduced by less than 2 logs in filtered freshwater after 30 days of incubation at 20 °C. The findings of Raphael et al. (1985) are, however, similar to ours, since they reported that the infectivity of a human rotavirus strain in filtered raw water remained unaltered after 64 days of incubation at 20 °C. The stability of infectivity of a HAstV-4 strain in dechlorinated drinking water was reduced by 2 logs at 4 °C, and by 3 logs at 20 °C after a 60-day incubation period. The reported differences in the virus survival times may be due to several factors, including the type of water, the environmental external conditions of the experiment, the type of virus evaluated as well as the particular viral strain employed, the aggregation status of the virus, and the adsorption of the virus to particulate material or the walls of the container. Even the volume of the samples and the material of the containers used could influence the results and contribute to the variability of inactivation rates observed in the literature (Gassilloud and Gantzer, 2005; Langlet et al., 2007). Several of these factors may also affect the efficiency of recovery and quantification of infectious virus and genomic RNA for their detection by the methods used in this work.

The application of molecular techniques such as RT-PCR has favored the relatively rapid, sensitive, and specific detection of viral genome sequences. The evaluation of stability of the rotavirus and astrovirus genomes by qRT-PCR showed that they were more stable in groundwater as compared to surface water, as observed for the infectivity of the virus. In groundwater the detected level of virus genetic material at the end of the experiment was about 1 log lower than that of the original input, and these values were not significantly different from those found in the corresponding PBS controls. In contrast, in surface water the genome numbers for both viruses decayed by about 4 logs, although the kinetics was different depending on the virus; the maximum level of astrovirus genomic RNA degradation was reached after 60 days of virus inoculation, while it took 120 days for rotavirus RNA to decay to the same level. The longer persistence of the rotavirus genetic material, as compared to that of astrovirus, could be, at least in part, related to the nature of their genomes, since double-stranded RNA (as that of rotavirus) is known to be resistant to common and ubiquitous endonucleases that cut single-stranded RNA (as the astrovirus genome), although double-stranded RNA can be efficiently cleaved by the less abundant type III bacterial RNAses. In addition, the higher stability of rotavirus RNA could also be partially due to a larger resistance of the virus capsid to proteolytic degradation, since rotaviruses are large RNA viruses with a capsid composed of three layers of protein, while astrovirus protein capsid is single layered. For both viruses the decay of genomic material in surface water was clearly associated with components present in the water, most probably endonucleases, rather than with environmental factors.

The analysis by qRT-PCR of the samples showed variability at some of the various time points evaluated (Figs. 3 and 4). This might result from the many factors that are known to influence the amplification of RNA/DNA from environmental samples, among others, the adsorption of viruses to particulate material, the efficiency of RNA extraction from these sample types, and the presence of reverse transcriptase or DNA polymerase inhibitors. Despite the divergence observed for the data at some time points, and despite the fact that molecular methods, such as qRT-PCR, do not provide direct information about the presence of infectious virus, a good correlation was found between the virus infectious titer and the presence of viral genomic material in surface water for both astrovirus and rotavirus, supporting the use of this technique to evaluate the presence of viral sequences in environmental samples, and its use as an adequate indicator of virus contamination. However, further characterization of the factors that affect the reproducibility of the RT-PCR data obtained from environmental samples are required to apply this powerful method reliably and routinely in environmental studies.

