



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Infectividad de rotavirus recuperados de lechugas utilizadas
como matrices experimentales de adsorción

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Nallely Vázquez Salvador



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Marisa Mazari Hiriart

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Datos del jurado

1. Datos del alumno

Vázquez
Salvador
Nallely
56228998
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303142874

2. Datos del tutor

Dra.
Marisa
Mazari
Hiriart

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Ana Cecilia
Espinosa
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Rosa Elena
Sarmiento
Silva

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Lourdes Teresa
Lloret
y Sánchez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Gustavo
Pérez
Ortiz

7. Datos del trabajo escrito

Infectividad de rotavirus recuperados de lechugas utilizadas como matrices experimentales de adsorción.

59 p
2012

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico especialmente a mis padres, por el esfuerzo que realizan cada día y por el apoyo que siempre me han brindado.

Se lo dedico también a mi tía Catalina Vázquez, quién me acompañó en este camino y sin embargo no llegó al final, todas esas bendiciones y enseñanzas que me has dado me ayudan a continuar. Siempre estarás en mi pensamiento.

Agradecimientos

Agradezco a la máxima casa de estudios, a la Universidad Nacional Autónoma de México porque en sus instalaciones he llevado a cabo mi vida académica.

Agradezco a la Facultad de Ciencias, que me permitió mediante sus aulas, laboratorios y salidas de campo, realizar mis estudios de licenciatura.

Al Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Ecología y al Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ya que en estas instituciones desarrollé mi tesis. Al proyecto PUMAGUA y sus integrantes, por la beca otorgada para la realización de la tesis. Al proyecto 248/2010 del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal.

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart por permitirme realizar mi tesis bajo su dirección, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo y por sus observaciones sobre este manuscrito.

A la Dra. Ana Cecilia Espinosa García por su asesoría brindada a lo largo de estos años, por la paciencia y consideraciones que me ha tenido. Además de sus observaciones y aclaraciones sobre la esta tesis.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por los conocimientos que me ha transmitido y porque en ella he encontrado además de una asesora a una gran amiga, porque mi estancia en su laboratorio fue una experiencia inolvidable.

A la Dra. Lourdes Lloret y Sánchez agradezco al tiempo invertido en la revisión de este manuscrito, además que cada una de sus observaciones me han servido para mejorar detalles que antes no consideraba.

Al M. en C. Gustavo Pérez Ortiz por sus observaciones tan acertadas, que como consecuencia han tenido un trabajo más disciplinado, y por la asesoría que me brindó para realizar el análisis de datos.

A la M. en C. Alba Zarco y a Rubén Galicia por la elaboración del mapa aquí presentado.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Química, quienes me han apoyado de diferentes maneras, a Adriana por el mantenimiento del material requerido para los muestreos, a Juan Carlos y a Erick por trasladarme a cada uno de los sitios, a Emilio, Miguel, Omar, Dafne, Paty, Alejandra, Rosa, Toño, Gustavo, Diana, Marlen y Jaqueline, por sus colaboraciones y por hacer que la estancia sea más amena y divertida. Agradezco a Jaqueline por ser mi equipo, por aquellas satisfacciones, sin omitir los momentos de estrés, porque no sólo formas parte de mi equipo de trabajo sino porque te has convertido en una gran amiga.

Agradezco infinitamente a mi familia, a mis papás Antonio y Eugenia porque el sólo hecho de levantarse todos los días y realizar sus actividades correspondientes hace que sean para mí un ejemplo a seguir, mi admiración por ustedes crece a diario, gracias por apoyar mis ideales en todo momento. A mi hermano Caín, quien ha luchado incansablemente por nosotros y por su familia, por su fortaleza, cariño y compañía. A mi hermana Carmina por crecer, compartir y descubrir juntas, por complementar mis días y también por esas diferencias que nos caracterizan. Sin olvidar aquellos pequeños secretos que nos siguen dando fuerza para levantarnos al día siguiente. A mi hermano Jahir, que es el motor de mi existencia, agradezco todo lo que me brindas con una simple mirada. Te agradezco cada una de las alegrías que me haces pasar cada domingo. A mi sobrino Ángel, quien se ha convertido en mi razón de vivir, porque el simple hecho de escuchar tú voz al cantar me convierte en una persona más dichosa. A mi sobrino Arturo por su inocencia y aunque la distancia nos separa el afecto que te tengo es inmenso. A mis mascotas, a las que se han ido y las que siguen ofreciéndome su constancia y alegría.

Doy gracias a aquellas personas que me han apoyado durante mi vida. A la familia Andrade-Gómez (Jula, Jesica, Luis y Jesús), igualmente a mi tía Daría por apoyarnos incondicionalmente y darnos a conocer otros panoramas de la vida. A Oscar Tapia por convertirse en el médico de cabecera y amigo de la familia.

A Iván por su complicidad y su cariño. A Gustavo por esa amistad que forjamos, por el tiempo que compartimos juntos, por la comprensión y la confianza. A pesar de la distancia, aquellos momentos se han quedado impresos.

Agradezco la estancia en mi paso por el Laboratorio de Virología, a aquellos con quienes obtuve nuevos conocimientos y con quien hicimos de la hora de la comida momentos de alegría y de compañerismo. Gracias a Rosa Elena, Elvia, Mario, Barushz y Tere. A Barushz le agradezco también el haber aprendido juntos y el brindarme su amistad, a Tere además le agradezco el haberme asesorado en el laboratorio, todos esos detalles que conmigo ha tenido, el darme consejos y su amistad.

Finalmente doy gracias a mis amigos de la facultad, a Jorge porque seguimos conservando el interés de frecuentarnos y ponernos al tanto de lo que nos sucede. A Jorge, Alonso, Deborah y Alejandro porque con ustedes inicié este camino y aprendí a trabajar con constancia y en equipo.

A Víctor porque es un gran amigo, por las numerosas experiencias compartidas y por los aprendizajes, también por ser parte de la tripulación en las vacaciones y por hacer más alegre la hora de comida. A Ramiro y José Alfredo por ser incondicionales amigos, ustedes representan para mí un pilar muy importante. A Alejandro Martínez por las convivencias, las clases, la natación y las charlas virtuales. A Rodrigo por su compañía tan peculiar, que siempre da el resultado de momentos gratos. A Martha por tú amistad incondicional, por haber sido parte de mis equipos de laboratorio y por asistir a reuniones siempre conmigo. A Sacbel por formar parte de aquellos viajes y porque tú compañía simplemente hace los momentos más divertidos. A Mario por identificarme contigo y ser tan viril. A Areli por sus cuidados, sus preocupaciones y por conocer juntas territorio mexicano. A Diana Osorio por ser tan atenta conmigo, escucharme y

darme consejos. A Rubén por todos los detalles y por hacer más agradable la hora de la comida. A Gerardo, Luis, Joselin, Diana Elinos, Itzi, Pablo, Nadia, Verónica, Claudia, Erendira y Pavel. Agradezco a cada uno de ustedes por tantas experiencias juntos incluyendo los clásicos pasteles sorpresa y las precenas navideñas, además de algunas cuantas salidas masivas.

Índice

Pág.

Capítulo 1. Introducción	1
Reúso del agua.....	1
Normatividad.....	2
Indicadores microbiológicos de calidad del agua.....	3
Importancia de rotavirus	7
Clasificación de rotavirus	8
Organización genómica de rotavirus	9
Replicación y dosis infectiva de rotavirus	11
Justificación	12
Capítulo 2. Hipótesis y objetivos	13
Hipótesis	13
Objetivos generales	13
Objetivos particulares	14
Capítulo 3. Métodos	15
Sitio de estudio	15
Métodos de campo	16
Muestreo	16
Métodos experimentales.....	19
Detección de coliformes fecales y enterococos fecales por el método de filtración a través de membrana en muestras de agua	20
Recuperación de colifagos mediante ultrafiltración	21
Detección de colifagos por la técnica de doble capa de agar en muestras de agua	22
Análisis de datos	23
Células y virus.....	23
Recuperación de rotavirus de la superficie de lechugas	24
Determinación de infectividad de rotavirus mediante cultivo celular	25
Detección de rotavirus por RT-PCR de punto final	26

Capítulo 4. Resultados	28
Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua.....	28
Detección de coliformes, enterococos y colifagos	30
Temporada cálida-seca.....	30
Temporada cálida-lluvias	31
Temporada fría-seca.....	32
Análisis de datos.....	33
Determinación de infectividad de rotavirus en cultivo celular.....	35
Detección de rotavirus por RT-PCR de punto final	39
Capítulo 5. Discusión	41
Parámetros fisicoquímicos.....	41
Detección de coliformes, enterococos y colifagos	42
Infectividad de rotavirus y su detección por RT-PCR	45
Capítulo 6. Conclusiones	48
Referencias	50

Índice de Tablas

Pág.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los indicadores de contaminación fecal.	6
Tabla 2. Sitios de muestreo, tipo de agua y número total de muestras colectadas en Ciudad Universitaria.	19
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos medidos en los cuatro tipos durante las tres temporadas de muestreo en Ciudad Universitaria.	29
Tabla 4. Valor de p para la comparación entre BF y CF-BF.	34
Tabla 5. Tablas de presencia (+) - ausencia(-) de CF-EF y BF.	34
Tabla 6. Cinética de recuperación de rotavirus SA11 en lechugas inoculadas. Titulación por TCID ₅₀ /mL en células MA104.	37
Tabla 7. Concentración de RNA y relación 260/280 de las muestras positivas a RT-PCR.	39

Índice de Figuras

Pág.

Figura 1. Grupos, subgrupos y serotipos de rotavirus clasificados con base en sus especificidades antigénicas.....	9
Figura 2. Organización genómica de rotavirus, se presentan los 11 segmentos con sus respectivos marcos de lectura, proteínas que son codificadas y el tamaño de cada segmento en pb.....	10
Figura 3. Proteínas estructurales que conforman las tres capas concéntricas que rodean el genoma viral de rotavirus..	10
Figura 4. Sitios de muestreo de los diferentes tipos de agua en el campus de Ciudad Universitaria. PQ Pozo de la Facultad de Química; PM Pozo Multifamiliar, PV Pozo Vivero Alto; PTICA Planta de tratamiento influente Cerro del Agua; PTECA Planta de tratamiento efluente Cerro del Agua; PTICP Planta de tratamiento influente Ciencias Políticas y Sociales; PTECP Planta de tratamiento efluente Ciencias Políticas y Sociales; C1 Cisterna 1; C2 Cisterna 2; C3 Cisterna 3; C6 Cisterna 6; C7 Cisterna 7; C10 Cisterna 10; C11 Cisterna 11; C12 Cisterna 12.	18
Figura 5. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada CS.....	31
Figura 6. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada CL.	32
Figura 7. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada FS.	33
Figura 8. ECP de rotavirus en células MA104 teñidas a las 48 hrs con cristal violeta. a) Células MA104 confluentes sin infectar. b) ECP.....	35

Figura 9. Reducción de la infectividad de rotavirus SA11 sobre las superficies vegetales.	35
Figura 10. Porcentaje de células no infectadas por rotavirus, 48 horas post-infección. Datos transformados a partir de la lectura de la liberación de cristal violeta a 620 nm.	37
Figura 11. Amplificación mediante RT-PCR de muestras con ECP. Se utilizó un par de primers que hibridan en la región que codifica para la proteína VP6 de rotavirus. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. MP Marcador de peso molecular 100 pares de bases; CN Control negativo; CP Control positivo; CD Controles de la línea base de cada día; D Desde el día cero al día siete. .	39

Abreviaturas

CU Ciudad Universitaria

CS Cálida-Seca

CL Cálida-Lluvias

FS Fría-Seca

PQ Pozo de la Facultad de Química

PM Pozo Multifamiliar

PV Pozo Vivero Alto

PTAR Planta de tratamiento de aguas residuales

PTCA Planta de tratamiento Cerro del Agua

PTCP Planta de tratamiento de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales

PTICA Planta de tratamiento, influente Cerro del Agua

PTECA Planta de tratamiento, efluente Cerro del Agua

PTICP Planta de tratamiento, influente Ciencias Políticas y Sociales

PTECP Planta de tratamiento, efluente Ciencias Políticas y Sociales

C1 Cisterna 1-Camellón central Química

C2 Cisterna 2-Campo central Arquitectura

C3 Cisterna 3-Servicios Médicos

C6 Cisterna 6-Campos de béisbol Multifamiliar

C7 Cisterna 7- Zona deportiva Pumitas

C10 Cisterna 10-Tepozán Jardín Botánico

C11 Cisterna 11-Estanque de los peces Jardín Botánico

C12 Cisterna 12- Camellón Veterinaria

SDT Sólidos disueltos totales

CF Coliformes fecales

EF Enterococos fecales

BF Colifagos

UFC Unidades formadoras de colonia

UFP Unidades formadoras de placa

ECP Efecto citopático

Resumen

Rotavirus es un agente común en agua residual, causa gastroenteritis severa en infantes y se puede transmitir a través de agua y alimentos que se consumen crudos, como las hortalizas. El objetivo de este trabajo fue determinar experimentalmente la reducción de infectividad de rotavirus SA11 inoculado sobre la superficie de lechugas. Para ello, se inocularon superficies de lechuga con 1×10^6 TCID₅₀/mL de rotavirus. Durante siete días se recuperaron los rotavirus de las lechugas inoculadas con intervalos de un día y se determinó la infectividad de rotavirus por el método TCID₅₀ en células MA104. La reducción de rotavirus infecciosos al cabo de siete días fue de cuatro unidades logarítmicas. Durante los siete días se observó efecto citopático en las células. Paralelamente se detectó a los rotavirus recuperados por RT-PCR, siendo una prueba que confirmó que el efecto citopático fue efectivamente causado por los rotavirus inoculados en la superficie de la lechuga.

Se demostró que los rotavirus pueden permanecer infecciosos por periodos mayores a siete días a temperatura ambiente en un sustrato inerte. Además, si los títulos virales en agua son superiores a cuatro unidades logarítmicas es factible su permanencia en la superficie vegetal en cantidades superiores a la dosis infecciosa (10 a 100 partículas virales infectivas). Los resultados obtenidos indican que sería conveniente incluir en el monitoreo microbiológico de la calidad del agua la determinación de virus entéricos o en su caso un sustituto, como son los colifagos. De esta manera, los experimentos anteriores surgieron a partir de la caracterización microbiológica de diferentes tipos de agua en Ciudad Universitaria UNAM durante el ciclo anual 2010. En particular, de agua residual cruda y tratada, dado que los rotavirus son agentes comunes en estos tipos de agua.

La caracterización de los diferentes tipos de agua consistió en la colecta de muestras de agua subterránea (antes de cloración), agua residual (influyente PTAR), agua residual tratada (efluente PTAR) y agua de reúso almacenada (cisternas). Se consideraron tres temporadas: cálida-seca, cálida-lluvias y fría-

seca. Las muestras se procesaron para la detección de bacterias coliformes fecales, enterococos fecales y colifagos.

