



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Avances metodológicos para la detección del virus
de la hepatitis A y bacteriófagos en agua**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Rosa Solano Ortiz



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANA CECILIA ESPINOSA GARCÍA

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Solano
Ortiz
Rosa
56862142
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302031180

2. Datos del tutor

Dra.
Ana Cecilia
Espinosa
García

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Marisa
Mazari
Hiriart

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Yolanda
López
Vidal

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Benito
Estrada
Mena

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Rosa Elena
Sarmiento
Silva

7. Datos del trabajo escrito

Avances metodológicos para la detección del virus de la hepatitis A y bacteriófagos en agua.

68 pp

2011

Agradecimientos

A todas las personas que ayudaron de forma directa e indirecta en la realización de esta tesis.

Al proyecto “Respuesta inmune a la exposición a bacterias y parásitos presentes en agua” SEP-CONACYT-60577.

A la Facultad de Ciencias y a sus maestros.

A la Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México que me permitió formarme profesionalmente.

A la Dra. Marisa Mazari por haberme dado la oportunidad de unirme al grupo de trabajo del Laboratorio de Ecología Química, por el apoyo que siempre recibí y por haber confiando en mí.

A la Dra. Ana Espinosa por haberme aceptado como una de sus tesis, por la ayuda proporcionada para el diseño de los experimentos y el tiempo dedicado a las correcciones del escrito, pero sobretodo por ser una excelente persona.

Al Laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, en especial a la Dra. Yolanda López Vidal por la ayuda que se siempre me brindó.

A mi comité el por el tiempo dedicado a las correcciones.

Al M. en C. Gustavo Pérez por la ayuda proporcionada en los análisis estadísticos.

Dedicatoria

A todos los del Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Ecología de la UNAM.

A la Dra. Ana Espinosa por ser una excelente tutora.

A la Dra. Marisa Mazari por el apoyo que siempre nos otorga a todos los alumnos de su laboratorio.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Alejandra, Miguel y Toño por hacer siempre amenos los días de trabajo.

A Ana, Alejandra, Adriana, Diana y Felipe, amigos que hice en el laboratorio de fitorremediación, gracias por los increíbles momentos que pade durante mi estancia en ese laboratorio.

A mis amigos de carrera y generación Carlos, Marina y Elenaé, que buenos tiempos aquellos.

A la familia del Prado Domínguez de los cuales he recibido ayuda incondicional y a los que considero una familia, en verdad les quiero mucho.

A Margarita Agama por haberme soportado tanto tiempo en su casa.

A la M. en C. Laura Márquez por despertar mi interés por la Biología Molecular.

A la persona que me hizo disfrutar de las pequeñas cosas de la vida.

A todos mis compañeros y amigos del Museo de Geología de la UNAM.

Dedicatoria especial

A mis abuelitos Rosa y Nicomedes por el amor y educación dada.

A mi mamá, que me ha enseñado a luchar por las cosas que uno quiere y no dejarse vencer por las adversidades.

A todos mis hermanos y a mi sobrinito, les quiero mucho recuérdelo.

A mi hermano Martín ya que sin su apoyo incondicional este sueño jamás lo hubiera realizado, muchas gracias porque siempre confiaste en mi.

A mis tíos y primos.

Gracias familia porque de ustedes no recibí más que apoyo, aliento y deseos de verme triunfar, los amo mucho, son mi vida.

“... La ciencia no es nada más, ni nada menos, que una actividad humana: imperfecta, pero perfectible. No produce verdades, sino conocimiento confiable; honesto, pero muchas veces temporal. Y, como todo lo humano, la ciencia tiene una fuerte dimensión política.....la ciencia a veces ofrece conclusiones que afectan importantes intereses políticos y económicos. En respuesta, llega a recibir ataques o descalificaciones “

Martín Bonfil Olivera

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 El agua como vehículo de enfermedades	8
1.2 Virus entéricos y ambiente	11
1.3 Los Bacteriófagos como indicadores de calidad viral del agua	15
1.4 Bacterias hospederas de bacteriófagos somáticos y F-específicos	17
2. ANTECEDENTES	20
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3.1 Hipótesis	25
3.2 Objetivo general	25
3.3 Objetivos particulares	25
4. ÁREA DE ESTUDIO	25
4.1 Río Magdalena, Distrito Federal	26
4.2 Río Cuitzmala, Jalisco	28
5. MÉTODOS	30
5.1 Diseño experimental	30