Reports concerning virus inactivation levels by free chlorine are quite variable, making conclusions hard to draw. Several factors, such as aggregation of the virus, adsorption to particulate materials, and virus type and strain differences, in addition to temperature and pH, which have a direct influence on concentration and on active forms of chlorine in water, are critical to determine the virus resistance to the disinfection (Caballero et al., 2004; Thurston-Enriquez et al., 2003). In this work, we found a relatively high resistance to inactivation by free chlorine for both RRV and Yuc8, with RRV showing a slightly higher resistance. After 120 min of exposure to groundwater containing 2 mg/L of residual chlorine the infectious titer of RRV was reduced 6-fold, as compared to Yuc8, whose infectivity decreased 20-fold. The persistence of infectivity of both rotavirus and astrovirus under these conditions is higher than that reported in previous studies (Caballero et al., 2004; Abad et al., 1997). Thus, after incubation in drinking water containing 1 mg/L of free chlorine for 120 min, the infectious titer of a HAstV serotype 4 strain was reduced by 4 logs, while the infectious titer of human rotavirus Ito strain decreased by more than 4 logs after 10 min in 1 mg/L of residual chlorine (Caballero et al., 2004), and the infectivity of a subgroup II human rotavirus decreased by about 2 logs in tap water containing 0.05 mg/L of chlorine after 64 days of incubation. Also, Vaughn et al. (1986) found that single-particle suspensions of rotaviruses Wa and SA11 were rapidly inactivated (5-log titer reduction within 20 s in 0.3 mg/L of free chlorine), and Pancorbo et al. (1987) found a 2-log reduction in the infectivity of rotavirus Wa after 3 days of incubation in tapwater containing 0.6 mg/L of residual chlorine (pH 6.1, 20 °C). Finally, Berman and Hoff (1984) reported a 2-log inactivation of rotavirus SA11 within 4 min of exposure to 0.5 mg/L of chlorine at pH 6.0 and 5 °C. These researchers found that aggregation of the virus resulted in an increased resistance to chlorine inactivation. In our case, we did not determine the degree of aggregation of the virus, although it was probably significant, since we used as virus inoculum a lysate of rotavirus-infected cells, and it is known that in this type of lysate a high proportion of infectious

viruses are associated to cell debris. While a more precise determination of the inactivation of viruses in water could be achieved using single-virus particles preparations, it is important to consider that indigenous viruses in water are often aggregated (Pancorbo et al., 1987).

Chlorine is widely used as a water disinfectant in both developed and developing countries worldwide, and has been the disinfection strategy for microbiological contamination control for a long time. There is evidence, however, for greater resistance to inactivation of viral agents as compared to fecal coliforms (Payment, 1999). The low effectiveness of this approach to inactivate viruses is probably reflected in the modifications of the seasonal patterns of morbidity and mortality due to severe diarrhea, observed between 1990 and 2002 among Mexican children younger than 5 years of age (Villa et al., 1999). Starting in 1991 the Mexican Health authorities implemented a “clear water” program that included, among other actions, improvements in basic sanitation, with an improved water chlorination procedure having the highest impact on the morbidity and mortality of children caused by severe diarrhea (Villa et al., 1999). After this program started, severe diarrheal episodes as well as diarrheal deaths denoted a changing seasonal pattern. In 1990–1991, two waves of increased diarrhea activity were present, one in the spring–summer season, and the second in the fall–winter period, with the increase in spring–summer being much more pronounced than that in fall–winter season. From 1993 to 2002 the frequency of deaths attributed to diarrheal disease during the spring–summer season was substantially reduced, whereas the fall–winter increases in morbidity and mortality remained constant every year. Higher mortality rates for children younger than 1 year coincided precisely every year, with the fall–winter season (Velázquez et al., 2004). The morbidity and mortality during spring–summer are mostly associated with bacterial infections, which are those that could be controlled by chlorination of the water, while the morbidity and mortality during the fall–winter season was shown to correlate with rotavirus infections. Of note, it is also known that astrovirus infections are more frequent during the colder months of the year (Méndez and Arias, 2007). Although rotavirus infections are not necessarily associated with the consumption of contaminated water, the environmental transmission of rotavirus and astrovirus is well documented (Bosch et al., 1988; Gratacap-Cavallier et al., 2000; Le Guyader et al., 2000; Villena et al., 2003), and could contribute to the fall–winter diarrheal outbreaks.