Los colifagos y enterococos estuvieron presentes en todos los tipos de agua. Los enterococos se encontraron en un intervalo de $(1.2 \times 10^0 - 6 \times 10^6 / 100 \text{ mL})$, siendo más frecuentes que los coliformes. Los colifagos se encontraron en un intervalo de $(1.7 \times 10^0 - 1.6 \times 10^3 / \text{mL})$. En agua subterránea se observaron conteos bajos tanto de enterococos $(1.2 \times 10^0 - 1.3 \times 10^0 / 100 \text{ mL})$ como de colifagos $(1.7 \times 10^0 - 5.4 \times 10^0 / \text{mL})$.

Finalmente, el monitoreo de la calidad del agua y de los productos que con ella son regados son de suma importancia para poder establecer planes de prevención de riesgos a la salud humana y ambiental.

Capítulo 1. Introducción

Reúso del agua

El agua es un recurso fundamental que desempeña un vínculo importante entre las actividades humanas y los sistemas naturales. Sin embargo, el crecimiento demográfico, la urbanización, cambios en el uso del suelo y la contaminación de aguas superficiales y subterráneas han provocado que la disponibilidad de la misma sea cada vez menor (OMS, 2011). Por consiguiente, el reúso de la misma es una alternativa para el abastecimiento. Esta práctica es útil, siempre y cuando a través del tratamiento se logre la calidad fisicoquímica y microbiológica requerida para los diferentes usos (Escalante *et al.*, 2003).

No obstante, el tratamiento de aguas residuales no siempre es eficiente, lo que puede favorecer la persistencia de diversos microorganismos como parásitos, bacterias y virus, ya que muchos son resistentes a los diversos tratamientos de agua. Por ello, el uso del agua residual puede representar un riesgo para la salud pública (Mazari-Hiriart *et al.*, 2010).

En México se practican diferentes tipos de reúso, principalmente en las grandes ciudades o zonas donde los requerimientos de agua son mayores. En el Estado de México y en el Distrito Federal aproximadamente 2,092 L/s son reutilizados para diferentes actividades como la agricultura, riego de áreas verdes, y en menor proporción para uso industrial y recarga de acuíferos (Escalante *et al.*, 2003).

El riego de cultivos con agua residual cruda o tratada es una práctica que implica un gran riesgo a la salud cuando se aplica a productos que se consumen crudos, como es el caso de las hortalizas (Shidu *et al.*, 2008).

Normatividad

De acuerdo a sus diferentes usos, la calidad del agua se encuentra regulada con normas que establecen los límites máximos permisibles de compuestos y microorganismos que la afectan. En la NOM-127-SSA1-1994 se establece que no deben de ser detectados los coliformes totales y fecales en el agua para uso y consumo humano (DOF, 2000). En la NOM-003-ECOL-1997 se establece un límite máximo permisible para coliformes fecales y huevos de helminto (h) en agua de reúso con contacto directo al público de 240 NMP/100 mL y de 1h/L respectivamente, así como 1,000 NMP/100 mL y 5 h/L en agua de reúso con contacto indirecto al público u ocasional (DOF, 1998).

Al únicamente ser incluidas en las normas oficiales mexicanas, las bacterias coliformes y los huevos de helminto, la regulación en términos biológicos de la calidad del agua se puede considerar incompleta, pues en diversos estudios se ha demostrado la presencia de otras bacterias, además de bacteriófagos y virus entéricos, que no son representados por estos indicadores tradicionales (Silva-Magaña, (en revisión); Cheong *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2009; Fonseca-Salazar, 2010; Kiulia *et al.*, 2010; Santiago-Rodríguez *et al.*, 2010). En consecuencia, es importante abordar un espectro más amplio de microorganismos presentes en el agua.

Ante esta problemática, en Ciudad Universitaria se implementó un programa integral denominado PUMAGUA (Programa de Manejo, Uso y Reúso del Agua en la UNAM), el cual pretende ser un programa piloto que podrá transferirse a diversos centros poblacionales dentro y fuera del país. Sus objetivos principales son, mejorar la calidad del agua para uso y consumo humano, a fin de que sea efectivamente bebible, y que el agua residual tratada para reúso no represente riesgos a la salud de la población expuesta (PUMAGUA, 2010). Así, con el desarrollo de nuevas investigaciones se ha realizado el monitoreo de la presencia de indicadores de calidad del agua complementarios a los establecidos, como es el caso de este trabajo.

Indicadores microbiológicos de calidad del agua

Tanto las bacterias como los virus que son transmitidos al humano a través de agua o alimentos, pueden causar enfermedades respiratorias y gastrointestinales. Se transmiten por la ruta fecal-oral y se replican en el tracto digestivo de animales de sangre caliente incluyendo humanos, por tal motivo la presencia de estos microorganismos en el agua sugiere contaminación fecal (Savichtcheva *et al.*, 2006). A continuación se describen las ventajas y desventajas de los indicadores de contaminación fecal utilizados en este estudio.

Las bacterias pertenecientes a los coliformes fecales son gram negativas y se reproducen a 44.5°C. *Escherichia coli* forma parte de este grupo y actualmente es considerado un indicador de contaminación fecal, aunque junto con bacterias de géneros como *Klebsiella* se han encontrado en ambientes prístinos (Toranzos *et al.*, 2007), incluso se presume que pueden formar parte de la microbiota de ambientes tropicales (Shibata *et al.*, 2004). Se ha reportado que los miembros de este grupo presentan recrecimiento en sistemas acuáticos y en sistemas de distribución de agua, representando deficiencias como grupo indicador de calidad del agua (Gleeson *et al.*, 1997).

Los enterococos fecales son bacterias gram positivas que crecen en un intervalo de temperatura entre 10° y 45°C además de ser tolerantes a la salinidad. Las ventajas que presentan con respecto a los coliformes fecales es que se asocian con contaminación fecal humana (Toranzos *et al.*, 2007); no se multiplican en agua, son más resistentes a procesos de cloración y persisten en el ambiente durante más tiempo que los coliformes (Gleeson *et al.*, 1997).

Al contrario de las bacterias indicadoras de contaminación fecal, los virus entéricos únicamente se encuentran en el tracto gastrointestinal de individuos que han sido infectados y cuando son eliminados en las heces fecales pueden ser transmitidos a través del agua y de alimentos que se consumen en crudo (Pulido *et al.*, 2005). Además que sobreviven por más tiempo en el ambiente que las bacterias (Reynolds, 2001).

Norovirus, astrovirus, enterovirus, adenovirus, rotavirus, entre otros, se han identificado como agentes que causan gastroenteritis en humanos. Poliovirus ha sido propuesto como indicador de contaminación fecal, no obstante, el número de partículas virales encontradas en ambientes acuáticos es variable, por lo tanto no se considera un buen indicador (Pulido *et al.*, 2005). Debido a que se encuentran en bajas concentraciones en el agua, la detección de los virus requiere del uso de métodos de concentración (Reynolds, 2001). Además, la detección de virus requiere de técnicas especializadas y no todos los virus son fáciles de cultivar, como es el caso del virus de la hepatitis A (Formiga-Cruz *et al.*, 2006) y en el peor de los casos no se han logrado cultivar como ocurre con norovirus (Duizer *et al.*, 2004).

Dichas dificultades han llevado a la necesidad de buscar indicadores virales alternativos a los enterovirus, estos indicadores son los bacteriófagos. Los bacteriófagos que infectan a bacterias como *E. coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae son referidos como colifagos.

El uso de colifagos como indicadores de contaminación fecal se basa en la suposición de que su presencia en agua señala la presencia de bacterias coliformes capaces de soportar la replicación de los virus. La replicación de los colifagos comienza cuando infectan a sus hospederos a través de receptores específicos, por ejemplo, en componentes de la pared celular o por medio del pili sexual, ambos tipos de infección se asocian con los dos grupos principales de colifagos que han sido estudiados: los colifagos somáticos y los colifagos RNA F-específicos respectivamente.

Los colifagos presentan ventajas como indicadores complementarios debido a que su detección requiere de técnicas simples y baratas que permiten obtener resultados en 18 horas (Leclerc *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 2009). Se encuentran en abundancia en agua residual y se han propuesto como indicadores de virus entéricos ya que son similares en tamaño y forma, presentan una tolerancia similar a los tratamientos de desinfección de agua e inclusive las poblaciones de colifagos son más grandes que las de los enterovirus (Pulido *et al.*, 2005; Savichtcheva *et al.*, 2006).

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las características de cada uno de los indicadores anteriormente descritos, asimismo se incluye información de las posibles correlaciones que pudieran tener con algunos patógenos y los métodos utilizados para su detección.

El indicio que dan los colifagos al ser propuestos como indicadores de virus entéricos, proporciona la pauta para realizar ensayos de infectividad acerca de la dinámica de la inactivación de los virus entéricos sobre superficies vegetales, que pueden participar como matrices de adsorción, ya que los virus tienden a adherirse en las superficies para evitar la exposición a condiciones adversas (Reynolds, 2001). Las lechugas son adecuadas para la permanencia de virus por la gran superficie que poseen, además que se riegan con agua residual y son hortalizas que se consumen en crudo (Badawy *et al.*, 1985), por los fundamentos anteriores se eligió esta matriz vegetal para realizar ensayos de infectividad con un virus entérico como rotavirus.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los indicadores de contaminación fecal. Modificado de Savichtcheva *et al.*, 2006 2006.

Criterio de ser indicador	Coliformes fecales	Enterococos fecales	Colifagos
Presencia en heces y ambientes acuáticos	Presencia en heces fecales de animales de sangre caliente (Toranzos <i>et al.</i> , 2007), sin embargo se presume que formen parte de la microbiota de áreas tropicales (Shibata <i>et al.</i> , 2004).	Presencia en heces fecales de animales de sangre caliente, se asocian con contaminación fecal humana (Toranzos <i>et al.</i> , 2007).	Presentes en heces humanas y de animales, abundantes en agua residual (Savichtcheva <i>et al.</i> , 2006).
Capacidad para multiplicarse y persistir en el agua	Recrecimiento en sistemas acuáticos y en sistemas de distribución de agua. Supervivencia limitada y son vulnerables a los tratamientos de agua (Gleeson <i>et al.</i> , 1997).	No se multiplican en agua, son más resistentes a procesos de cloración y persisten en el ambiente durante más tiempo que los coliformes (Gleeson <i>et al.</i> , 1997).	Posibilidad de replicarse en aguas residuales (Hurst <i>et al.</i> , 2007). Alta tolerancia a los tratamientos de desinfección de agua, similar a la de los virus entéricos (Savichtcheva <i>et al.</i> , 2006).
Correlación con patógenos o enfermedades transmitidas por el agua.	Correlación pobre con patógenos entéricos (Horman <i>et al.</i> , 2004).	Relación con síntomas gastrointestinales (Kinzelman <i>et al.</i> , 2003).	Relación con virus entéricos, al ser semejantes en tamaño, forma y tolerancia al ambiente (Savichtcheva <i>et al.</i> , 2006).
Métodos de detección	Métodos de cultivo que no son capaces de identificar la fuente de contaminación (Horman <i>et al.</i> , 2004).	Métodos de cultivo que no son capaces de identificar la fuente de contaminación (Horman <i>et al.</i> , 2004).	Métodos de cultivo sencillos, baratos, que permiten la obtención de resultados en 18 hrs (Leclerc <i>et al.</i> , 2000; Maier <i>et al.</i> , 2009).

Importancia de rotavirus

Rotavirus es el agente etiológico causante de gastroenteritis severa en infantes más importante a nivel mundial (Svraka *et al.*, 2007), infecta también especies animales de importancia económica como bovinos, porcinos y aves. Igualmente, existen reportes que sugieren a rotavirus ser un agente potencialmente zoonótico (Guerrero *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2010).

En México no existen reportes concretos del número de casos de enfermedades gastrointestinales causadas por virus. No obstante, el Boletín Epidemiológico en línea (SSA/DGEPI, 2011), reporta con una frecuencia semanal los casos de las enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo dentro de la categoría denominada “Infección intestinal por otros organismos y las mal definidas”. En esta categoría se incluyen a bacterias y virus tales como *E. coli*, *Campylobacter*, *Clostridium*, norovirus, adenovirus y rotavirus. Cabe destacar que las cifras a nivel nacional para el 2010 rebasaron los cuatro millones y medio de casos (DGEPI, 2011).

Según estimaciones de la OMS, 527,000 niños en todo el mundo mueren cada año por la infección producida por rotavirus (OMS, 2004) y la mayoría son habitantes de países en vías de desarrollo (OMS, 2010). Sin embargo, la frecuencia de infección es similar en países desarrollados, su distribución mundial se debe a que incluso niveles de higiene avanzados no son capaces de controlar significativamente las infecciones por estos virus (Rojas *et al.*, 2008).

Al igual que otros virus entéricos se excretan en las heces, transmitiéndose por la ruta fecal-oral. De manera que aquellos vegetales que se consumen crudos pueden exponerse a la contaminación fecal durante el riego. Además que las partículas se pueden transmitir a través de manos u objetos contaminados (Bidawid *et al.*, 2000; Croci *et al.*, 2002, Samaniego, 2007; Cheong *et al.*, 2009).

Los rotavirus son resistentes en un intervalo de pH de 3 a 10, al calor y a enzimas proteolíticas, pueden sobrevivir por largos periodos en el ambiente, y no son completamente removidos del agua residual tratada. Las partículas mantienen su integridad y su infectividad cuando son tratadas con solventes orgánicos como el éter, son sensibles a la pérdida de la capa externa al ser tratados con desinfectantes como cloro y etanol (Grassi *et al.*, 2010).

Clasificación de rotavirus

La clasificación de los rotavirus se basa en tres especificidades antigénicas: grupos, subgrupos y serotipos. Existen siete grupos indicados con las letras desde la A a la G. Los grupos A, B, y C infectan humanos y animales como bovinos, ovinos, caballos, cerdos, monos, perros, gatos y roedores, considerándose el grupo A el principal responsable de infecciones en humanos, los grupos D, F y G infectan aves de corral, mientras que el grupo E sólo se ha reportado en cerdos. Esta clasificación se basa en la proteína estructural VP6 que es la más abundante en las partículas de rotavirus (Hoshino *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2010).

Los subgrupos están determinados con base en epítopes ubicados sobre VP6. La mayoría de los rotavirus que infectan humanos se encuentran entre los subgrupos I o II.

Por su parte, los serotipos se designan por las proteínas externas VP7 y VP4. Un sistema binario determina los serotipos, VP7 se designa con una G por ser una glicoproteína y VP4 se designa con una P por su sensibilidad a proteasa (Hoshino *et al.*, 2000; Vizzi, 2009) (Figura 1).