5.2	Concentración de las muestras de agua	30
5.3	Detección de colifagos	31
5.3.1	Cultivo de bacterias hospederas	31
5.3.2	Ensayo en doble capa de agar	32
5.4	Detección de virus en muestras de agua	33
5.4.1	Controles del virus de hepatitis A (VHA) y poliovirus	33
5.4.2	Extracción de RNA	33
5.4.3	Curva estándar	33
5.4.4	RT-qPCR	33
5.5	Análisis de datos	34
6.	RESULTADOS	34
6.1	Detección de colifagos	34
6.2.	Análisis estadístico	39
5.7	Estandarización del método de detección del virus de Hepatitis A	41
7.	DISCUSIÓN	43
7.1	Colifagos	43
7.2	Estandarización del RT- qPCR para VHA	45
8.	CONCLUSIONES	47
	PERSPECTIVAS	48
	APÉNDICE	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales patógenos transmitidos por agua	10
Tabla 2. Virus entéricos y enfermedades	14
Tabla 3. Definiciones de microorganismos índice e indicador	16
Tabla 4. Grupo de bacteriófagos usados como indicadores de virus en el ambiente	17
Tabla 5. Cepas hospederas más usadas para la detección de colifagos	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transmisión de virus entéricos a partir de diferentes matrices ambientales	13
Figura 2. Sitios de muestreos para la detección de bacteriófagos en el río Magdalena, Distrito Federal	27
Figura 3. Sitios de muestreo para la detección de bacteriófagos en el río Cuitzmala, Jalisco	29
Figura 4. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas, temporada lluvias y secas de 2008 en río Magdalena	35
Figura 5. Frecuencia de colifagos con ambas hospederas, temporada lluvias y secas 2008 en río Magdalena	36
Figura 6. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas, temporada de lluvias de 2008 en río Cuitzmala	36
Figura 7. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas en la temporada de secas de 2009 en el río Cuitzmala	37
Figura 8. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas, temporada de lluvias de 2009 en río Cuitzmala	38
Figura 9. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas, temporada 2010 en río Cuitzmala	38
Figura 10. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas E. coli K12 y E. coli HS en el río Magdalena	39
Figura 11. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas E. coli K12 y E. coli HS en el río Cuitzmala	39
Figura 12. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas E. coli K12 y E. coli HS para ambas áreas	40
Figura 13. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas E. coli K12 y E. coli HS solo con los datos de las muestras cercanas a los poblados de ambas áreas	40
Figura 14. Amplificación del VHA usando el control el reactivo de HAV RNA de NIBSC	41
Figura 15. Amplificación del VHA usando el control positivo de heces de un individuo positivo a hepatitis A	41

Figura 16. Gráficas de amplificación del VHA y poliovirus	42
Figura 17. Amplificación de polivirus inoculado en muestras de agua residual, usando las mismas condiciones del protocolo de amplificación del VHA	50
Figura 18. Curva estándar de la amplificación al inocular VOP en las muestras ambientales	51

Resumen

La propuesta del uso de colifagos como indicadores de contaminación microbiológica en adición a las bacterias, consideradas como indicadoras ayuda a una evaluación más completa sobre la calidad del agua. Los colifagos suelen ser más resistentes a condiciones ambientales y procesos de tratamiento que las bacterias indicadoras tradicionales, ya que presentan características similares a los virus entéricos pueden funcionar como surrogados de éstos. Además, los métodos empleados para su detección son fáciles, rápidos y económicos.

A pesar de que las aproximaciones son muy buenas, es necesario desarrollar herramientas que permitan la detección de otros organismos patógenos transmitidos por el agua, como son los virus entéricos. En específico el virus de la hepatitis A (VHA) presenta ventajas que pueden ser aprovechadas en términos de vigilancia epidemiológica y que lo favorecen como candidato de monitoreo viral del agua.

En éste estudio se evaluó la frecuencia de detección de colifagos usando dos bacterias hospederas, *Escherichia coli* HS pFamp y *Escherichia coli* K12 Hr, con muestras de la época de secas y lluvias de 2008, 2009 y 2010 del río Cuitzmala, Jalisco, localizada en un entorno rural, así como muestras de lluvias y secas de 2008 y 2009 del río Magdalena, Distrito Federal, localizada en un entorno urbano. El método de detección usado fue el de doble capa de agar de acuerdo a la ISO 10705-1 y EPA, 2001.

Además, se presentan avances metodológicos para la detección del virus de la hepatitis A (VHA) por medio de la Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa-Cuantitativo (RT-qPCR) con ensayo Taqman.

Los resultados muestran que la frecuencia en la detección de cada una de las bacterias hospederas varía dependiendo del sistema, siendo *E. coli* K12 la que detectó más en río Magdalena y *E. coli* HS en río Cuitzmala (detección poco significativa dado los conteos bajos), por lo que el uso de ambas nos da mayor

información del tipo de bacteriófago que infecta cada bacteria hospedera. Se encontró que en las muestras del río Magdalena existen diferencias significativas por el tipo de hospedero, siendo *E. coli* K12 Hr la más infectada; mientras que en el río Cuitzmala no se encontraron diferencias significativas con respecto a las hospederas. Al comparar entre los 2 sistemas, se encontró que los conteos con ambas hospederas fueron mayores en el río Magdalena debido posiblemente a que el aporte de agua residual en éste río es mayor al encontrarse dentro de una zona urbana.

Debido a las limitaciones que se presentaron a lo largo del trabajo experimental con el control del VHA para estandarizar la técnica de RT-qPCR para detectar VHA, se usó polio vacunal para validar el protocolo de amplificación. Éste control fue inoculado en muestras de agua residual tratada. Los resultados muestran que las condiciones de amplificación para VHA sí funcionan para amplificar poliovirus, a pesar de que en algunas muestras hubo inhibición de la reacción, lo cual puede ser debido a posibles inhibidores que se encuentren en las muestras procesadas.

1. Introducción

1.1 El agua como vehículo de enfermedades

El agua, además de ser un elemento indispensable para la vida, está asociada a la transmisión de enfermedades que actualmente son una de las causas principales de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Carabias y Landa, 2005; Albina *et al.*, 2009; Pina, 2001; Nasser y Oman, 1999; Kiulia *et al.*, 2010). Del 80% de las enfermedades infecciosas asociadas con el agua, el 90% ocurren en los países pobres (Jiang, 2006).

Aún y cuando a nivel mundial se trabaja para mejorar la disponibilidad, distribución y calidad, el recurso hídrico sigue siendo un factor limitante para la salud humana. El aumento de la población y la escases del recurso ha obligado a su reuso en actividades como la agricultura, acuicultura, recarga de aguas subterráneas, entre otras (Santos *et al.*, 2009; Escalante *et al.*, 2002; Pina, 2001; Donia *et al.*, 2009).