The results of this study provide evidence for the long persistence of infectious rotavirus and astrovirus in groundwater. This is important because groundwater offers a stable environment in terms of temperature and light exposure, without an evident seasonal effect. Therefore, if groundwater systems are the main reserve for providing water for human consumption, and they become virus contaminated, the public health risk would be extremely important. These ideas should be taken into account at sites where groundwater fecal contamination has been detected. As reported by Mazari-Hiriart et al. (2005) for Mexico City, 84 bacterial species representing nine genera were associated to fecal contamination of water in a longitudinal study carried out in the water supply system, just to mention an example of the existing

potential risk. The risk in large urban centers that depend on groundwater sources should be of great concern. These include metropolitan areas such as Mexico City, where this investigation took place, as well as Lagos, Calcutta, Shanghai, Buenos Aires, Dhaka, Jakarta, Manila, Beijing, Cairo, Paris, Tianjin, and London (Howard and Gelo, 2003). Thus, protection of water sources from viral contamination, adequate disinfection procedures, specific viral indicators, and microbiological water quality monitoring are extremely important issues.

Finally, our results also contribute with elements that support the idea that enteric-virus-contaminated surface water, if utilized for irrigation, represents a potential risk for the population, due to the time these viruses can remain active under such conditions. On the other hand, it is a fact that water reuse worldwide is increasing, and one major issue comprises re-injection of treated water into aquifers (Asano and Cotruvo, 2004). This activity could provoke serious problems to the population; if water is not adequately treated and the aquifer becomes contaminated, this could represent massive, irreversible, and widely spread microbial contamination, including bacteria, virus, and probably protozoa. Additionally, it is necessary to continue studying the behavior of enteric viruses and other microorganisms in the environment, particularly in water, because the latter comprises a rapid pathogen distribution route to the population. In addition, it is necessary to increase the efficiency of the distribution systems of water intended for human consumption, as well as to improve treatment processes for the reuse of water that would be injected into groundwater systems or reused for irrigation, as well as for other uses.

5. Conclusions

- The infectivity of both rotavirus RRV and astrovirus Yuc8 is more affected in contaminated surface water as compared to nonpolluted groundwater ($p < 0.05$), while the infectivity of rotavirus is more stable than that of astrovirus in both types of water and their PBS controls ($p < 0.05$). Both intrinsic (chemical and biological) as well as extrinsic (temperature, light) factors appear to be involved in the stability of virus infectivity in the environmental waters.
- The virus genetic material is less stable in surface water than in groundwater, mainly due to components of the water, although in the case of astrovirus environmental factors also seem to play an important role. These differences are probably the result of the double-stranded and single-stranded nature of the RNA genomes of rotavirus and astrovirus, respectively, and could also be related to the differential complexity of their capsids.
- The correlation observed between reduction of infectivity and persistence of viral genomes in surface water supports the use of molecular techniques as indicators of viral contamination of environmental waters; nonetheless, it is necessary to further investigate the relationship between infectivity and persistence of virus genetic material, to study the factors that affect both parameters, to be able to use the presence of viral genomes more reliably as an indicator of infectious virus.

- Although qRT-PCR is a powerful method to detect viral genomic sequences in a variety of samples, there are a number of factors that may influence the reproducibility of the amplification of RNA/DNA from environmental water, including the adsorption of viruses to particulate material, the efficiency of RNA extraction from these type of samples, and the presence of reverse transcriptase or DNA polymerase inhibitors. Further characterization of these factors is still required, in order to use this method reliably and routinely in environmental studies.
- The infectivity of rotavirus RRV and HAsV Yuc8 is tolerant to residual chlorine concentrations higher than those recommended by WHO and the Mexican regulations for water used for human consumption. This observation, together with the fact that infectious rotavirus and astrovirus are able to persist for months in groundwater, indicates that protection of water sources from viral contamination, adequate disinfection procedures, specific viral indicators, and microbiological water quality monitoring are important issues to consider.
- Risk assessment studies are required for understanding the real dimension of the threat that viral contamination of environmental waters represents for public health.

Acknowledgments

A.C. Espinosa was a recipient of a graduate student scholarship from the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico). We thank I. Méndez and I. González for their help with the statistical analysis. This work was partially supported by Grants 32505-T from CONACYT-Mexico, and IN 219303 from DGAPA/UNAM to M. Mazari-Hiriart.