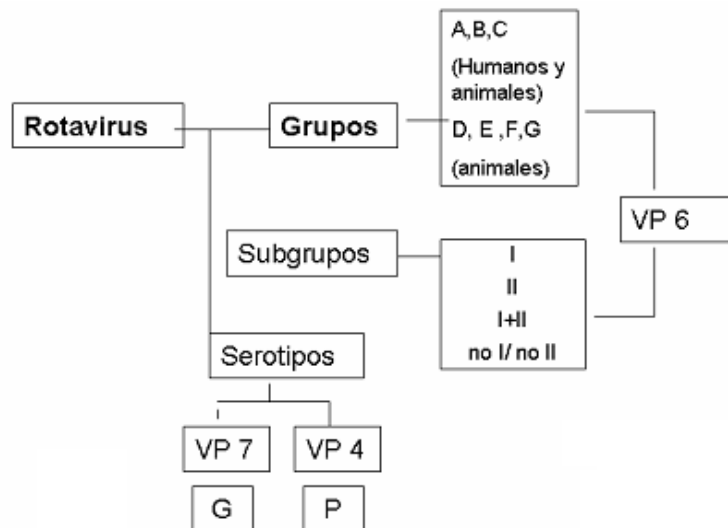


Figura 1. Grupos, subgrupos y serotipos de rotavirus clasificados con base en sus especificidades antigénicas. Tomado de Vizzi, 2009.

Organización genómica de rotavirus

Miembro de la familia *Reoviridae*, es un virus icosaédrico no envuelto que mide aproximadamente entre 70 y 100 nm de diámetro. Su genoma está compuesto de 11 segmentos de RNA de doble cadena, cada segmento presenta un marco de lectura abierto a excepción del segmento 11 que presenta dos. Cada segmento mide alrededor de 667 a 3,302 pares de bases (pb) y el genoma en conjunto tiene un tamaño de 18,555 pb (Figura 2) (ICTV, 2005).

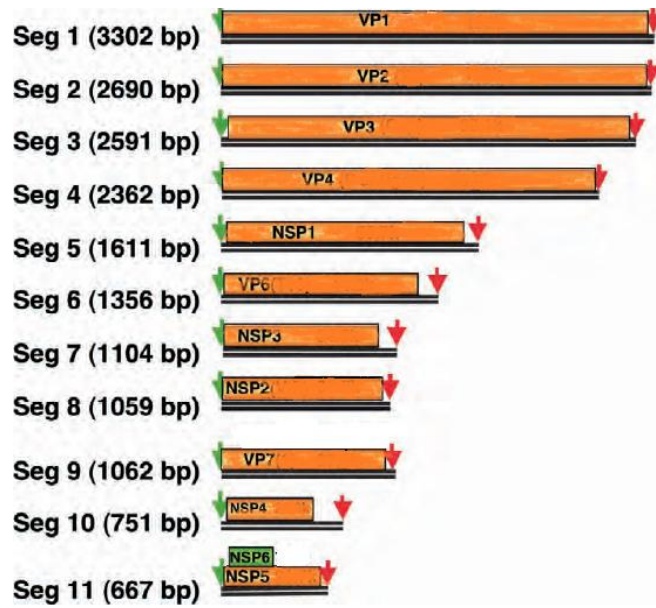


Figura 2. Organización genómica de rotavirus, se presentan los 11 segmentos con sus respectivos marcos de lectura, proteínas que son codificadas y el tamaño de cada segmento en pb. Tomado de ICTV, 2005.

El genoma se encuentra protegido por tres capas concéntricas de proteínas estructurales. La capa interna la conforman las proteínas VP1, VP2 y VP3. La capa intermedia la forma VP6, que junto con la capa interna forma partículas de doble capa DLPs por sus siglas en inglés (*double layer particle*), que son transcripcionalmente activas. La capa externa está formada por VP4 y VP7 de manera que las tres capas constituyen partículas infecciosas TLPs por sus siglas en inglés (*triple layer particle*) (Figura 3) (ICTV, 2005).

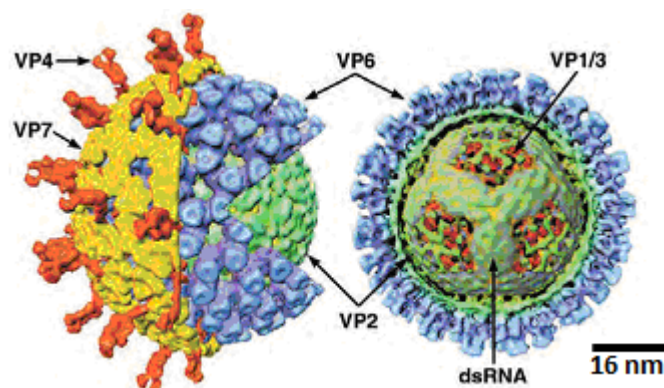


Figura 3. Proteínas estructurales que conforman las tres capas concéntricas que rodean el genoma viral de rotavirus. Tomado de ICTV, 2005.

Replicación y dosis infectiva de rotavirus

Rotavirus presenta tropismo por las células que infecta, su blanco son las vellosidades del intestino delgado: los enterocitos maduros. *In vitro* también presenta tropismo e infecta líneas celulares de origen renal, intestinal y hepático entre ellas células Vero y MA104 (Guerrero *et al.*, 2008).

Dicho tropismo se debe a la interacción del virus con sus receptores celulares. Los elementos necesarios para la replicación del virus incluyen la entrada a la célula hospedera por endocitosis o mediante penetración directa a través de la membrana plasmática (Isa *et al.*, 2004). Posteriormente se pierden VP4 y VP7, mientras que la RNA polimerasa (VP1) (Figura 3) activa la transcripción y en consecuencia la síntesis de proteínas, paralelamente se producen cadenas negativas complementarias a los RNAs mensajeros para formar RNAs de doble cadena (Rojas *et al.*, 2008). En el citoplasma celular, en las estructuras llamadas viroplasmos ocurre la replicación del genoma y se ensamblan las DLPs. Finalmente en la membrana del retículo endoplásmico se producen las TLPs que son infecciosas (Figura 3) (Samaniego, 2007; Rojas *et al.*, 2008). Al salir mediante lisis celular, las nuevas partículas son capaces de infectar porciones distales del intestino delgado o ser excretadas en las heces (Anderson *et al.*, 2004). Un individuo infectado con rotavirus puede excretar alrededor de 100 a 1,000 partículas infecciosas/mL de heces y se presume que la dosis infectiva es de 10 a 100 partículas virales infectivas (Samaniego, 2007).

Justificación

El marco de referencia que sustenta la realización de este estudio es la detección inicial de indicadores de contaminación fecal, como son bacterias y colifagos en muestras de agua subterránea, residual y residual tratada en Ciudad Universitaria. Dentro del proyecto PUMAGUA, Fonseca-Salazar en el ciclo anual 2009 reportó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en agua y en pasto regado con agua residual tratada. Silva-Magaña (en revisión) detectó la presencia de virus entéricos en agua residual destinada para el riego de áreas verdes. Al estar presentes en el agua residual y en el pasto que es regado con la misma, existe un riesgo a la salud de las personas que eventualmente estén expuestas; una situación importante es la práctica de consumir alimentos en áreas verdes, ya que los alimentos se pueden contaminar y fungir como un vehículo de transmisión de microorganismos. Así, surge el interés de determinar *in vitro* el tiempo que pueden permanecer infectivos los rotavirus sobre superficies vegetales, en particular en lechugas, dado que son hortalizas regadas con agua residual y al ser consumidas en crudo juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades.

Conjuntamente, se realizó en el ciclo anual 2010, un monitoreo de la calidad del agua en Ciudad Universitaria para caracterizar microbiológicamente agua con usos distintos. Además, el agua residual de CU se puede considerar representativa de la población urbana y nos permite identificar la magnitud de microorganismos presentes en este tipo de agua, información que puede ser utilizada para la inoculación en hortalizas.

Capítulo 2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

- Debido a que rotavirus es estable fuera de su hospedero y tolera condiciones de temperatura y luz ambientales, se espera que al recuperar rotavirus de la superficie de lechugas inoculadas, los rotavirus recuperados mantendrán su capacidad infectante, lo que se determinará mediante la infección de células MA104 y también se podrá confirmar mediante RT-PCR que la infección de células fue originada por los rotavirus recuperados.
- Debido a las ventajas que presentan los colifagos con respecto a las bacterias indicadoras de contaminación fecal, se espera que en un análisis microbiológico, en agua de diferentes tipos de Ciudad Universitaria, los colifagos se encuentren en mayor frecuencia que las bacterias indicadoras de contaminación fecal, por su capacidad de ser tolerantes a los diferentes tratamientos de agua.

Objetivos generales

- Determinar experimentalmente la reducción de infectividad de rotavirus SA11 inoculado sobre la superficie de lechugas.
- Detectar la presencia de bacterias indicadoras y colifagos en diferentes tipos de agua de Ciudad Universitaria.

Objetivos particulares

- Determinar mediante la infección de células MA104 el tiempo que rotavirus SA11 permanece infeccioso sobre la superficie de lechugas, las cuales pueden fungir como una matriz de adsorción.
- Detectar la presencia de rotavirus recuperado a diferentes tiempos mediante RT-PCR de punto final, como una prueba confirmatoria.
- Detectar coliformes fecales en muestras de agua, como indicador microbiológico tradicional para comparar su presencia con la de enterococos fecales y colifagos como indicadores complementarios de calidad de agua.

Capítulo 3. Métodos

Sitio de estudio

El campus central de Ciudad Universitaria (CU) ubicado en la Ciudad de México pertenece a la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual se ubica en la parte de menor altitud del derrame del volcán Xitle, en la zona conocida como Pedregal de San Ángel donde predomina suelo volcánico (UNAM, 2011).

Su clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, Cb(w1)(w), presenta una temperatura media anual de 15.5°C y una precipitación promedio anual de 835 mm. La lluvia se distribuye de manera heterogénea, lo que implica que se establezcan dos temporadas marcadas, la de lluvias y la de secas (Castillo-Argüero *et al.*, 2004).

CU tiene en promedio una extensión de 730 hectáreas (ha) (DGECI, 2011), comprendiendo diferentes zonas: la urbana, la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y la de áreas verdes. La REPSA posee una extensión de 273 ha y 155 ha corresponden a áreas verdes. En las áreas verdes se realizan actividades recreativas, como practicar deportes al aire libre, pasear mascotas, descansar, comer, entre otras. (PUMAGUA, 2010).

El resto de CU está comprendido por el Estadio Olímpico, campos deportivos y la zona escolar que se compone de edificios como facultades e institutos, dedicados a la formación académica de sus estudiantes y a la investigación científica.

CU posee una amplia red de agua, el agua para uso y consumo humano es extraída de tres pozos: Multifamiliar, Vivero Alto y el de la Facultad de Química. El volumen promedio extraído es de 120 L/s. Los pozos Multifamiliar y Vivero Alto funcionan diariamente mientras que el pozo de la Facultad de Química se mantiene como reserva. La potabilización en los pozos Multifamiliar y Vivero Alto se realiza con hipoclorito de sodio, mientras que el pozo de la Facultad de Química se potabiliza con cloro gas (PUMAGUA, 2010).

También cuenta con tres plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR): la de Cerro del Agua, la de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, así como la del Instituto de Ingeniería. El agua residual que llega del colector de la zona antigua de CU (colectores de la zona del Estadio Olímpico, el Estadio de Prácticas, la Escuela Nacional de Trabajo Social, las facultades de Contaduría, Ingeniería, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Institutos de Ingeniería, Matemáticas Aplicadas, Psiquiatría y Salud Mental) (Villa, 2000), de los colectores de la Zona Sur así como de los edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería es recibida por las plantas de Cerro del Agua, de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales y del Instituto de Ingeniería respectivamente. La capacidad total de tratamiento de estas tres plantas es de 48 L/s, aunque sólo se tratan 21 L/s; equivalente al 26% del volumen de aguas residuales y pluviales que conducen los colectores (PUMAGUA, 2010).

El riego de las áreas verdes, se realiza con dos tipos de agua, subterránea y tratada, ambos tipos de agua se almacenan en 12 cisternas ubicadas dentro del campus. De las 155 ha que corresponden a áreas verdes sólo una tercera parte es regada con agua residual tratada, el resto se riega con agua subterránea proveniente de los pozos (PUMAGUA, 2010).

Métodos de campo

Muestreo

Se realizó un muestreo en el año 2010 durante tres temporadas, las cuales fueron definidas a partir de los registros de precipitación y temperatura de la Ciudad de México, fundamentadas en la Red Meteorológica y en la Red de Depósito Atmosférico de la Ciudad de México (REDMET, 2004-2008; REDDA, 2004-2008).

Las temporadas fueron: cálida-seca (CS) (mayo a junio), cálida-lluvias (CL) (julio a septiembre) y fría-seca (FS) (octubre a febrero).

Se muestrearon los tres pozos de extracción de agua subterránea, dos de las tres plantas de tratamiento: la de Cerro del Agua y la de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, además de ocho cisternas de almacenamiento de agua residual tratada y subterránea (Figura 4). La PTAR de Cerro del Agua

sólo se muestreó durante la temporada CS ya que posterior a esta temporada la planta dejó de operar para ser remodelada. En la Tabla 2 se resumen los sitios de muestreo, el tipo de agua y el número total de muestras colectadas.

Para los pozos de extracción (de agua subterránea) se tomaron 100 L de agua antes de cloración en bidones de polipropileno (Nalgene) de 10 y 20 L de capacidad, previamente esterilizados.

En las PTAR se tomó 1 L de muestra por triplicado en frascos de polipropileno estériles (Nalgene), tanto para la entrada (influyente) como para la salida (efluente), de igual manera para las cisternas.