El reuso del agua implica un riesgo para la salud pública y el medio ambiente, debido a su relación con la transmisión de diversos patógenos como bacterias, protozoarios, helmintos y virus. A pesar de que se contemplan medidas de control de calidad del agua, la Organización Mundial de la Salud estima que cada año 3,500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica provocando la muerte de cerca de 13 millones de personas (WHO, 2003).

Las nuevas tecnologías aplicadas para el tratamiento del agua han ayudado a que la incidencia de enfermedades transmitidas por ésta tiende a disminuir, principalmente en los países desarrollados. Pero los brotes y/o epidemias siguen ocurriendo tanto en países desarrollados, como en los países en desarrollo, ya que el contacto directo (*i.e.* agua de consumo) o indirecto (*i.e.* consumo de alimentos) es suficiente para contraer alguna enfermedad transmitida por ésta (Shay *et al.*, 2003).

Los efectos que deriven del contacto dependerán del volumen de agua que consuma un individuo y la condición de su sistema inmune, siendo los niños y personas mayores los más susceptibles (Mazari-Hiriart *et al.*, 2005; OMS, 2011).

Los microorganismos patógenos entéricos que con mayor frecuencia se encuentran en agua se dividen en cuatro grupos: virus, bacterias, protozoarios patógenos y helmintos. Al ser excretados en la materia fecal entran en contacto con alguna matriz ambiental ya sea agua, suelo, aire y/o alimentos y posteriormente con un nuevo hospedero potencial (Toze, 1999) (Tabla 1).

Su presencia en el ambiente está en función de la incidencia de estos en la población, además de las características particulares del microorganismo como son su morfología, tolerancia a los factores ambientales y a los procesos del tratamiento del agua. De manera especial, la dosis infecciosa, es decir, la cantidad de microorganismos necesarios para producir una enfermedad, es un aspecto fundamental para que pueda transmitirse y permanecer en una población.

Mientras que para la mayoría de los virus entéricos y protozoarios solo se necesitan de 10 o menos partículas infecciosas o quistes para causar la infección, de las bacterias, sin embargo, se requieren al menos entre 10^3 y 10^6 células infecciosas (Kaboré *et al.*, 2010).

Dentro de las medidas más usadas para la desinfección del agua en el mundo se encuentra el uso del cloro. El cual como desinfectante representa una gran contribución a la seguridad de los abastecimientos de agua para uso y consumo humano, pero se ha probado que su eficiencia es limitada ya que existen patógenos que son resistentes a este (Espinosa *et al.*, 2009; Jiménez y Torregrosa, 2009).

Aún y cuando se sabe que los virus entéricos son causantes del mayor número de enfermedades (brotes en los países desarrollados y epidemias en los países en desarrollo), comparado con las causadas por bacterias y protozoarios (Sair

et al., 2002; Percial et al., 2004; Greening, 2006), los organismos indicadores más usados para el análisis de la calidad microbiológica del agua y evaluación de riesgo para la salud humana son las bacterias coliformes que incluyen a las coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) así como en algún momento se han usado enterococos (EC).

Tabla 1. Principales patógenos transmitidos por agua (Toze, 1999)

Patógeno	Patología	Dosis infecciosa ¹	Concentración en agua residual
Virus			
Enterovirus			
Poliovirus	Poliomelitis		
Enterovirus	Gastroenteritis,		
Echovirus	Anomalías del corazón,		
Coxsackie	Meningitis		
Virus de Hepatitis A	Hepatitis	Baja	De media a alta
Adenovirus	Enfermedades		
Reovirus	respiratorias,		
Calicivirus	conjuntivitis		
Norwalk (Norovirus)	Gastroenteritis, diarrea,		
SSRV	vomito y fiebre		
Rotavirus	Gastroenteritis		
Astrovirus	Gastroenteritis		
Bacterias			
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera	Alta	
<i>Salmonella typhi</i>	Tifoidea, salmonelosis	Alta	De media a alta
<i>E. coli</i> Enteropatógena	Gastroenteritis	Alta	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis	Alta	
<i>Shigella dysinterae</i>	Disentería	Alta	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniosis	Alta	
Protozoarios			
<i>Giardia intestinalis</i> y <i>G. lamblia</i>	Giardiasis	Baja	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarrea y fiebre	Baja	De baja a media
<i>Entamoeba histolitica</i>	Disentería amebiana	Baja	
Helmintos			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Baja	Baja
<i>Ancylostoma spp.</i>		Baja	
<i>Trichuris trichiura</i>	Tricuriasis	Baja	
<i>Strongiloides stercoralis</i>	Estrongiloidosis	Baja	

¹Dosis baja significa que solo se requiere entre 1 y 10 partículas virales/quistes/huevos para causar la infección.

Estas bacterias indicadoras no necesariamente son patógenas; son excretadas en las heces de animales de sangre caliente incluyendo al humano y los conteos en el agua no pueden correlacionarse con los conteos de otros patógenos, por lo que su presencia en el agua solo indica una posible contaminación de origen fecal y (Park *et al.*, 2006; Noble *et al.*, 2003; Gortares y Naranjo, 2001; Skraber *et al.*, 2009).