REFERENCES

- Abad, F.X., Pinto, R.M., Villena, C., Bosch, A., 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3119–3122.
- American Public Health Association, 2005. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 21st edition. APHA, AWWA and WEF, Washington DC.
- Asano, T., Cotruvo, J.A., 2004. Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater health and regulatory considerations. *Water Res.* 38 (8), 1941–1951.
- Baggi, F., Demarta, A., Peduzzi, R., 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res. Microbiol.* 152 (8), 743–751.
- Berman, D., Hoff, J.C., 1984. Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (2), 317–323.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruíz-Palacios, G., Stott, R., 2000. Guidelines for microbial quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bull. World Health Organ.* 78 (9), 1104–1116.
- Boccia, D., Tozzi, A.E., Cotter, B., Rizzo, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M.L., Ruggeri, F.M., 2002. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (6), 563–568.
- Bosch, A., Pinto, R.M., Blanch, A.R., Jofre, J.T., 1988. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Water Res.* 22 (3), 343–348.
- Caballero, S., Abad, F.X., Loisy, F., Le Guyader, F.S., Cohen, J., Pintó, R.M., Bosch, A., 2004. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (7), 3904–3909.
- Cruz, J.R., Bartlett, A.V., Herrmann, J.E., Caceres, P., Blacklow, N.R., Cano, F., 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1140–1144.
- Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Sánchez, G., Villena, C., Pintó, R.M., Palombi, L., Buonomo, E., Cenko, F., Leno, L., Bebeci, D., Bino, S., 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci. Technol.* 50 (1), 57–61.
- Fujioka, R., Yoneyama, B.S., 2002. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Sci. Technol.* 46 (11–12), 291–295.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M., Schwartzbrod, L., 1998. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4307–4312.
- Gassilloud, B., Gantzer, C., 2005. Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2), 912–920.
- Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Brengel-Pesce, K., Soule, H., Innocenti-Francillard, P., Bost, M., Gofti, L., Zmirou, D., Seigneurin, J.M., 2000. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6), 2690–2692.
- Green, K.Y., 2007. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia PA, pp. 949–980.
- Gregory, J.B., Litaker, R.W., Noble, R.T., 2006. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6), 3960–3967.
- Guerrero, C.A., Zarate, S., Corkidi, G., Lopez, S., Arias, C.F., 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74 (20), 9271–9362.
- Herrmann, J.E., Taylor, D.N., Echeverria, P., Blacklow, N.R., 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* 324, 1757–1760.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., Andréoletti, L., 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* 37 (19), 4703–4710.
- Howard, K.W.F., Gelo, K.K., 2003. Intensive use in urban areas: the case of the megacities. In: Llamas, R., Custodio, E. (Eds.), *Intensive Use of Groundwater. Challenges and Opportunities*. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 35–58.
- Hurst, C.J., Gerba, C.P., 1980. Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1–5.
- John, D.E., Rose, J.B., 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 39 (19), 7345–7356.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (2), 187–205.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 103 (5), 1632–1638.

- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M., 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8), 3241–3248.
- Lytle, C.D., Sagripanti, J.L., 2005. Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *J. Virol.* 79 (22), 14244–14252.
- Marshall, J.A., Bruggink, L.D., Sturge, K., Subasinghe, N., Tan, A., Hogg, G.G., 2007. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 67–71.
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Ponce-de-León, S., Calva, J.J., Rojo-Callejas, F., Castillo-Rojas, G., 2005. Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico City metropolitan area water supply system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9), 5129–5137.
- McDaniels, A.E., Cochran, K.W., Gannon, J.J., Williams, G.W., 1983. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. *Water Res.* 17 (10), 1349–1353.
- Méndez, E., Arias, C.F., 2007. Astroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lipincott Willimas and Wilkins, Philadelphia PA, pp. 981–1000.
- Méndez, E., Fernández-Luna, T., López, S., Méndez-Toss, M., Arias, C.F., 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76 (16), 7996–8002.
- Metcalf, T.G., Melnick, J.L., Estes, M.K., 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 461–487.
- Mitchell, D.K., Matson, D.O., Jiang, X., Berke, T., Monroe, S.S., Carter, M.J., Willcocks, M.M., Pickering, L.K., 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J. Infect. Dis.* 180, 514–517.
- Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., Inouye, S., Grohmann, G.S., Monroe, S.S., Stine, S.E., 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* 170 (2), 439–443.
- Pancorbo, O.C., Evanshen, B.G., Campbell, W.F., Lambert, S., Curtis, S.K., Woolley, T.W., 1987. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (8), 1803–1811.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., López, S., 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295 (1), 190–200.
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresse, J.S., Glass, R.I., 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2), 304–306.
- Payment, P., 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Can. J. Microbiol.* 45 (8), 709–715.
- Raphael, R.A., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., 1985. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can. J. Microbiol.* 31 (2), 124–128.
- Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A., Davies-Colley, R.J., 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3), 1122–1131.
- Skraber, S., Gassiolloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2004. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res.* 38 (12), 2927–2933.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3979–3985.
- Utagawa, E.T., Nishizawa, S., Sekine, S., Hayashi, Y., Ishihara, Y., Oishi, I., Iwasaki, A., Yamashita, I., Miyamura, K., Yamazaki, S., 1994. Astrovirus as a cause of gastroenteritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 32 (8), 1841–1845.
- Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Thomas, M.Z., 1986. Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (2), 391–394.
- Velázquez, F.R., Garcia-Lozano, H., Rodriguez, E., Cervantes, Y., Gómez, A., Melo, M., Anaya, L., Ovalle, J.C., Torres, J., Diaz De Jesus, B., Alvarez-Lucas, C., Breuer, T., Muñoz, O., Kuri, P., 2004. Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23 (10), S149–S155.
- Villa, S., Guiscafré, H., Martínez, H., Muñoz, O., Gutiérrez, G., 1999. Mortalidad estacional por diarrea entre niños mexicanos. *Bull. World Health Organ.* 77 (5), 375–380.
- Villena, C., El-Senousy, W.M., Abad, F.X., Pintó, R.M., Bosch, A., 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3919–3923.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R., Winston, P.E., 1986. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (3), 450–459.
- Yates, M.V., Gerba, C.P., Kelley, L.M., 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (4), 778–781.

CAPITULO 5

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

El proyecto de tesis surge a partir del interés sobre la grave problemática de contaminación que enfrentan los sistemas acuáticos del país y la escasa atención que se le ha dado al tema de contaminación viral del agua a nivel nacional. Además de la necesidad de vincular el trabajo de la investigación básica con su aplicación, que es fundamental para responder a los actuales retos ambientales y de salud pública que se presentan a nivel mundial.

Este trabajo de tesis aporta datos sobre virus entéricos en sistemas acuáticos superficiales y subterráneos. El monitoreo de tres tipos virales permitió identificar un patrón estacional de presencia en agua superficial para el sistema tropical de altura estudiado, lo que coincide con lo que se reporta para sitios de clima templado. La relevancia de esta información radica en que se ha considerado que en latitudes tropicales los virus entéricos tienen una presencia continua en el ambiente, no obstante, este trabajo demuestra que las variaciones climáticas estacionales afectan significativamente la presencia de éstos agentes en el sistema superficial estudiado.

La protección de las fuentes de abastecimiento de agua subterránea, toma un significado diferente cuando se consideran a los virus entéricos. El haber demostrado su prolongada permanencia e infectividad en agua subterránea, junto con su tolerancia a la cloración, aporta evidencia del riesgo potencial de salud que implicaría la contaminación viral de los acuíferos. En especial en la zona Metropolitana de la Ciudad de México, con su alta densidad poblacional.

Otro aporte relevante se relaciona con la normatividad mexicana vigente para la cual resulta urgente la inclusión de indicadores de contaminación viral en la norma oficial mexicana de agua para uso y consumo humano que se aplica a nivel nacional (NOM 127 SSA1-1994), como parte de las medidas preventivas de contaminación ambiental con efectos en salud pública. Sobre todo en zonas densamente pobladas donde el agua subterránea sea la fuente principal de agua para uso y consumo humano.