Tanto las muestras de los pozos de extracción como de las PTAR se tomaron de la llave asépticamente, es decir, previo a la colocación de los frascos para la recepción de las muestras, se desinfectó la boca de la llave con etanol al 70% y se dejó circular el agua durante tres minutos, posteriormente se tomaron las muestras evitando tocar la boca de la llave. Las muestras de agua de cisternas se tomaron utilizando un muestreador. Durante su traslado al laboratorio se transportaron en hieleras y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

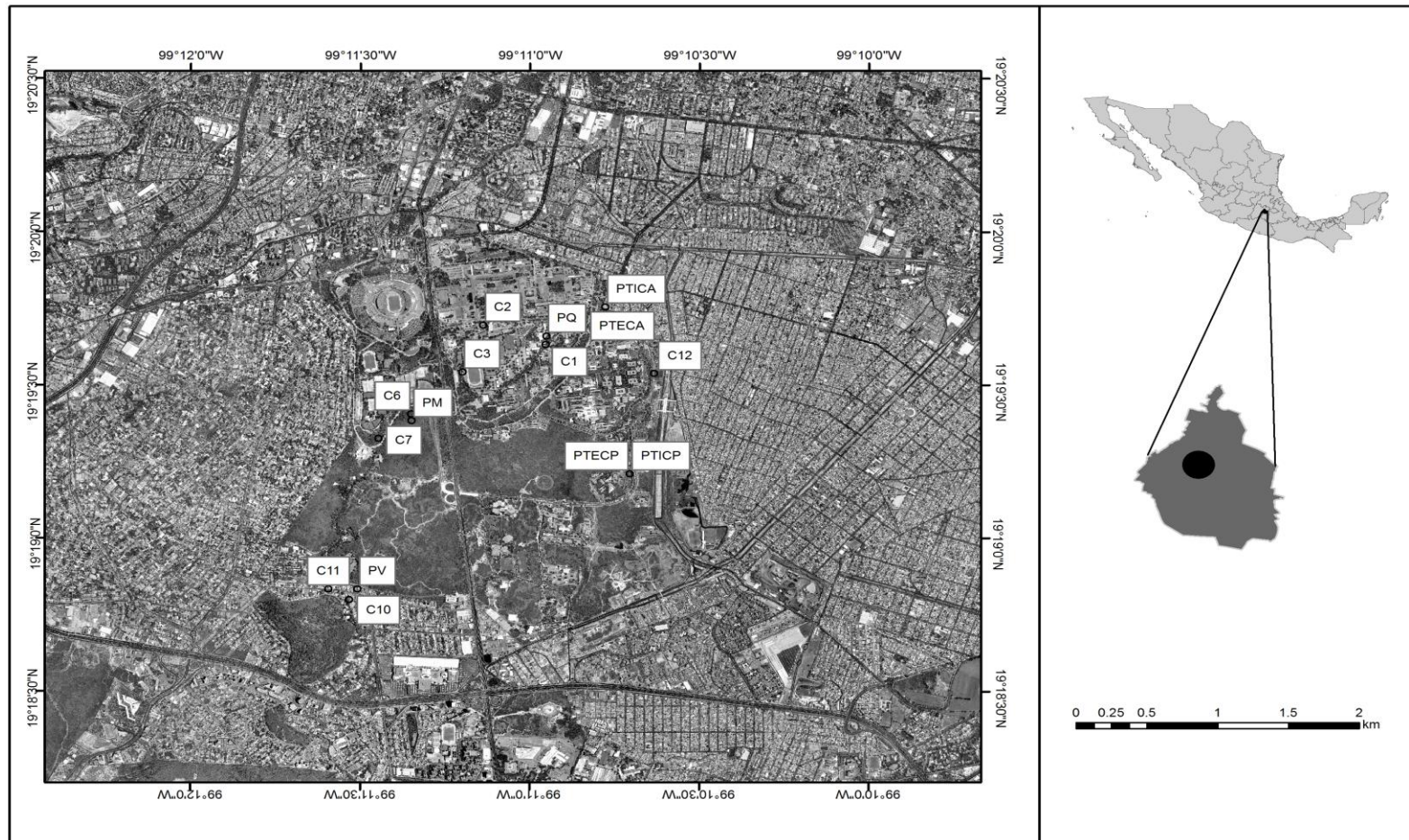


Figura 4. Sitios de muestreo de los diferentes tipos de agua en el campus de Ciudad Universitaria. PQ Pozo de la Facultad de Química; PM Pozo Multifamiliar, PV Pozo Vivero Alto; PTICA Planta de tratamiento influente Cerro del Agua; PTECA Planta de tratamiento efluente Cerro del Agua; PTICP Planta de tratamiento influente Ciencias Políticas y Sociales; PTECP Planta de tratamiento efluente Ciencias Políticas y Sociales; C1 Cisterna 1; C2 Cisterna 2; C3 Cisterna 3; C6 Cisterna 6; C7 Cisterna 7; C10 Cisterna 10; C11 Cisterna 11; C12 Cisterna 12.

Tabla 2. Sitios de muestreo, tipo de agua y número total de muestras colectadas en Ciudad Universitaria.

Sitio	Tipo de agua	Número de muestras
PQ	Subterránea antes de cloración	13
PM	Subterránea antes de cloración	12
PV	Subterránea antes de cloración	12
PTICA	Residual	3
PTECA	Residual tratada	2
PTICP	Residual	13
PTECP	Residual tratada	13
C1	Agua almacenada para reúso	8
C2	Agua almacenada para reúso	8
C3	Agua almacenada para reúso	5
C6	Agua almacenada para reúso	8
C7	Agua almacenada para reúso	5
C10	Agua almacenada para reúso	8
C11	Agua almacenada para reúso	8
C12	Agua almacenada para reúso	7
Total de muestras		127

Métodos experimentales

Las muestras de agua se procesaron en el Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Ecología, UNAM.

Antes de procesar las muestras se midieron parámetros fisicoquímicos mediante una sonda multiparámetros (YSI 6600-M). Los parámetros registrados fueron temperatura (°C), pH, conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), sólidos disueltos totales (SDT) (mg/L) y oxígeno disuelto (mg/L).

Detección de coliformes fecales y enterococos fecales por el método de filtración a través de membrana en muestras de agua

Dentro de las 12 horas posteriores al muestreo se realizó la detección de coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF) de las muestras sin concentrar.

La filtración a través de membrana es una técnica diseñada para el cultivo de organismos coliformes, basada en el método estándar de la *American Public Health Association* (APHA, 2005). Mediante esta técnica, una alícuota de cada muestra por triplicado fue filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore) con tamaño de poro de 0.45 μm para retener a las bacterias, colocándola posteriormente en una caja Petri con medio de cultivo selectivo sólido. Para ello, en condiciones estériles se montó un dispositivo conectado al vacío. El medio de cultivo utilizado para CF fue mFC agar (Difco) y para EF fue KF Streptococos agar (Difco). La preparación de cada medio de cultivo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las cajas sembradas se incubaron invertidas a 44.5°C durante 24 horas para coliformes y a 37°C durante 48 horas para enterococos, para cuenta en placa (APHA, 2005).

Posteriormente a partir del número de colonias contadas en las membranas se expresaron los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en 100 mL, de acuerdo con la siguiente fórmula (APHA, 2005):

$$\text{UFC}/100 \text{ mL} = \frac{\text{colonias contadas}}{\text{mL de muestra filtrados}} \times 100$$

Para las muestras de las PTAR y de cisternas se realizaron diluciones seriadas con un factor de 10, ya que las muestras tenían un alto contenido de materia orgánica. Las diluciones sembradas para las PTAR fueron desde 10^{-2} hasta 10^{-5} mientras que para cisternas fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-2} .

Las diluciones se realizaron con la solución amortiguadora de fosfatos (PBS), misma que se preparó siguiendo las indicaciones del manual *Water Microbiology. Laboratory and field procedures* (Millipore, 1986).

Recuperación de colifagos mediante ultrafiltración

Para la recuperación de colifagos (BF), las muestras de agua de los pozos de extracción de agua subterránea (100 L) y de las cisternas (1 L) se concentraron por medio de ultrafiltración, mientras que las muestras de agua de las PTAR no fueron concentradas debido a su alto contenido de materia orgánica.

La técnica se basa en la circulación de la muestra de agua en un ultrafiltro de diálisis de polisulfona Hemoflow F80A (Fresenius Medical Care), mediante el uso de una bomba peristáltica (Masterflex, Cole Parmer) hasta lograr el factor de concentración deseado. El ultrafiltro presenta fibras huecas con un intervalo de peso molecular de aproximadamente 30,000 Daltones, un área de 1.8 m² y un diámetro interno de la fibra de 200 µm (Polaczyk *et al.*, 2008).

El ultrafiltro fue pretratado (bloqueado) al recircular una solución de polifosfato de sodio al 0.1% durante 30 min, con el fin de evitar que los virus quedaran adheridos al filtro. Tanto los microorganismos como el polifosfato de sodio están cargados negativamente, por lo tanto se genera una repulsión de cargas entre la superficie de las fibras del ultrafiltro y los microorganismos, minimizando así la adhesión de los microorganismos al ultrafiltro (Polaczyk *et al.*, 2008). Al actuar también como desagregante entre los mismos microorganismos, se agregó 1 g/L de polifosfato de sodio a la muestra, de tal manera que sí los microorganismos formaban agregados, estos se dispersaran en la muestra (Polaczyk *et al.*, 2008).

Posterior al bloqueo se procedió a concentrar la muestra, circulando la muestra con una velocidad de flujo de 1700 mL/min y una presión de 15 a 20 psi, hasta llegar a un volumen de 100 mL aproximadamente. También se realizó un retrolavado con el objetivo de expulsar los sólidos y materia orgánica que pudieran permanecer depositados en el filtro, para lo cual se circuló la muestra en sentido contrario al de la operación regular del filtro. Los recuperados se almacenaron en tubos tipo Falcon de 50 mL (Axigen) y se conservaron a 4°C hasta su análisis posterior.

Para reutilizar el ultrafiltro se circuló una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 30 min, para desinfectar el cartucho que fue sometido a la circulación de una muestra potencialmente contaminada, consecutivamente se inactivó el hipoclorito de sodio presente en el ultrafiltro con una solución circulante de tiosulfato de sodio al 0.1% durante 30 min (Hill *et al.*, 2005).

Para confirmar que el hipoclorito de sodio fue inactivado de forma efectiva se realizó la determinación de cloro residual utilizando un espectrofotómetro (Hach DR/2400) con el método Chlorine Free Method 80 previamente calibrado (Hach, 2002).

Detección de colifagos por la técnica de doble capa de agar en muestras de agua

El procedimiento de doble capa de agar se realizó con base en la técnica International Standard ISO 10705-1:1995. Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages, utilizando a *E. coli* K12-Hfr 3000 (ATCC 23631) como bacteria hospedera (ISO, 1995).

Se utilizaron tres fases (líquido, semisólido y sólido) de un medio de cultivo basal TGYB que se compone de tripticasa peptona (BBL), extracto de levadura (Sigma), cloruro de sodio (Baker), y agar (Bioxon) para los medios semisólido (7 g/L) y sólido (14 g/L). Los tres medios se complementaron con una solución de calcio-glucosa (Baker) (1 mL/100 mL).

Se propagó la bacteria hospedera (0.5 mL) durante 18 horas a 37°C en un volumen de 50 mL de medio líquido TGYB.

Para el ensayo en placa, 0.5 mL de las muestras concentradas y 0.5 mL del cultivo de la bacteria hospedera en fase de crecimiento exponencial se vaciaron en 5 mL de medio semisólido TGYB, posteriormente la mezcla se añadió a cajas Petri que contenían medio de cultivo sólido TGYB.

Una vez solidificadas, las cajas se incubaron invertidas durante 18 horas a 37°C y se realizó el conteo de las zonas de lisis formadas, reportándose como Unidades Formadoras de Placas (UFP) por mililitro, utilizando la siguiente fórmula (ISO, 1995):

$$\text{UFP/ mL} = \frac{\text{placas contadas}}{\text{dilución * volumen de muestra}} \times 100$$

Análisis de datos

Para establecer si existe una relación entre BF y las bacterias CF y EF se utilizó el modelo de regresión logística, por medio del paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows 10.0.1; 1999 (Mandilara *et al.*, 2006). Las variables tanto dependiente (BF) como independiente (CF-EF) fueron tratadas como variables dicotómicas, en la matriz de datos se asignó un 0 cuando las variables no fueron detectadas (ausencia) y un 1 cuando estuvieron presentes (presencia). Primero se realizó un análisis incluyendo los valores obtenidos de presencia-ausencia de las tres temporadas y de los diferentes tipos de agua, posteriormente se realizó un análisis para cada tipo de agua. La determinación de la relación entre las variables se realizó mediante la prueba de Wald, en la que se contrasta la hipótesis de que la variable independiente es diferente de 0, y es utilizada para comparar variables dicotómicas (Chitarroni, 2002).

Células y virus

El trabajo relacionado con cultivo e infección celular se realizó en el Laboratorio de Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva.

Las células MA104 (células epiteliales de riñón de mono rhesus) que se utilizaron para evaluar la infectividad de rotavirus, fueron donadas por el Dr. Carlos F. Arias Ortiz del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las células fueron cultivadas en DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cansera) a 37°C y 5% CO₂.

Rotavirus de simio SA11 (ATCC VR-1565) fue utilizado por su estrecha similitud con los rotavirus humanos, en cuanto morfología y propiedades

antigénicas se refiere (Badawy *et al.*,1985). Para su propagación, el virus fue activado con tripsina (3 µg/mL) durante 45 min a 37°C, 5% CO₂ y se inocularon en células MA104. Después de una hora de adsorción a 37°C y 5% CO₂ y sin retirar el inóculo se agregó a las cajas infectadas DMEM sin suplementar, mientras que el control fue tratado con tripsina 0.5 µg/mL (Huang *et al.*, 1992). Cuando en las células infectadas se observó el efecto citopático (ECP) reportado por ATCC (desprendimiento y lisis celular), alrededor de las 18-20 horas se recuperaron los virus producidos por congelación-descongelación dos veces y el lisado se almacenó a -70°C hasta su uso posterior (Huang *et al.*, 1992). Los virus se titularon por el método TCID₅₀ como posteriormente se describe. Este lisado será mencionado en el resto del documento como control positivo.

Recuperación de rotavirus de la superficie de lechugas

Se prepararon por triplicado muestras de 5 g de lechuga (adquiridas en Tienda UNAM) y se colocaron dentro de bolsas de polipropileno. Posteriormente, en condiciones asépticas se inocularon las superficies vegetales, 10 puntos distribuidos al azar de 10 µL del control positivo previamente titulado (1x10⁶ TCID₅₀/mL). Para promover la adsorción de rotavirus en la superficie vegetal, se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Paralelamente se ensayaron controles negativos que fueron inoculados con PBS 1X (estéril), 10 puntos distribuidos al azar de 10 µL cada uno, los cuales se referirán como controles de la línea base.

Una vez concluido el tiempo de adsorción las bolsas se sellaron con calor y se mantuvieron a temperatura ambiente y fotoperiodo natural durante siete días.

Cada 24 horas se retiró una muestra (por triplicado). A los días cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis y siete se procesaron las muestras correspondientes.

El tratamiento de las muestras consistió en una serie de lavados con una solución de PBS 1X + 1M NaCl. Cada muestra vegetal se lavó con 50 mL de la solución con agitación suave durante 30 min.

Posteriormente la solución obtenida se filtró en una membrana de poliestireno de poro 0.22 µm (Stericup Millipore) con el fin de retener bacterias, de eliminar los restos de material vegetal y se recuperó el filtrado. Enseguida el filtrado se

concentró a 1 mL por filtración-centrifugación utilizando tubos Amicon-Ultra 15 (Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El concentrado se almacenó a -70°C hasta su análisis posterior mediante cultivo celular. Los concentrados se denominarán en el texto muestras recuperadas.

Paralelamente se mantuvo el control positivo a temperatura ambiente y fotoperiodo natural durante siete días en un tubo eppendorf de 1.5 mL, y transcurrido el tiempo se analizó mediante cultivo celular. A este control se hará referencia posteriormente como control positivo al día siete.

Determinación de infectividad de rotavirus mediante cultivo celular

Se infectaron placas de 96 pozos con células MA104 confluentes, para ello se agregaron 100 µL/pozo del control positivo, de las muestras control, de las muestras recuperadas y del control positivo al día siete. Las muestras y controles también se pretrataron con tripsina como se describe arriba.

Después de una hora de adsorción con agitación suave a 37°C, 5% CO₂ y sin retirar el inóculo, las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C, 5% CO₂.