La nula correlación entre de las bacterias tradicionales indicadoras con otros patógenos, como los virus, ha sido comprobada; se tienen reportes de brotes de enfermedades de origen hídrico en ausencia de las bacterias indicadoras en el agua (Brooks *et al.*, 2005; Khaled *et al.*, 2005; Savichtcheva y Okabe, 2006; Yates, 2007; Pina *et al.*, 1998). Este hecho, deja clara la necesidad de contar con indicadores de contaminación microbiológica del agua eficientes que puedan contemplar a los de uso tradicional, considerando aspectos como supervivencia e infectividad en el ambiente así como tolerancia a los procesos de tratamiento del agua. Además, es importante integrar como indicadores de calidad de agua tanto a los virus como los quistes de protozoarios, por su relevancia en términos de salud pública y porque suelen ser más tolerantes a los procesos de tratamiento de agua residual así como más estables en el ambiente, con respecto a las bacterias indicadoras convencionales (Yates, 2007; Percial *et al.*, 2004).

A pesar de que el uso de coliformes totales como indicadoras de la calidad de agua tiene serias limitaciones, especialmente en áreas tropicales, no hay que perder de vista que al ser un indicador de contaminación fecal, tanto humana como animal, nos dan un panorama general sobre calidad de agua (Toranzos *et al.*, 2007; Mazari-Hiriart *et al.*, 2008).

1.2 Virus entéricos y ambiente

Los virus son definidos como parásitos intracelulares obligados que requieren de células hospederas para replicarse, el tamaño de estos se ubica entre 15 y 350 nm; su genoma puede estar constituido por DNA o RNA, el cual está

rodeado por una cubierta de proteínas (cápside), misma que puede o no estar rodeada por lipoproteínas (Seymour y Appleton, 2001).

En cuerpos de agua que no presentan contaminación fecal se han detectado entre 10^6 y 10^8 partículas virales por mL que puede estar asociadas con los organismos del ecosistema acuático, sin embargo, cuando el ecosistema es afectado por actividades humanas, la presencia de virus puede convertirse en problema de salud pública y causar importantes pérdidas económicas, principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos (Reynolds y Pepper, 2009; Hurst y Reynolds 2007; Jemba, 2004).

Los virus que infectan y se replican en células del tracto gastrointestinal de animales o humanos, que se transmiten por vía fecal-oral son llamados virus entéricos, de los cuales, el agua y los alimentos son el principal vehículo para pasar de un hospedero a otro. La dosis infecciosa de los virus entéricos para causar enfermedad es entre 10-100 partículas o inclusive puede ser 1 partícula dependiendo del tipo de virus. Su presencia en los sistemas acuáticos está asociada principalmente a contaminación por materia fecal humana, su detección y control en cualquier matriz ambiental implica retos metodológicos, debido a que están presentes en bajas concentraciones (Espigares, 2006; Abbaszadegan *et al.*, 1999) (Figura1).

El tiempo entre su permanencia en el ambiente y una nueva infección de otro hospedero es variable dependiendo del tipo viral, ya que existen factores que estarán determinando su presencia en el agua. Dichos factores se asocian con el número de habitantes de una población, sus hábitos de higiene, la prevalencia de infecciones en la comunidad, la temperatura y la temporada del año, teniendo reportes sobre los niveles virales más altos que se presentan durante el invierno (Espinosa *et al.*, 2004; Hurst, 1991). Éste tipo de virus suelen ser resistentes a temperaturas entre los 4 °C y 72 °C, así como a la desinfección con cloro y a los cambios de pH (que puede ir de 1 a 9 de pH), por lo que pueden permanecer estables durante meses o inclusive más tiempo si están asociados con materia orgánica, ya que esta asociación les confiere cierta protección contra la inactivación, promoviendo su acumulación en

sedimentos, desde donde pueden resuspenderse en la columna de agua (Kiulia *et al.*, 2010).

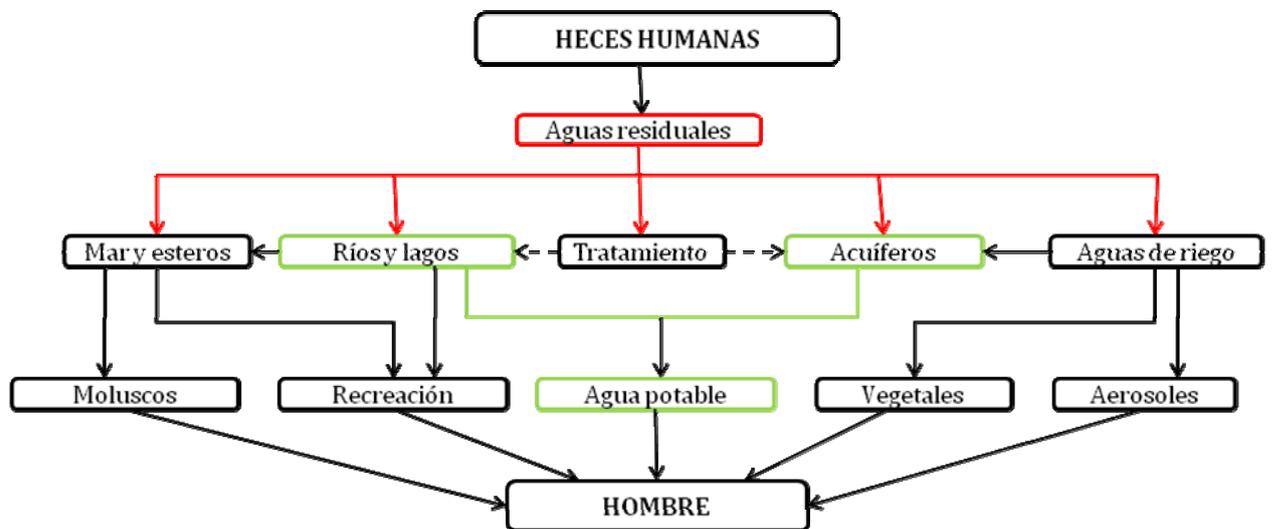


Figura 1. Transmisión de virus entéricos a partir de diferentes matrices ambientales. (Espinosa, 2008, adaptado de Pina, 2001).