Asimismo, el periodo que los virus permanecen y son infecciosos en agua superficial, ya que favorece su dispersión cuando el agua es aprovechada en actividades como la agricultura. La falta de control en cuanto a calidad del agua para riego de productos que se consumen crudos, puede afectar la salud de los consumidores. Por estas razones considero que es fundamental ampliar el conocimiento sobre la diversidad de virus que pueden detectarse y permanecer en este tipo de vegetales, cuando son cultivados con agua contaminada.

Otra contribución del presente trabajo se deriva de la correlación encontrada entre la cuantificación de los virus infecciosos y la persistencia de los genomas, la cual apoya la idea de que los genomas son indicadores adecuados de contaminación viral en agua superficial. De este modo las herramientas moleculares como qRT-PCR permiten tener una aproximación específica del nivel de contaminación viral en agua superficial. Sin embargo, la interpretación de la información obtenida a partir de esta técnica no debe perder de vista dos aspectos 1) que puede haber una sobreestimación, ya que la técnica no es capaz de distinguir virus infecciosos de los que no lo son; 2) también puede haber una subestimación debida a que no todos los protocolos consideran la variabilidad genética viral. De no ser considerados, pueden emitirse recomendaciones inadecuadas y que en casos extremos tengan consecuencias en la salud pública de la población. Es por esto que se debe continuar estudiando la relación entre virus infecciosos y la persistencia de sus genomas en agua.

Perspectivas de la línea de investigación

Hay una creciente tendencia a la integración de dos puntos de vista dentro de la Microbiología ambiental: el ecológico y el de salud. El estudio de la diversidad y las interacciones de microorganismos en el ambiente ofrece una valiosa fuente de información, que esta siendo aprovechada por investigadores y profesionales que se desempeñen en áreas como las siguientes: protección ambiental, epidemiología, inocuidad alimentaria, comercio global, entre otras.

En este sentido, el interés es estudiar a los virus en matrices ambientales como vegetales, suelo, sedimento y organismos acuáticos. Lo siguiente etapa del trabajo experimental consiste en estudiar el papel de la vegetación acuática como elemento concentrador y protector de virus entéricos. Surgen varias cuestiones, cuando los virus están adsorbidos a plantas acuáticas, ¿están protegidos de la degradación por factores ambientales como temperatura y radiación solar (UV)?, ¿qué tan abundantes y diversos son en biopelículas formados en las partes de las plantas?.

También existe el interés de estudiar la diversidad de virus entéricos (y otros patógenos) en vegetales de consumo humano que se cultivan con agua residual tratada. Para responder cuestionamientos sobre: los virus que están en el agua, ¿corresponden en diversidad y cantidad a los que se detectan en los vegetales?, ¿predominan los patógenos humanos?, ¿hay diferencia en la frecuencia de virus con respecto a la edad de la planta?, y esto ¿cómo se relaciona con el riesgo de adquirir una enfermedad por consumo?

Un aspecto de interés es diversificar los sistemas acuáticos en los cuales realizar este tipo de estudios. Los sitios en los que se plantea trabajar son los sistemas acuáticos en reservas naturales nacionales (Cuixmala, en la costa de Jalisco), playas nacionales de importancia turística, sistemas de abastecimiento de agua (Presa Valle de Bravo).

En relación con salud se tienen documentados los brotes epidémicos causados por virus entéricos solo en regiones que realizan vigilancia epidemiológica; de lo que se carece en México y otros países. La visión en un futuro cercano con la estandarización y validación de métodos moleculares para la detección de virus entéricos, es disponer de herramientas que favorezcan la evaluación tanto de los riesgos como de los impactos en salud asociados a la contaminación viral del agua.

Desde esta perspectiva la problemática aquí planteada, debe abordarse con una visión interdisciplinaria, pues se trata de una manera de visualizar los diferentes aspectos de un mismo problema, lo cual indudablemente repercute en la obtención de soluciones integrales.