Después de la infección se fijaron las células con 50 µL/pozo de metanol frío durante 5 min. Se retiró por decantación y se tiñó cada placa con cristal violeta al 0.1% en 20% de etanol durante 20 min y se realizaron lavados con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante. Las células no viables no incorporan el colorante en sus membranas y por lo tanto no se tiñen. Las células se observaron al microscopio invertido (Nikon) para observar el ECP producido y se titularon por el método de TCID₅₀ con la fórmula Reed-Muench (Payment *et al.*, 1993).

$ \text{TCID}_{50} = \text{Dilución donde el efecto citopático es mayor al 50\%} + \frac{\% \text{ positivo arriba del 50\%} - \% \text{ positivo debajo del 50\%}}{\% \text{ positivo arriba del 50\%} - \% \text{ positivo debajo del 50\%}} \times \log_{10} 10 $
--

Posteriormente se agregaron 50 μ L/pozo de ácido acético al 10% para extraer el colorante de las células teñidas y sin decantar las placas se llevaron a un espectrofotómetro para placas Thermo Electron, el cristal violeta liberado se leyó a 620 nm, con el fin de realizar una determinación colorimétrica de las células teñidas y en consecuencia viables (Chiba *et al.*, 1997). Los datos obtenidos se transformaron a porcentajes y se expresaron como porcentaje de viabilidad.

Detección de rotavirus por RT-PCR de punto final

La extracción de RNA de las muestras se realizó utilizando el método de Trizol-cloroformo (Invitrogen). Para ello una alícuota de 500 μ L de cada muestra y 500 μ L de Trizol se agregaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, dejándose incubar en hielo durante 10 min. Posteriormente se agregaron 250 μ L de cloroformo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL que previamente contenía 500 μ L de isopropanol frío y se dejó precipitar a -70°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min dos veces. Se desechó el etanol por decantación y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 20 min. El RNA se resuspendió en 20 μ L de agua DPEC y se almacenó a -70°C hasta su posterior análisis.

Previo a la reacción de RT-PCR, se cuantificó la concentración de RNA en un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific). Consecutivamente se desnaturalizó el RNA a 99°C durante 5 min en un termomezclador (Eppendorf).

Para la reacción de transcripción reversa y la amplificación, se utilizó el kit RT-PCR One-Step (Qiagen). Se trabajó con un volumen final de reacción de 25 μ L, para ello se agregaron 5 μ L de RT-PCR buffer 5x, 1 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de enzima RT-PCR, 0.5 μ L de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen), 1.5 μ L de cada primer, VP6-3 (5'-GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAC-3'), VP6-4 (5'-GGTAAATTACCAATTCCTCCAG-3') en una concentración de 0.49 nM y

0.387 nM respectivamente, 9.5 μ L de agua libre de RNAsas y 5 μ L de RNA desnaturalizado.

Se utilizó el par de primers que reporta Villena *et al.*, 2003 y que amplifican en la región que codifica para la proteína VP6 (Figura 2), para obtener un fragmento de 186 pb. Las condiciones de la transcripción reversa y amplificación, igualmente se modificaron de Villena *et al.*, 2003, siendo distintas las concentraciones de primers, el volumen de la reacción final y la reacción de RT-PCR se realizó en un solo paso. Las condiciones fueron: 50°C 2 min; 50°C 30 min; 95°C 15 min; 95°C 9 min; 40 ciclos de 94°C 1 min; 50°C 1 min; 72°C 1 min y una extensión final de 72°C 10 min.

Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 2% y 100 V, teñidos con bromuro de etidio al 0.01% (Research Organics) durante 10 min y observados en un transluminador UV (UVP).

Capítulo 4. Resultados

Determinación de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua

En la Tabla 3 se muestran por cada temporada los promedios registrados de los parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua.

Durante el año de muestreo el pH se registró en un intervalo de 5.7 a 9.3. Los SDT y la conductividad presentaron un similar comportamiento, al ser mayores en agua residual y residual tratada, a comparación del agua subterránea. El oxígeno disuelto se registró en un intervalo de 0.8-8.9 mg/L. La temperatura se registró en un intervalo de 15-25°C.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos medidos en los cuatro tipos durante las tres temporadas de muestreo en Ciudad Universitaria.

Temporada	Sitio	pH	SDT (mg/L)	Conductividad (μ S/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Cálida-Seca	PQ	6.6	248.5	445	5.2	18.9
	PM	7	212.3	384.3	5.8	20.7
	PV	6.6	207	366	5.9	17.4
	PTICA	7.4	407.7	783.3	1.5	25
	PTECA	7.2	422	812.5	1.6	25
	PTICP	7.3	1042	1632.7	0.8	25
	PTECP	7.4	758	1220.7	2.5	21.8
	C1	7.3	632.7	810.3	1.6	21
	C2	7.6	535.7	1006.7	2.2	21.2
	C3	8	529.7	1005	1.9	21.3
	C6	7.6	512.3	981.7	3.4	21.7
	C7	7.1	520.3	1004	2	22.1
Cálida-Lluvias	C10	8	212.7	411.3	5.5	21.8
	C11	8	202.7	388	7.7	21.3
	C12	7.4	522	1017.7	1.3	23.1
	PQ	7.5	221	317.9	8.1	20
	PM	7.5	239.8	354.6	7.7	18.7
	PV	7.4	180.5	243.5	7.6	18.8
	PTICP	8.3	693.6	723.8	5.6	18.9
	PTECP	7.9	389.1	664.3	7.1	19.3
	C1	8	423	710	7.7	21.1
	C2	7.6	463.7	785	6.4	22.1
	C3	7.9	438.7	752	5.3	21.7
	C6	8	545.3	785	7	16.2
C7	8.2	219.5	299.5	6.9	18.4	
C10	8	218.7	339.3	7.1	18.8	
C11	9.3	136.7	216.7	8.2	18.6	
C12	7.8	569	585.3	7.6	20.8	
Fría-Seca	PQ	6.8	243.3	312.8	8.5	15.1
	PM	5.7	183	245	7.1	18.1
	PV	6.9	260.3	342.5	7.6	17.2
	PTICP	7.5	607.6	796.6	5.6	17.5
	PTECP	6.5	539.2	709.2	5.1	17.4
	C1	7.2	377	491	6.3	17.2
	C2	6.5	284	384.5	7.8	18.7
	C6	6.6	242.5	260.5	8.6	18.1
	C10	6.8	277.5	368.5	8.7	17.7
	C11	6.5	265	354.5	8.9	19.6
	C12	6.8	321	449	7.4	20.4

Detección de coliformes, enterococos y colifagos

Se presentan de manera descriptiva y para cada temporada, los conteos bacterianos (UFC/100 mL), así como los títulos virales (UFP/mL) para el agua subterránea, agua residual, residual tratada y agua almacenada para reúso durante las tres temporadas.

Temporada cálida-seca

En la Figura 5 se presentan los conteos bacterianos y los títulos virales obtenidos en los diferentes tipos de agua, en esta temporada se muestrearon las dos plantas de tratamiento PTCA y PTCP.

En las muestras de agua subterránea se detectaron bajos conteos de bacterias y de virus, EF (1.2×10^0 UFC/100 mL) y BF (5.4×10^0 UFP/mL). En PTICA se registró un conteo de CF de 9.6×10^1 UFC/100 mL y en PTECA no hubo detección de bacterias. EF en PTICA presentaron un conteo de 6.5×10^5 UFC/100 mL, mientras que en PTECA disminuyeron a 9.7×10^3 UFC/100 mL. Para BF en PTICA se registró un conteo de 6.7×10^2 UFP/mL y en PTECA se registró un conteo de 3.2×10^2 UFP/mL. Por su parte, en PTICP el conteo de CF fue de 2.7×10^3 UFC/100 mL y en PTECP el conteo disminuyó a 3.3×10^0 UFC/100 mL. En PTICP EF tuvieron un conteo 3.9×10^5 UFC/100 mL y en PTECP el conteo fue de 4.9×10^4 UFC/100 mL. Los BF presentaron un conteo en PTICP de 1.1×10^3 UFP/mL y en PTECP de 2.6×10^2 UFP/mL. En el agua de reúso almacenada (cisternas) no se detectaron CF; se cuantificaron 3.9×10^2 UFC/100 mL de EF. Mientras que se registraron BF con un conteo de 8.5×10^1 UFP/mL.

Temporada cálida-seca

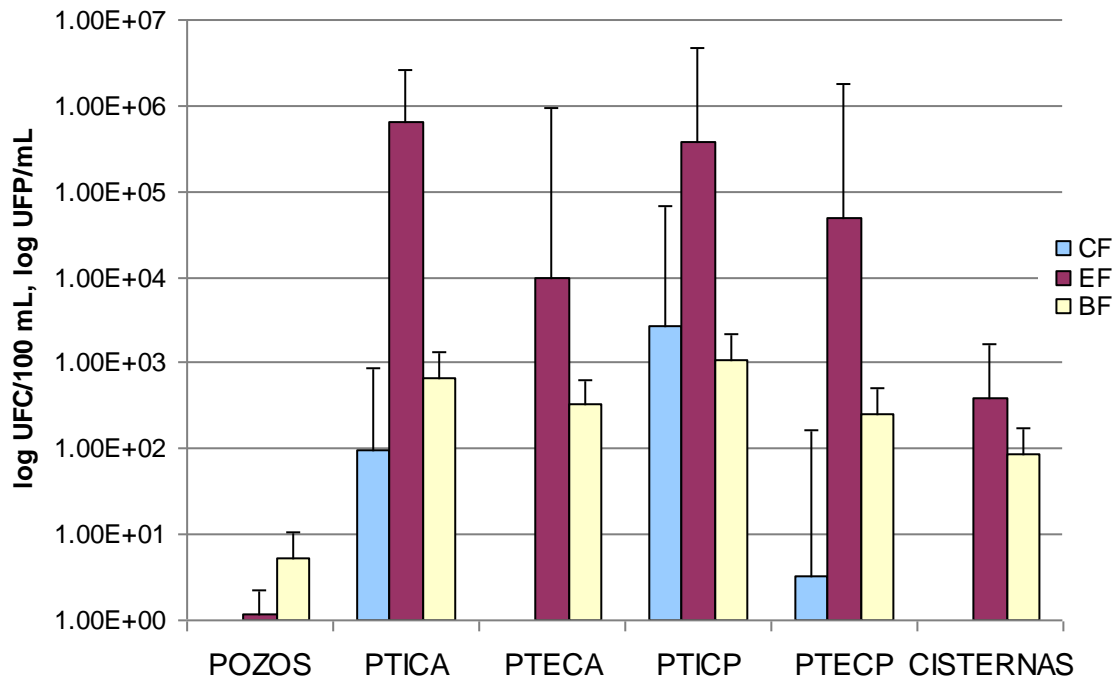


Figura 5. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada CS.

Temporada cálida-lluvias

En la Figura 6 se presentan los conteos bacterianos y los títulos virales obtenidos en los diferentes tipos de agua. A partir de esta temporada se muestreó únicamente la PTICP ya que la PTCA dejó de operar para ser remodelada.

En las muestras de agua subterránea se detectaron conteos bajos de EF (1.3×10^0 UFC/100 mL) y de BF (2.2×10^0 UFP/mL). En PTICP el conteo de CF fue de 1×10^2 UFC/100 mL y en PTECP el conteo disminuyó a 3×10^0 UFC/100 mL. En PTICP EF tuvieron un conteo 5×10^4 UFC/100 mL y en PTECP el conteo fue de 6.1×10^4 UFC/100 mL. Los BF presentaron un conteo en PTICP de 1.6×10^3 UFP/mL y en PTECP de 1.5×10^2 UFP/mL. En el agua de reúso almacenada no se detectaron CF; se cuantificaron 8.6×10^0 UFC/100 mL de EF. Mientras que BF se registraron con un conteo de 6.4×10^0 UFP/mL.

Temporada cálida-lluvias

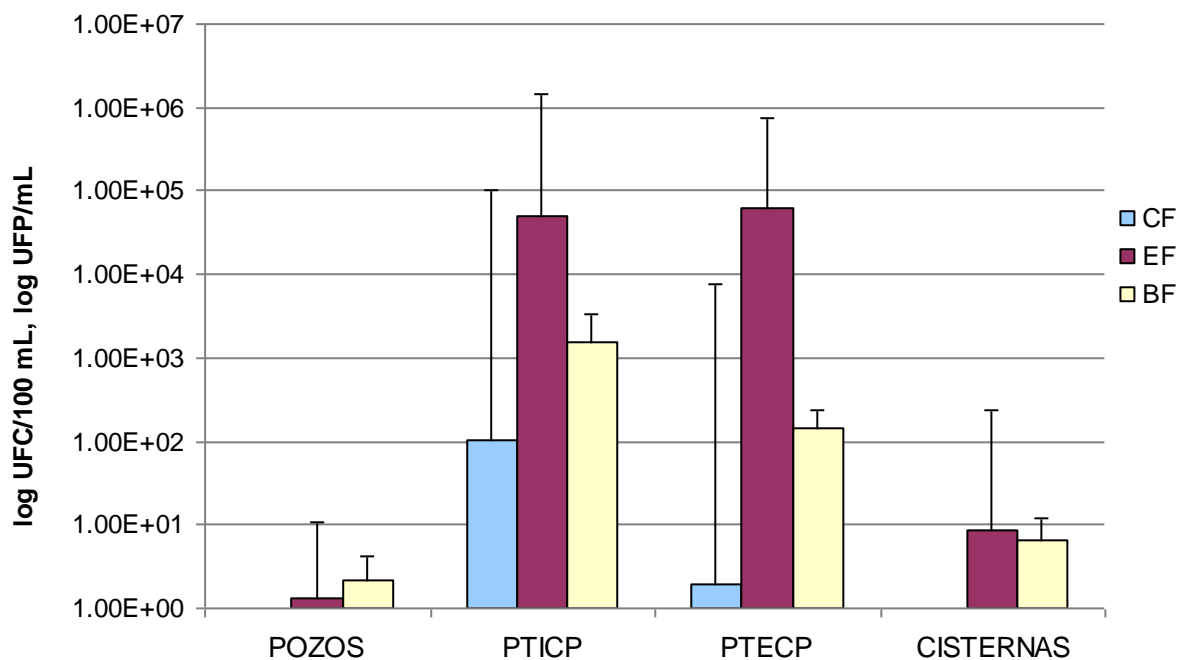


Figura 6. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada CL.

Temporada fría-seca

En la Figura 7 se presentan los conteos bacterianos y los títulos virales obtenidos en los diferentes tipos de agua. Únicamente se muestreó la PTCP.

Al igual que en las temporadas anteriores se registraron bajos conteos en las muestras de agua subterránea, teniendo EF (1.3×10^0 UFC/100 mL) y BF (1.7×10^0 UFP/mL). En PTICP el conteo de CF fue de 4×10^1 UFC/100 mL y en PTECP el conteo fue de 1.3×10^1 UFC/100 mL.

En PTICP EF tuvieron un conteo 6×10^6 UFC/100 mL y en PTECP el conteo fue de 2.9×10^5 UFC/100 mL. Los BF presentaron un conteo en PTICP de 2.3×10^2 UFP/mL y en PTECP de 1.4×10^2 UFP/mL. En el agua de reúso almacenada no se detectaron CF; se cuantificaron 1.4×10^0 UFC/100 mL de EF. Mientras que se registró un conteo de BF de 2.9×10^1 UFP/mL.