Los virus humanos entéricos son excretados en las heces de individuos infectados en grandes cantidades (10^8 a 10^{10} partículas por gramo de heces) (Albinana *et al.*, 2009).

Se han descrito más de 140 tipos serológicos diferentes, pertenecientes a diferentes familias. Dentro de los grupos más estudiados se encuentran las familias *Picornaviridae* (poliovirus, enterovirus, coxsakievirus A y B, virus de la hepatitis A y echovirus), *Adenoviridae* (adenovirus), *Caliviridae* (norovirus, calcivirus y Norwalk virus), *Reoviridae* (reovirus y rotavirus), *Astroviridae* (astrovirus) y el virus de la hepatitis E (Fong y Lipp, 2005; Carter, 2005; Purcell y Emerson, 2008) (Tabla 2).

Los virus entéricos comúnmente causan infecciones silenciosas o agudas con un periodo de incubación corto. Las infecciones causadas se agrupan en tres tipos principales: gastroenteritis, hepatitis transmitidas entéricamente y las enfermedades que afectan a otras partes del cuerpo como ojos, sistema respiratorio y sistema nervioso central, como la conjuntivitis, poliomeilitis, meningitis y encefalitis. La severidad de una infección viral dependerá del tipo viral que la ocasione y las características del individuo afectado tales como

edad, estado de salud y sistema inmune (Toranzos *et al.*, 2007; Health Canada, 2010).

Tabla 2. Virus entéricos y enfermedades (Modificado de Carter, 2005 y Bofill *et al.*, 2005)

Tipo viral	Familia y género	Tamaño y genoma	Enfermedad
Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus, Enterovirus	Picornaviridae (enterovirus)	28 nm (ssRNA)	Poliomielitis, infecciones oculares, respiratorias, cardiopatías, diabetes.
Virus de hepatitis A	Picornaviridae (hepatovirus)	28 nm (ssRNA)	Hepatitis tipo A, la gravedad de la infección está en función de la edad.
Virus de hepatitis E	Hepeviridae (hepevirus)	34 nm (ssRNA)	Hepatitis tipo E, la infección es severa en mujeres embarazadas
Rotavirus	Reoviridae (grupos A y B)	70 nm (dsRNA)	Gastroenteritis
Adenovirus grupo F, tipos 40 y 41	Adenoviridae (Mastadenovirus)	100 nm (dsDNA)	Infecciones respiratorias, oculares, urinarias, gastroenteritis.
Saporovirus	Caliciviridae (saporovirus)	34 nm (ssRNA)	Gastroenteritis
Norovirus	Calicivirus (norovirus)	34 nm (ssRNA)	Gastroenteritis
Astrovirus humano	Astroviridae (mamastrovirus)	28 nm (ssRNA)	Gastroenteritis

El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC por siglas en inglés) ubica a norovirus, hepatitis A, rotavirus y astrovirus como los principales patógenos transmitidos por alimentos, de los cuales, los dos primeros, norovirus y el virus de hepatitis A son los que más enfermedades causan a nivel mundial (Greening, 2006; Koopmans y Duizer, 2004).

Debido a que la detección de los virus en matrices ambientales, es difícil las investigaciones han sido encaminadas a la búsqueda de indicadores

alternativos y/o complementarios que den evidencia de la presencia de virus principalmente en agua y alimentos.

1.3 Los Bacteriófagos como indicadores de calidad viral del agua

Se sabe que el riesgo de infección por virus o protozoarios al consumir agua es 10 a 10 000 veces mayor que el causado por bacterias patógenas (Bosch, 1998). Sin embargo, las dificultades técnicas y los costos, no hacen factible la detección rutinaria de virus entéricos en el agua.

Por lo anterior, en la búsqueda de microorganismos que permitan evaluar la calidad viral del agua, el grupo de la IAWPRC (International Association on Water Pollution Research and Control) en 1991 estableció el concepto de microorganismos índice e indicador. Cada uno con funciones particulares, ya que mientras un organismo índice proporciona información sobre la posible presencia de determinados patógenos y de los riesgos sanitarios que puedan representar para la salud, un organismo indicador aporta datos sobre los efectos de un proceso de tratamiento o la calidad de cierto producto (Payment y Locas, 2010) (Tabla 3).

Los bacteriófagos, virus que infectan bacterias o colifagos, virus que infectan específicamente a bacterias coliformes de la familia *Enterobacteriaceae*, se han propuesto como indicadores de los virus entéricos e índices de la contaminación del agua en el ambiente, así como la posible detección de la fuente de contaminación (Long y Sobsey, 2004).

Los bacteriófagos tienen patrones de infectividad y persistencia similares a los virus entéricos, también presentan similitudes morfológicas y de transporte en agua, además debido a que los métodos para su detección son sencillos, rápidos y de bajo costo, los bacteriófagos pueden ser buenos candidatos de contaminación fecal y viral (Nasser y Oman, 1999; Mendez *et al.*, 2002; Pillai, 2006; Grabow, 2001).

Tabla 3. Definiciones de microorganismos índice e indicador (Ashbolt *et al.*, 2001)

Grupo	Definición
Indicador de procesos	Grupo de organismos que demuestra la eficacia de un proceso.
Indicador de contaminación fecal	Grupo de organismos que señalan contaminación de origen fecal. Solo se puede inferir que patógenos pueden estar presentes.
Organismos modelo o índices	Especies o grupo de organismos que se relaciona con el comportamiento o la presencia de un patógeno. Como <i>E. coli</i> es índice de <i>Salmonella</i> o los colifagos F-RNA como modelo de virus entéricos humanos.

Los grupos de bacteriófagos propuestos como indicadores de virus entéricos son tres: colifagos somáticos, colifagos F- específicos (F-RNA o F-DNA) y los bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* (Leclerc *et al.*, 2000; Ogorzaly y Gantzer, 2006) (Tabla 4).

De los tres grupos de bacteriófagos, los que infectan a *B. fragilis* HSP40 y los F-RNA se han propuesto como indicadores virales por la posible relación con contaminación fecal humana. Aunque los más usados para el monitoreo son los colifagos somáticos y los F-específicos (Feng *et al.*, 2003; Grabo, 2001).

Los colifagos somáticos se integran en las familias *Myoviridae* (dsDNA), *Siphoviridae* (dsDNA), *Podoviridae* (dsDNA) y *Microviridae* (ssDNA). Tipos de cada una de las familias han sido detectados en agua residual y residual tratada, en concentraciones que van de 10^3 a 10^7 UFP/L, siendo los más abundantes los de las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae* (Cole *et al.*, 2003; Muniesa *et al.*, 2004).

Los colifagos F-específicos se clasifican en F⁺RNA dentro de la familia *Leviviridae* y los F⁺DNA dentro de la familia *Inoviridae*. Este grupo esta presente en gran número en agua residual de origen humano y animal, especialmente los F⁺RNA. Los colifagos F⁺RNA se dividen en cuatro subgrupos, la presencia de algún subgrupo puede ser asociado con

contaminación fecal. Los F⁺RNA aislados de heces fecales y agua residual son del grupo II y III relacionados con heces humanas, mientras que el grupo I y IV se ha asociado con heces de animales (Stewart *et al.*, 2006).

Tabla 4. Grupo de bacteriófagos usados como indicadores de virus en el ambiente (Gerba, 2006).

Grupo	Principales cepas hospederas	Características generales
Colifagos somáticos	<i>E. coli</i> C (la más usada)	Grupo heterogéneo; frecuente en heces de humanos y animales (10^2 - 10^8 g ⁻¹) y agua residual (10^3 - 10^4 mL ⁻¹).
Colifagos F-RNA	<i>Salmonella typhimurium</i> WG49 <i>E. coli</i> HS(pFamp) R	Grupo homogéneo, propiedades físicas similares a los enterovirus; baja frecuencia en heces de humanos y animales (hasta 10^3 g ⁻¹), frecuentes en agua residual (10^3 - 10^4 mL ⁻¹); pueden replicarse solo a temperaturas por arriba de 30°C; los serotipos pueden relacionarse al origen de la contaminación, humana o animal.
Bajos de <i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i> RYC2056	Solo está presente en heces humanas (hasta 10^8 g ⁻¹); no se replica a temperatura ambiente; se encuentra en bajo número en agua residual (< 1 - 10^3 mL ⁻¹); grupo homogéneo.

El último grupo de bacteriófagos propuestos pertenece a la familia *Siphoviridae*, infectan a *Bacteroides fragilis*, bacteria anaerobia obligada que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente. Una característica particular es que en general *B. fragilis* solo se multiplica en el tracto intestinal humano y se encuentra en mayor concentración que *E. coli*. La cepa HSP 40 de *B. fragilis* solo se ha detectado en heces humanas (Savichtcheva y Okabe, 2006).

1.4 Bacterias hospederas de bacteriófagos somáticos y F-específicos

Se observan dos mecanismos empleados por los colifagos para infectar a las bacterias hospederas. Los colifagos somáticos lo hacen uniéndose a la pared

celular y los colifagos F específicos lo hacen por el pilli F o fimbria sexual, lo que bajo condiciones óptimas provoca la lisis de la bacteria en un periodo entre 20 a 30 minutos (Long *et al.*, 2005; Ogorzaly y Gantzer, 2009).

El pilli sexual que media la infección de los F específicos, es codificado por el plásmido F, detectado por primera vez en *E. coli* K12 y solo se forma a temperaturas cercanas o mayores de 37 °C (Jofre, 2002).

Entre las cepas hospederas más usadas en los laboratorios de análisis ambiental están *E. coli* B, C, CN, CN13, C-3000, HS (pFamp) R, *E. coli* K-12 Hfr, además de las cepas WG45 y WG49 de *Salmonella typhimurium*, las cuales tienen insertado el plásmido F de *E. coli*, responsable de la producción del pilli sexual (Tabla 5). Para la detección de bacteriófagos F-específicos las cepas hospederas más usadas son *E. coli* K-12 Hfr, *E. coli* HS (pFamp) R y *Salmonella typhimurium* WG49.

De este grupo de cepas, *E. coli* K-12 Hfr puede detectar, tanto colifagos somáticos como F-específicos, *E. coli* HS (pFamp) R, y *Salmonella typhimurium* WG49 pueden detectar colifagos somáticos pero en baja proporción, ya que los reportes muestran que más del 90-95% de los bacteriófagos detectados en agua residual por estas hospederas son colifagos FRNA específicos (Schaper y Jofre, 2000; Havelaar y Hogeboom, 1984; Mooijman *et al.*, 2002; Gerba, 2006).

Brion y colaboradores (2002) reporta que los bacteriófagos detectados en agua residual y superficial (65.7% de 105 y 87.5% de 288, respectivamente) usando la hospedera *E. coli* F_{amp} son en su mayoría F⁺RNA.