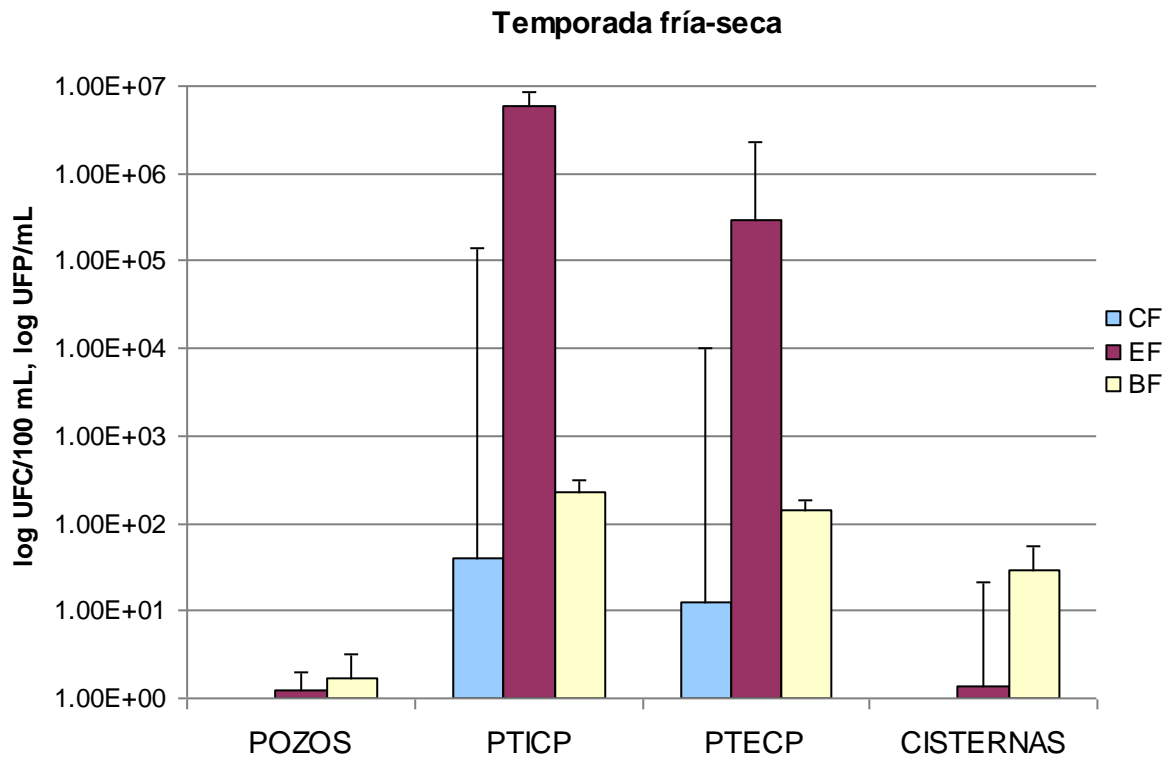


Figura 7. CF, EF (UFC/100 mL) y BF (UFP/mL) detectados en los diferentes tipos de agua durante la temporada FS.

Análisis de datos

En el análisis en donde se incluyeron los datos de todos los tipos de agua se demostró que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables ($p=0.002$, a un nivel de confianza del 95%), lo que indica que la presencia de BF está relacionada con CF-EF. No obstante, en el análisis desglosado por tipo de agua se demuestra que no existe una relación estadísticamente significativa entre BF y CF-EF ($p>0.005$, a un nivel de confianza del 95%). Los valores de p obtenidos para la comparación entre las variables se muestran en la Tabla 4 y las tablas de presencia-ausencia obtenidas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 4. Valor de p para la comparación entre BF y CF-BF.

Relación CF-EF	Prueba de Wald	Grados de libertad	Valor de p
Todos los tipos de agua	9.830	1	0.002
Agua subterránea	0.000	1	0.983
Agua almacenada	0.031	1	0.860

Tabla 5. Tablas de presencia (+) - ausencia(-) de CF-EF y BF.

	CF-EF			
	BF	+	-	Total
Todos los tipos de agua	+	59	32	91
	-	12	24	36
	Total	71	56	127
Agua subterránea	+	3	8	11
	-	7	19	26
	Total	10	27	37
Agua almacenada	+	26	23	49
	-	5	5	10
	Total	31	28	59
Agua residual y residual tratada	+	30	1	31
	-	0	0	0
	Total	30	1	31

Determinación de infectividad de rotavirus en cultivo celular

Dado que los BF se registraron en todos los tipos de agua muestreados, se puede suponer que el agua residual también contiene virus entéricos, por lo tanto se realizaron los ensayos de infectividad viral, con lo que se obtuvo información sobre la dinámica de inactivación de rotavirus sobre superficies vegetales.

En los experimentos que se realizaron se plantearon tres escenarios posibles al infectar las células: i) ausencia de ECP, debido a que en el proceso de recuperación se pueden perder las partículas de rotavirus; ii) ECP aumentado, debido a la suma de la cantidad que se inoculó del virus (1×10^6 TCID₅₀/mL), más una posible carga viral extra proveniente de la lechuga antes de su inoculación y; iii) presencia de ECP con un título calculado igual o menor al conocido, lo que nos hablaría que el proceso de recuperación fue eficaz para obtener las partículas de rotavirus. En este caso se presentó el segundo escenario.

Las superficies vegetales inoculadas se mantuvieron durante siete días a una temperatura ambiente promedio de 22°C. Todas las muestras recuperadas, el control positivo y el control positivo al día siete fueron capaces de infectar a las células MA104, mientras que los controles de la línea base fueron negativos, a excepción de la muestra control del día cero que presentó un título de 1×10^2 TCID₅₀/mL. En la Figura 8 se muestran las células MA104 sin infectar y por otro lado, el efecto que rotavirus produce en las células.

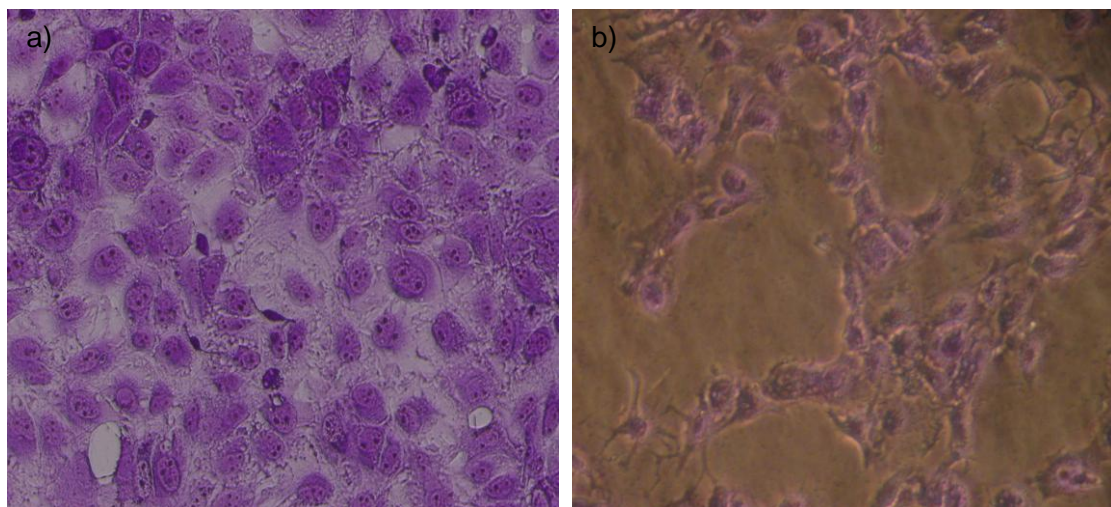


Figura 8. ECP de rotavirus en células MA104 teñidas a las 48 hrs con cristal violeta. a) Células MA104 confluentes sin infectar. b) ECP.

Reducción de la infectividad de rotavirus SA11

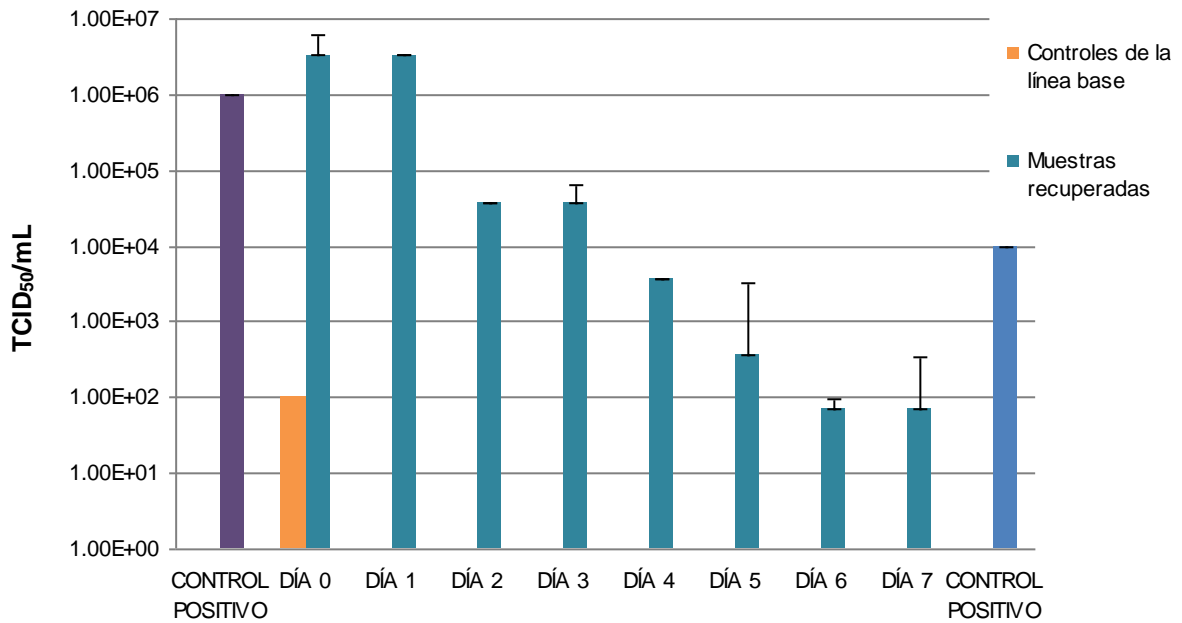


Figura 9. Reducción de la infectividad de rotavirus SA11 sobre las superficies vegetales.

En la Figura 9 se resumen los títulos virales calculados a partir de la infección de células MA104. Se distingue una reducción de los títulos al paso de los días. Las muestras recuperadas presentan una disminución de cuatro unidades logarítmicas, mientras que el control positivo con respecto del control positivo al día siete presentó una reducción de dos unidades logarítmicas. Los títulos calculados para las muestras recuperadas correspondientes al día cero y uno fueron mayores con respecto al control positivo, indicando un aumento del título viral por una posible carga previa. En la Tabla 6 se presentan los títulos calculados para las muestras que causaron ECP en la línea celular MA104.

Tabla 6. Cinética de recuperación de rotavirus SA11 en lechugas inoculadas. Titulación por TCID₅₀/mL en células MA104.

Muestra	Título TCID ₅₀ /mL
Control positivo	1x10 ⁶
Control de la línea base día cero	1x10 ²
Recuperación día cero	3.33x10 ⁶
Recuperación día uno	3.33x10 ⁶
Recuperación día dos	3.67x10 ⁴
Recuperación día tres	3.7x10 ⁴
Recuperación día cuatro	3.7x10 ³
Recuperación día cinco	3.7x10 ²
Recuperación día seis	7x10 ¹
Recuperación día siete	7x10 ¹
Control positivo al día siete	1x10 ⁴
En los controles de la línea base no se observó ECP.	

Viabilidad post-infección de la línea celular MA104

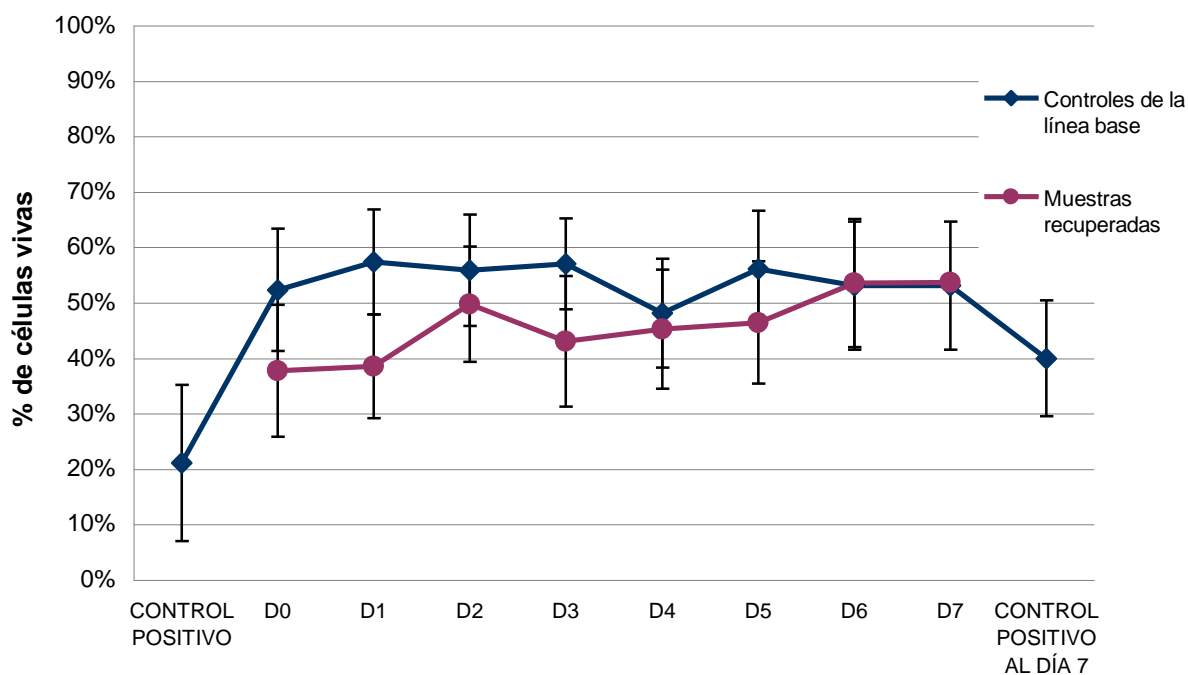


Figura 10. Porcentaje de células no infectadas por rotavirus, 48 horas post-infección. Datos transformados a partir de la lectura de la liberación de cristal violeta a 620 nm.

En la Figura 10 se indican los porcentajes obtenidos a partir de la liberación del cristal violeta a 620 nm. Se refleja una relación inversamente proporcional entre las células viables y su infección, entre menor es el porcentaje de células viables mayor fue el número de células infectadas y viceversa. Los controles de la línea base mantienen un porcentaje de células viables de aproximadamente el 60%, lo cual significa que alrededor del 40% de las células murieron por causas externas a la infección producida por rotavirus, tales como la falta de suero, el cual proporciona al medio un amplia gama de componentes que participan en procesos tales como proliferación y reparación de tejidos, así como maduración y diferenciación celular (Bruner *et al.*, 2010).