Tabla 5. Cepas hospederas más usadas para la detección de bacteriófagos
(Modificado de Gerba, 2006)

Bacteria hospedera	Cepa	Ventajas	Desventajas
<i>S. typhimurium</i> (F ⁻)	WG45	Detecta fagos somáticos	Solo la infectan fagos somáticos.
<i>S. typhimurium</i> (F ⁺)	WG49	Se reporta que es selectiva para los fagos RNA. Tasa de segregación del plásmido F ⁻ baja. Resistencia a kanamicina y ácido nalidixico.	No es específica a los fagos F-RNA: también la pueden infectar colifagos somáticos y fagos F-DNA.
<i>E. coli</i> (F ⁻)	CN, CN13	Resistencia al ácido nalidixico	Solo son infectadas por fagos somáticos.
<i>E. coli</i> (F ⁻) <i>E. coli</i> (K-12 F ⁺)	K-12 WG21, A/λ, Q13		Susceptible a la infección por F-DNA, fagos somáticos T. Eficiencia baja para conteo de fagos F-RNA presentes en el ambiente.
<i>E. coli</i> (F ⁻)	B		El conteo de las placas es de 5 a 6 veces menor que los otros fagos usados en los ensayos ambientales.
<i>E. coli</i> (F ⁻)	C	Conteo alto de placas Resistencia a ácido nalidixico. Susceptible a la infección de fagos somáticos de DNA.	
<i>E. coli</i> (F ⁺)	c-3000		Puede ser infectada por algunos colifagos somáticos, pero la mayoría de los fagos son somáticos.
<i>E. coli</i> K-12 (F ⁺)	W3110		
<i>E. coli</i>	R AMP, RR	Resistente a estreptomycin y ampicilina. El porcentaje de detección de fagos F-RNA es alto.	Conteo bajo y susceptibilidad a ser infectada por fagos F-DNA.

2. Antecedentes

El agua residual cruda y la residual tratada, son una fuente importante de nutrientes para el riego agrícola. México es uno de los países donde se reporta una mayor área irrigada con este tipo de agua o bien que la reutiliza. Los principales usos son riego agrícola, siendo los valles del Mezquital–Ixmiquilpan (Estado de Hidalgo) y de México, un claro ejemplo de esta práctica (Jiménez y Chávez, 2004; Downs *et al.*, 1999).

En México, alrededor de 180,000 hectáreas se riegan anualmente con este tipo de agua. Debe considerarse que existen riesgos asociados a ésta práctica, sobre todo cuando se reutiliza para el riego de cultivos que se consumen crudos (Jiménez, 2006).

Parte del origen de los problemas de la calidad del agua en México pueden deberse a que aproximadamente el 76% del agua se vierte sin tratamiento alguno al ambiente (Toledo, 2009; Mazari-Hiriart *et al.*, 2008).

En las normas mexicanas, los parámetros microbiológicos consideran al grupo de coliformes fecales y totales, cuyo principal representante es *Escherichia coli*, así como a los huevos de helmintos como indicadores de contaminación fecal del agua. Los límites máximos permisibles establecidos para cada microorganismo dependen del uso que se le dé al agua.

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997 (DOF, 1997), establece los límites máximos permisibles de contaminación para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, ya sea con contacto directo e indirecto. Esta norma establece que los límites permisibles para coliformes fecales son de 240 NMP/100mL y para los huevos de helmintos de 1 huevo/100mL y hasta 5 huevos/100ml (NMP= Número más probable).

En la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, se establecen los límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su

potabilización. Su modificación en el año 2000 refiere que las bacterias coliformes fecales deben estar ausentes en 100 mL de agua.

En ninguna de las normas mexicanas de agua vigentes, para diversos usos, se contemplan la detección de virus y protozoarios como indicadores de contaminación fecal, a pesar de que estos patógenos son los causantes del mayor número de infecciones transmitidas por vía hídrica reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y cuya presencia no está correlacionada con las bacterias indicadoras convencionales.

Los reportes en México sobre el uso de indicadores alternativos han mostrado una correlación positiva entre los bacteriófagos y las bacterias coliformes, así como también entre bacteriófagos y enterovirus (Espinosa *et al.*, 2009). Mientras que Fonseca (2010) reporta la detección de bacteriófagos en muestras donde no se detectaron bacterias indicadoras.

En cuanto a trabajos de detección de virus entéricos en matrices ambientales en el país, son muy pocos los trabajos reportados en revistas especializadas. Aunado a lo anterior, la información epidemiológica es limitada, ya que no se conoce la incidencia de las infecciones entéricas de origen viral y su relación con la ingesta de agua que puede estar cumpliendo (o no) la normatividad de calidad vigente (DGEPI, 2010; Espinosa, 2008).

De los trabajos realizados en la detección de virus entéricos, destacan los realizados por Espinosa *et al.*, 2009 y Hernández *et al.*, 2009, en los que se reporta la detección de enterovirus, rotavirus, astrovirus y el virus de hepatitis A en sistemas acuáticos. Además de Silva (en preparación) que reporta la detección de enterovirus y adenovirus en agua residual de reúso para riego.

La hepatitis causada por el virus de hepatitis A (VHA) es de las enfermedades más comunes en los países con condiciones sanitarias deficientes. Los patrones de distribución del VHA en el mundo presentan una clara relación con el desarrollo socioeconómico de cada país. Se observa una endemidad baja en regiones desarrolladas y alta en los países en desarrollo (Jothikumar *et al.*,

2005; Costafreda *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Jacobsen y Koopman, 2004).