Para el control positivo el porcentaje de células viables fue del 20% y para el control positivo al día siete el porcentaje de células viables fue del 40%.

Las muestras recuperadas presentaron un porcentaje de células viables del 37%, 39%, 50%, 43%, 45%, 46%, 53% y 53% para los días cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis y siete respectivamente. En este caso la porción de células no viables se atribuye al efecto producido por rotavirus.

Detección de rotavirus por RT-PCR de punto final

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones promedio de RNA de las muestras que fueron positivas a RT-PCR. En la Figura 11 se muestra la amplificación de las muestras en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 7. Concentración de RNA y relación 260/280 de las muestras positivas a RT-PCR.

Muestra	Concentración de RNA (ng/μL)	Relación 260/280
Control positivo	37.8	1.4
Control de la línea base día cero	49.3	1.8
Día cero	60.4	1.7
Día uno	33.2	1.8
Día dos	19.0	1.6
Día tres	30.8	2.1
Día cinco	2.9	1.7
Día seis	2.1	3.7
Día siete	40.6	1.7
Control positivo al día siete	4.3	1.3

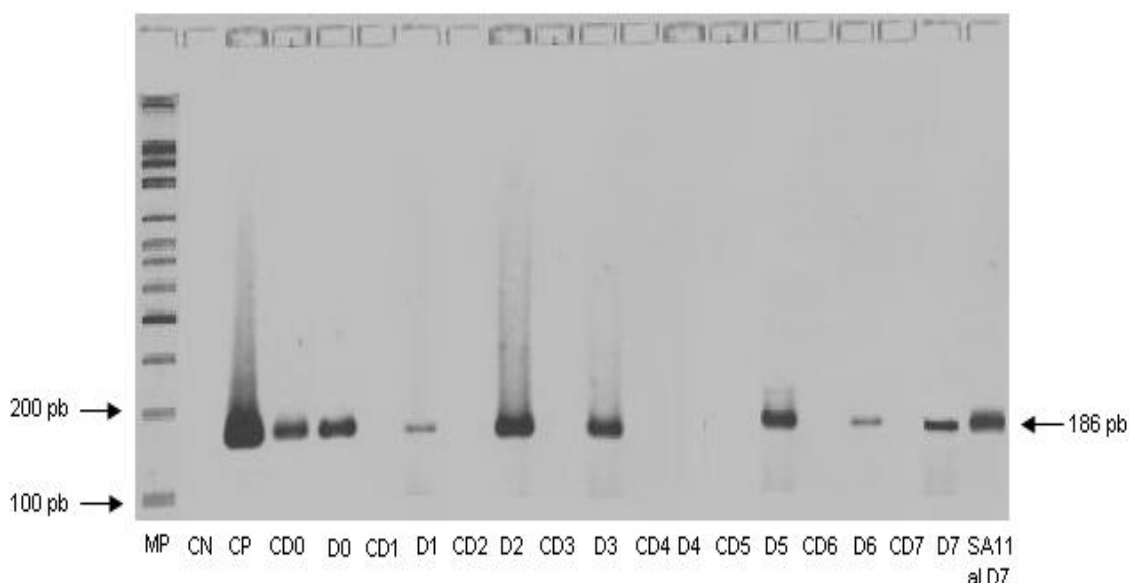


Figura 11. Amplificación mediante RT-PCR de muestras con ECP. Se utilizó un par de primers que hibridan en la región que codifica para la proteína VP6 de rotavirus. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. MP Marcador de peso molecular 100 pares de bases; CN Control negativo; CP Control positivo; CD Controles de la línea base de cada día; D Desde el día cero al día siete.

Se lograron amplificar las muestras que causaron efecto en la línea celular MA104, a excepción de la muestra D4. La concentración mínima de ácidos nucleicos que pudo ser amplificada fue de 2.1 ng/μL. El intervalo de concentraciones fue de 2.1 a 60.4 ng/μL. Los datos de la relación 260/280 (que indica la pureza de los ácidos nucleicos) fueron aceptables, ya que relaciones cercanas a 2.0 son óptimas (IBT, 2012).

Capítulo 5. Discusión

El presente estudio se llevó a cabo en Ciudad Universitaria y se realizó en tres temporadas durante las cuales se colectaron muestras de diferentes tipos de agua, determinándose parámetros fisicoquímicos, bacterias indicadoras de contaminación fecal y colifagos.

Parámetros fisicoquímicos

El pH se registró en un intervalo de 5.7 a 9.3. El pH es importante al influir en algunos fenómenos que ocurren en el agua, como la precipitación de sales en las redes de distribución (Barrenechea, 2004), lo que puede influir en la persistencia de los microorganismos detectados, ya que tienden a adherirse en superficies, y asimismo los nutrientes en un medio acuoso tienden a concentrarse cerca de una superficie sólida (Dune, 2002).

Se observaron tendencias por tipo de agua, tanto para los SDT como para la conductividad, al verse aumentados en el agua residual y residual tratada (321-1042 mg/L y 449-1632 μ S/cm respectivamente), mientras que en agua subterránea los registros fueron menores (137-284 mg/L y 217-384 μ S/cm respectivamente), lo que indica que a mayores concentraciones de sólidos disueltos en forma de iones, el agua presenta mayor grado de perturbación (Sandoval, 2008). Esto coincide con los conteos de los microorganismos evaluados, los cuales fueron más altos en agua residual que en agua subterránea. Los iones en el agua favorecen la persistencia de los microorganismos, al poder asociarse a la materia orgánica y formar agregados, lo que les confiere protección a condiciones adversas y asimismo la conservación de la infectividad, en particular los virus mantienen protegidos su cápside y su genoma. Incluso no podría descartarse la posibilidad que los iones confieran a los microorganismos la capacidad de transportarse al asociarse a los mismos (Bosch *et al.*, 2006).

El oxígeno disuelto tiene gran importancia en diferentes procesos como la respiración microbiana y en las reacciones acuosas de óxido-reducción (Wu, 2009). En general, en los diferentes tipos de agua se midieron concentraciones

de oxígeno disuelto de 0.8-8.9 mg/L. Esta fuente de nutrientes, puede ser un aporte de materia orgánica que soporte la sobrevivencia de las bacterias.

Finalmente, la temperatura alcanzó mayores registros en la temporada CS (17-25°C), seguido de la temporada CL (16-23°C) y en FS se registraron las menores temperaturas en un intervalo de 15-20°C, estas diferencias probablemente pueden explicar el comportamiento de los microorganismos detectados, lo cual se discute a continuación.

Detección de coliformes, enterococos y colifagos

En agua subterránea durante las tres temporadas surgió un mismo evento, solamente se detectaron EF y BF, esta situación resulta no ser alarmante puesto que las cuantificaciones fueron reducidas (1.2×10^0 - 1.3×10^0 UFC/100 mL para EF y 1.7×10^0 - 5.4×10^0 UFP/mL para BF) y las muestras se colectaron antes de cloración; sí el sistema de cloración opera adecuadamente los microorganismos detectados y cuantificados pueden ser controlados al inactivarse (Gerba, 2009; PUMAGUA, 2011).

En agua residual y residual tratada durante la temporada CS los conteos de CF fueron más altos con respecto a las otras dos temporadas, incluso en esta temporada se registró la temperatura promedio más alta en el año de muestreo (24.2°C). Este comportamiento puede estar relacionado con la tolerancia de las bacterias a la temperatura del agua, lo cual incluso podría favorecer su multiplicación (Toranzos *et al.*, 2007).

En la temporada CL se presentó una temperatura promedio de 19.1°C. El conteo para ambas bacterias en el agua residual y residual tratada fue menor que en las otras temporadas, lo que probablemente se deba a un efecto de dilución. Esto coincide con lo reportado en trabajos anteriores donde se observó una disminución en conteos bacterianos durante la estación de lluvias (Espinosa *et al.*, 2009).

Para el agua residual y residual tratada la menor temperatura promedio se registró durante la temporada FS (17.4°C), no obstante el conteo de BF no fue mayor durante esta temporada, a pesar que las bajas temperaturas favorecen la presencia de los virus (Espinosa *et al.*, 2009).

La falta de mantenimiento de las cisternas fue un problema evidente durante el año de muestreo, al mismo tiempo, el almacenaje de las cisternas fue alternada con agua subterránea y agua residual, exclusivamente la C12 se llenó constantemente con agua residual tratada proveniente de la PTCP, y las cisternas 10 y 11 se llenaron constantemente con agua subterránea (PUMAGUA, 2011). Este manejo pudo tener un efecto sobre la presencia de EF y BF en el agua almacenada, resaltando que el conteo de CF fue nulo. Incluso, no podrían descartarse los efectos que pudieran relacionarse con la falta de limpieza en las cisternas como es el recrecimiento bacteriano (Gleeson *et al.*, 1997), pues la mortalidad de las bacterias en el agua depende de diversos factores como la temperatura, la cantidad y el tipo de materia orgánica. Sí el agua contiene altas concentraciones de materia orgánica y altas temperaturas se favorece la presencia y actividad de los microorganismos (LeChevallier *et al.*, 1988).

En la temporada CL se detectó una reducción importante de los conteos bacterianos y títulos virales en las cisternas, es posible que durante esa temporada al tener un aporte de agua pluvial se presentara un efecto de dilución. Durante la temporada FS la reducción de conteos de EF se hizo más notable (1.4×10^0 UFC/100 mL), probablemente debido a que algunas de las cisternas se habían vaciado para el riego de áreas verdes (PUMAGUA, 2011).

En las tres temporadas la frecuencia de EF fue más alta que la de CF, además que estuvieron presentes en todos los tipos de agua. Lo que sugiere que pueden utilizarse como un indicador complementario a los coliformes. Toranzos y colaboradores (2007) mencionan que, los enterococos presentan ventajas con respecto a los coliformes, pues se asocian con heces fecales humanas y no se han encontrado en ambientes libres de contaminación fecal. Por lo tanto, resultan ser un mejor indicador de la calidad del agua, al asociar su presencia a un origen de contaminación humana.

Los BF también estuvieron presentes en todos los tipos de agua y aunque las unidades reportadas para bacterias y virus son distintas se puede observar que los BF presentan una frecuencia más alta en los diferentes tipos de agua. En las PTAR de Cerro del Agua y de Ciencias Políticas durante las tres temporadas, los conteos de BF fueron semejantes antes y después del tratamiento, en consecuencia, no se observó una disminución de los virus en el agua residual tratada; esto indica que los BF presentan mayor resistencia a los tratamientos de agua en comparación con las bacterias indicadoras evaluadas (CF y EF).

Con el análisis de datos, se pudo establecer con todos los tipos de agua que existe una relación estadísticamente significativa entre los colifagos y bacterias, esto concuerda con Mandilara y colaboradores (2006), quienes demostraron una relación entre ambos mediante el modelo de regresión logística.

Por otro lado, el análisis desglosado por tipo de agua mostró que no existe una relación significativa entre las variables, esto se puede deber a que en el modelo existen interferencias por el agua de tipo residual y residual tratada, es decir, la mayoría de casos positivos a la presencia de BF y CF-EF se presentaron en estos dos tipos de agua, en menor proporción en el agua de reúso almacenada y ocasionalmente en agua subterránea (Tabla 4), por lo tanto es importante considerar el tipo de agua al momento de realizar el análisis. Se confirmó que los BF están presentes en todos los tipos de agua, esto es interesante ya que estadísticamente se apoya la propuesta de utilizarlos como indicadores de calidad del agua, complementarios a bacterias e indicadores de virus entéricos, debido a que fueron más resistentes a los diferentes tratamientos y pueden encontrarse en el ambiente independientemente de las bacterias y del tipo de agua. Esto coincide con lo reportado en otros trabajos similares (Ballester *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2009; Fonseca, 2010; Santiago-Rodríguez *et al.*, 2010). Además que en algunos estudios se ha demostrado una estrecha relación entre los virus entéricos y colifagos (Ballester *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2009).

Otro aspecto que favorece el uso de los colifagos como indicadores es la factibilidad técnica y económica, ya que el método utilizado es sencillo, de bajo costo (aproximadamente \$200.00 MN/muestra) y su detección puede ser realizada por personal con entrenamiento en microbiología.

Infectividad de rotavirus y su detección por RT-PCR

Ciudad Universitaria es un sitio en el que se llevan a cabo diferentes actividades en las áreas verdes. De acuerdo con encuestas realizadas en PUMAGUA la mayoría de los usuarios de las áreas verdes permanecen en ellas más de una hora y tienen contacto directo con el pasto mientras realizan actividades tales como leer, descansar o comer, de manera que representan un riesgo a la salud. Se ha demostrado en estudios previos (Fonseca, 2010) y en el presente, que el agua residual aún después del tratamiento presenta bacterias indicadoras de contaminación fecal y colifagos indicadores de virus entéricos. De aquí surge la importancia de determinar experimentalmente el tiempo que pueden permanecer infectivos los virus sobre sustratos vegetales. Los datos que se generaron sobre la infectividad de rotavirus inoculados sobre la superficie de lechugas puede ser útil como un modelo que aporta información sobre la dinámica de inactivación de los virus entéricos sobre matrices vegetales.

El cultivo celular proporcionó información sobre la infectividad de rotavirus. En la infección de células MA104 se pudo observar que el ECP fue disminuyendo en un intervalo de siete días, en consecuencia, los rotavirus fueron perdiendo su capacidad infecciosa, probablemente debido a la pérdida de la capa externa del virus por factores ambientales como la radiación solar. Como ya se ha mencionado, la capa externa es equivalente a una partícula infecciosa (Figura 3) y se conforma por las proteínas estructurales VP4 y VP7, estas proteínas son esenciales para la entrada del virus a la célula hospedera (ICTV, 2005). También se ha reportado que los virus dejan de ser infecciosos cuando la cápside pierde su capacidad para proteger el RNA a partir de la degradación ambiental (Cliver, 2009).

Las muestras recuperadas presentaron una disminución de cuatro órdenes de magnitud después de siete días y la disminución del control positivo con respecto al control positivo al día siete fue de dos órdenes de magnitud. Lo que sugiere que el proceso de recuperación no fue del 100%, pues los controles no fueron sometidos a la recuperación de virus y su disminución fue menor al compararlos con las muestras recuperadas, debido a la filtración a través de la membrana de poliestireno de poro 0.22 μm (Stericup Millipore) que impidió recuperar el volumen inicial de 50 mL. A este paso se le atribuyó la pérdida de las partículas de rotavirus con respecto al control.

Asimismo, la determinación de la viabilidad de las células MA104 demostraron la pérdida de infectividad de rotavirus, al observar que para el control positivo el porcentaje de células viables fue del 20% y para el control positivo al día siete el porcentaje de células viables fue del 40%, es decir que su capacidad infectante fue mayor cuando los rotavirus presentaron un título más alto (Figura 10).

Por otro lado, la muestra control del día cero causó ECP y se confirmó mediante RT-PCR la amplificación de rotavirus en una muestra que no fue inoculada, además que los títulos calculados para las muestras recuperadas de los días uno y dos fueron más altos con respecto al control positivo, este escenario habla de una contaminación viral previa en el material vegetal.

La detección por RT-PCR de los rotavirus recuperados, fue una forma adecuada y rápida para verificar que el ECP observado en la línea celular MA104 fue causado por el rotavirus inoculado en la superficie de la lechuga. Aunque se observaron diferencias en el grosor de las bandas asociadas a diferentes cantidades de RNA extraído (2.1 a 60.4 ng/ μL), la amplificación del segmento de la región que codifica para VP6 (Figura 2) fue positiva para la mayoría de las muestras, lo que confirma que el daño celular se debió a la infección por rotavirus. Adicionalmente, los controles de la línea base que no causaron ECP tampoco se lograron amplificar por RT-PCR, sin embargo, la muestra correspondiente al control del día cero si causó ECP y también se amplificó, confirmando la carga viral de rotavirus que tenía la lechuga al

momento de su compra. La mayoría de las muestras recuperadas se lograron amplificar excepto la muestra correspondiente al día cuatro, no obstante si causó ECP. Esta situación se puede deber al efecto de algunos inhibidores o por la degradación de los ácidos nucleicos. Moreira (1998) reporta que polisacáridos, urea y ácidos húmicos no son removidos por completo de las muestras durante los procesos clásicos de extracción de ácidos nucleicos; esto se ha identificado en protocolos en los que se utilizan detergentes, proteasas y fenol-cloroformo. En este estudio la extracción se realizó con un método de fenol-cloroformo por lo que podría haberse dado en alguna medida la inhibición de la reacción de PCR.

Otro hecho que indica que el ECP fue causado por rotavirus, es la especificidad de SA11 con la línea celular MA104, esta línea celular solamente es susceptible a rotavirus de simio según lo reportado por ATCC.

Dos factores que deben considerarse en futuros estudios es la radiación solar, ya que Shidu y colaboradores (2008) demostraron su actividad de inactivación de microorganismos entéricos; y también aumentar el número de días de sobrevivencia de los virus sobre una superficie vegetal, ya que al séptimo día todavía ocurrió amplificación por RT-PCR.

En el presente estudio se ha demostrado por lo tanto, que rotavirus es un virus entérico resistente a las condiciones ambientales, permaneciendo sobre las superficies inertes durante al menos siete días, conservando su capacidad de ser una partícula infecciosa.

La importancia de este estudio radica en el hecho de que existen pocas investigaciones en donde la detección de virus se realice a través de técnicas moleculares y se complemente con la determinación de la viabilidad de los virus detectados. Dadas las condiciones de crisis del agua a nivel nacional y global, el reúso del agua es una situación de suma importancia que requiere del desarrollo de investigaciones y métodos que nos proporcionen elementos para reducir los riesgos para la salud a causa del consumo de alimentos que se producen con el agua de reúso.

Capítulo 6. Conclusiones

- La determinación de los parámetros fisicoquímicos permitió caracterizar los diferentes tipos de agua. Valores altos de SDT y de conductividad (1042 mg/L y 1632 μ S/cm respectivamente) coinciden con las cuantificaciones altas de los microorganismos evaluados.
- En el análisis de presencia de coliformes y enterococos fecales en los diferentes tipos de agua de Ciudad Universitaria, se encontraron a los enterococos fecales en todos los tipos de agua y en mayor frecuencia. De este modo, es necesario continuar con su monitoreo como indicador de contaminación fecal, complementario a la normatividad vigente.
- Los colifagos se detectaron con mayor frecuencia que las bacterias en las muestras de agua. En las plantas de tratamiento su eliminación no fue eficaz, de manera que se consideraron más resistentes a los diferentes tratamientos a los que se somete el agua residual. Con base en estas observaciones se puede confirmar que funcionan como un indicador fecal-viral de calidad del agua complementario a las bacterias coliformes.
- Se observó la reducción de rotavirus de cuatro unidades logarítmicas SA11 inoculados sobre la superficie de lechugas, sin embargo, permanecieron infecciosos durante el periodo de estudio, a temperatura ambiente y fotoperiodo natural.
- Se confirmó la presencia de rotavirus inoculados sobre las superficies vegetales mediante RT-PCR, incluso en muestras en las que no se inoculó el virus, en consecuencia la matriz vegetal con la que se llevó a cabo el presente estudio contenía una carga viral previa.

- Los resultados obtenidos mediante cultivo celular y la RT-PCR muestran que el uso de las mismas es útil para la detección de virus en superficies vegetales.
- El monitoreo de la calidad del agua y de los productos que con ella son regados son importantes para poder establecer planes para la prevención de riesgos a la salud humana y ambiental, por lo tanto es necesario el uso de técnicas factibles y de la inclusión de otros bioindicadores que arrojen mayor información sobre la calidad del agua.

Referencias

American Public Health Association (APHA), AWWA. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21^a edición. Centennial Edition. Washington D.C. pp. 9-63.

Anderson EJ, Weber SG. 2004. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infectious Diseases*. 4(2): 91-99.

Badawy AS, Gerba CP, Kelley LM. 1985. Survival of rotavirus SA-11 on vegetables. *Food Microbiology*. 2(3): 199-205.

Ballester NA, Fontaine JH, Margolin AB. 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health*. 3(1): 59-68.

Barrenechea MA. 2004. Capítulo 1. Aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua. En: Canépa de Vargas L, Maldonado YV, Barrenechea MA, Aurazo de Zumaeta M. *Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: teoría. Tomo I*. CEPIS. Lima. pp. 3-13.

Bidawid SJ, Farber M, Sattar SA. 2000. Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *Journal of Virological Methods*. 88(2): 175-185.

Bosch A, Pintó RM, Abad FX. 2006. Survival and transport of enteric viruses in the environment. Chapter 6. En: Goyal. *Viruses in foods*. Springer. New York, USA. pp. 151-187.

Bruner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. 2010. Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. *Altex*. 27(1): 53-62.

Castillo-Argüero S, Montes G, Romero MA, Martínez YO, Sánchez IG, Núñez O, Guadarrama P. 2004. Dinámica y conservación de la flora de matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. (D.F., México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 74: 51-75.

Cheong S, Lee C, Song SW, Choi WC, Lee CH, Kim SJ. 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and environmental microbiology*. 75(24): 7745-7751.

Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*. 12(3): 251-258.

Chitarroni H. *La regresión logística*. Instituto de Investigación en Ciencias Sociales. Buenos Aires, Argentina. pp. 1-8.

Cliver DO. 2009. Capsid and infectivity in virus detection. *Food Environmental Virology*. 1: 123-128.

Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*. 73(1): 29-34.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. México, D. F. 22 de noviembre de 2000.

DOF. 1998. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-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 de 1998.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*. 85: 79-87.

Dune WJ., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2): 155-66.

Escalante V, Cardoso L, Ramírez E, Modler G, Mantilla G, Montecillos J, Servín C, Villavencio F. 2003. El reúso del agua residual tratada en México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. *Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales*. 230-236.

Espinosa AC, Arias CF, Sánchez-Colón S, Mazari-Hiriart M. 2009. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environmental Health*. 8: 49.

Formiga-Cruz, M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Albiñana-Gimenez N, Allard A, Girones R. 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*. 125(2): 111-118.

Fonseca-Salazar MA. *Bacteriófagos como indicadores de la calidad del agua en Ciudad Universitaria*. 2010. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 54 p.

Gerba CP. 2009. Disinfection. Chapter 26. En: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. *Environmental Microbiology*. 2ª edición. Academic Press. China. pp. 540-551.

Gleeson C, Gray NF. 1997. The coliform index and water borne disease: problems of microbial drinking water assessment. E y FN Spon. Inglaterra. En: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. 2009. *Environmental Microbiology*. 2ª edición. Academic Press. China. pp. 485-499.

Guerrero CA, Calderón MN, Acosta O, Guzmán F. 2008. Interferencia de la infección por rotavirus mediante la inhibición de la actividad de la proteína disulfuro isomerasa (DPI) de la membrana celular de las líneas MA104 y Caco-2. *Revista Medicina*. 30(4): 231-258.

Grassi T, Bagordo F, Idolo A, Lugoli F, Gabutti G, De Donno A. 2010. Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. *Environmental Monitoring Assessment*. 164:199-205.

Hill VR, Polaczyk AL, Hahn D, Narayanan J, Cromeans TL, Roberts JM, Amburgey JE. 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied Environmental Microbiology*. 71(11): 6878-6884.

Hörman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, Von Bonsdorff C-H, Torvela N, Heikinheimo A, Hänninen ML. 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in Southwestern Finland, 2000-2001. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 87-95.

Hoshino Y, Kapikian AZ. 2000. Rotavirus serotypes: Classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 18: 5-14.

Huang JA, Nagesha HS, Snodgrass DR, Holmes IH. 1992. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(1): 85-92.

Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD. 2007. *Manual of Environmental Microbiology*. 3^a edición. American Society Microbiology Press. Washington D.C. pp. 249-260.

International Commite on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2005. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press. Hong Kong. pp. 484-496.

Isa P, Realpe M, Romero P, López S, Arias CF. 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*. 322(2): 370-381.

ISO 10705-1. 1995. Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.

Kinzelman J, Ng C, Jackson E, 4, Gradus S, Bagley R. 2003. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: Comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 92-96.

Kiulia NM, Netshikweta R, Page NA, Van Zyl WB, kiraithe MM, Nyachieo, Mwenda JM, Tayllor MB. 2010. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *Journal of Applied Microbiology*. 109(3): 818-828.

LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(3): 649-654.

Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*. 88(1): 5-21.

Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. 2009. *Environmental Microbiology*. 2^a edición. Academic Press. China. pp. 485-499.

Mandilara GD, Smeti EM, Mavridou AT, Lambiri MP, Vatopoulos AC, Rigas FP. 2006. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters*. 263(1): 119-126.

Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*. 140: 246-255.

Mazari-Hiriart M, Espinosa AC, Vidal LY, Hernández RA, Torres ED, Zamora CE. 2010. Visión integral sobre el agua y la salud. En: Jiménez B., Torregrosa ML, Aboites L. *El agua en México: Cauces y encauces*. Academia Mexicana de las Ciencias. México. pp. 291-315.

Moreira D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*. 26(13): 3309-3310.

Payment P, Trudel M, Alain R, Arella M, Belloncik S, Berthuaume L, Fafard A, Fossiez F, Hamelin C, Houde M, Jouvence P, Lecamte J, Lussier C, Simard C, Talbot P, Verbeek JA. 1993. *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp.32.

Polaczyk AL, Narayanan J, Cromeans TL, Hahn D, Roberts JM, Amburgey JE, Hill VR. 2008. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of Microbiological Methods*. 73(2): 92-99.

Pulido MA, Ávila de Navia SL, Torres ES, Prieto GA. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova- Publicación Científica*. 3(4): 69-79.

PUMAGUA Avances 2009. 2010. Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp.17-22.

PUMAGUA Informe de avances 2010. 2011. Instituto de Ingeniería UNAM. México D.F. pp. 29-42.

Reynolds KA. 2001. Introducción a las Enfermedades Microbianas Propagadas a Través del Agua. *Agua Latinoamérica*. 12(4): 38-39.

Rojas M, Ayala BC, López S. 2008. Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA. *Mensaje Bioquímico*. 32: 149-162.

Samaniego HM. *Clonación, sobreexpresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en Escherichia coli*. 2007. Tesis de doctorado. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí. pp.4-14.

Sandoval CJ. *Evaluación de la calidad del agua en los canales de Xochimilco para su recuperación ecológica*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 32-35.

Santiago-Rodríguez TM, Dávila C, González J, Bonilla N, Marcos P, Urdaneta M, Cadete M, Monteiro S, Santos R, Santo Domingo J, Toranzos GA. 2010. Characterization of Enterococcus faecalis-infecting phages (enterophages) as markers of human fecal pollution in recreational waters. *Water Research*. 44(16): 4716-4725.

Savichtcheva O, Okabe S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research*. 40(13): 2463-2476.

Shibata T, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Elmir S. 2004. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water Research*. 8(13): 3119-31.

Sidhu J, Hanna J, Toze SG. 2008. Survival of enteric microorganisms on grass surfaces irrigated with treated effluent. *Journal of Water and Health*. 6(2): 255-262.

Silva-Magaña. *Uso de indicadores virales para la evaluación de la calidad del agua en UNAM*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. En revisión.

Svraka S, Duizer E, Vennema H, De Bruin E, Veer B, Dorresteyn B, Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(5): 1389-1394.

Toranzos GA, McFeters GA, Borrego JJ, Savill M. 2007. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. En: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD. *Manual of Environmental Microbiology*. 3ª edición. American Society Mic Series Press. Washintong D.C. pp. 249-260.

Villa OJ. 2000. *Estudios preliminares para la localización de planta de tratamiento de aguas residuales en la zona de los GEOS en Ciudad Universitaria*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. pp. 14.

Villena C, El-Senousy WM, Abad X, Pintó RM, Bosch A. 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Applied and Enviromental Microbiology*. 69(7): 3919-3923.

Vizzi E. 2009. Rotavirus: consideraciones biológicas, epidemiológicas e inmunológicas de la infección en humanos. *Salus online*. 12(1): 14-31.

Wu ZY. 2009. *Calidad físico-química y bacteriológica del agua para consumo humano de la microcuenca de la quebrada Victoria, Curubandé, Guanacaste, Costa Rica, año hidrológico 2007-2008*. Tesis de Maestría. Universidad Estatal a Distancia Vicerrectoría Académica Escuela de Ciencias Exactas y Naturales. San José, Costa Rica. pp. 9-16.

Manuales

HACH. 2002. *DR/2004 Spectrophotometer. Procedure Manual*. Estados Unidos.

Millipore. 1986. *Water Microbiology. Laboratory and field procedures*. Bedford, Massachussets. pp. 11-18.

Páginas web

ATCC

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2378.1&Template=cellBiology> y <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=VR-1565&Template=animalVirology>. Consultado el 26 de octubre, 2011.

DGECI (Dirección General de Cooperación e Internacionalización, UNAM) <http://www.global.unam.mx/es/cu/cu.htm>. Consultado el 23 de enero, 2011.

IBT (Instituto de Biotecnología, UNAM)

<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>. Consultado el 26 de enero, 2012.

OMS (Organización Mundial de la Salud)

<http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/index.html> y

http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/es/. Consultado el 10 de julio, 2011.

SSA/CENAVECE/DGEPI (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades)

http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html. Consultado el 11 de julio, 2011.

Sistema de monitoreo atmosférico de la Ciudad de México (SMA)

<http://www.sma.df.gob.mx/simat/pnredmet2.htm> y

<http://www.sma.df.gob.mx/simat2/informaciontecnica/index.php?opcion=1&opcionsimat=6>. Consultado el 19 de enero, 2011.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

<http://www.unam.mx/patrimonio/index.html>. Consultado el 23 de enero, 2011.