El VHA es el virus tipo del género *Hepatovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*, solo existe un serotipo, y por secuenciación de la región VP1/2A se diferencia en 6 genotipos (I, II, III, IV, V y VI), de los cuales solo tres infectan al humano (genotipo I, II y III). El genotipo I subdividido en los subtipos IA y IB es el ampliamente distribuido, siendo el genotipo IA el que se asocia más con las infecciones, seguido por el 1B (Costafreda *et al.*, 2006; Jothikumar *et al.*, 2005).

Éste virus es responsable de cerca de la mitad de todos los casos de hepatitis infecciosas agudas y tiene una distribución mundial. Se transmite principalmente por vía fecal-oral, contacto persona-persona o por consumo de alimentos y agua contaminada, en especial mariscos, fruta y verduras. Los alimentos que más se han relacionado con los brotes están las ostras y almejas crudas, cebollas cambray, así como fresas y frambuesas congeladas y lechuga (Shan *et al.*, 2005; Sair *et al.*, 2002).

México es un país endémico para esta enfermedad (Valdespino, 2007; Tapia *et al.*, 1999; Poovarawan *et al.*, 2002). Tan solo para el año 2010, el número de casos de infecciones causadas por el VHA en el país ascendieron a 10,505 casos, siendo el Distrito Federal y el Estado de México, los estados donde se presentó el mayor número de casos, con 1,053 y 891 casos respectivamente (DGEPI, 2010).

Sin embargo, en México la hepatitis A no se considera un problema prioritario de salud pública debido a que la infección se presenta durante los primeros años de vida, produciendo una enfermedad “benigna” y predominantemente asintomática. El patrón de endemicidad en el país es alto e intermedio, el cual depende de la región. Debe considerarse que la mayoría de la población ya presenta anticuerpos contra el VHA antes de los 10 años (Valdespino *et al.*, 2007).

Con la mejora de las condiciones sanitarias y sociales, los casos de infección se han reducido al disminuir el riesgo de exposición al agua y alimentos contaminados. Tal hecho ha provocado que el número de personas susceptibles a la infección y la probabilidad de aparición de brotes epidémicos aumenten. Los reportes de infección por VHA ahora presentan picos de infección en la infancia tardía o adolescencia, en lugar de la infancia temprana. Al ser la manifestación clínica y la letalidad de la enfermedad dependiente de la edad (aumenta con la edad), los niños al presentar una infección asintomática los convierte en fuente de dispersión (Tanaka, 2000; Tapia *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2006; Strauss y Strauss, 2008).

En nuestro país, la información que se tiene sobre la morbilidad y mortalidad asociada con hepatitis A es escasa, y si el diagnóstico no es adecuado, la información epidemiológica será incompleta. La mayoría de los brotes del VHA se diagnostican a nivel serológico, a pesar de que existe una correlación directa entre la carga viral y la enzima alanina aminotransferasa (ALT), con la serotificación no es posible distinguir entre serotipos o cepas del VHA, por lo que no es posible detectar cambios epidemiológicos en una población; esto convierte a las aplicaciones de técnicas moleculares para la detección y cuantificación del VHA de suma importancia (Hussain *et al.*, 2006).

El poder diferenciar entre genotipos virales nos ayudaría a la identificación de casos esporádicos o brotes, generando un diagnóstico rápido y la evaluación de posible riesgo a la salud (Khaled *et al.*, 2005). Esto se torna cada día más relevante con el incremento en las prácticas de importación y exportación de productos alimenticios, así como la facilidad que se tiene para desplazarte alrededor del mundo.

Al respecto existen reportes donde fresas congeladas y cebollas verdes exportadas de México a Estados Unidos han ocasionado brotes de infecciones por el VHA y donde la identificación del virus se logró por medio de técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés) (Seymour y Appleton, 2001).

Las pruebas moleculares tienen una aplicación exitosa en muestras ambientales, ya que permiten la detección rápida y específica de virus entéricos humanos. Dentro de las técnicas moleculares, la técnica de PCR en tiempo real puede ser usada para estimar la cantidad de partículas virales en muestras ambientales y para la detección de virus que no se han logrado cultivar (Dubois *et al.*, 2007).

Entre los métodos descritos para la detección del VHA por RT-PCR en tiempo real destacan los descritos por Costa-Mattioli *et al.*, 2002; Silberstein *et al.*, 2003; Abd El Galil *et al.*, 2004; Hewitt y Greening, 2004; Brooks *et al.*, 2005; Jothikumar *et al.*, 2005 y Amado *et al.*, 2008. Por otro lado, también se dispone de kits para la cuantificación del VHA; el kit de Roche LightCycler (LC) y el RealArt (Amado *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2006).

Las ventajas de utilizar métodos moleculares como lo es el RT-PCR en tiempo real son: la alta sensibilidad, la posibilidad de la detección y amplificación simultánea del ácido nucleico blanco en un solo paso, además de tener un rango dinámico alto ($>10^7$ muestra) que permite comparar de manera sencilla las concentraciones de RNA de las muestras y la posibilidad de generar datos cuantitativos (Houde *et al.*, 2007).

Hay que tomar en cuenta que los patógenos virales, tienen hospederos específicos. En el caso de los virus entéricos al ser excretados únicamente por individuos infectados, se proponen como una herramienta prometedora para determinar las fuentes de contaminación fecal en los sistemas acuáticos, que al usarse en conjunto con las bacterias indicadoras y bacteriófagos ayudaría a identificar y prevenir la transmisión de enfermedades entéricas virales, mejorando la vigilancia en salud pública. Un aspecto muy interesante y que resulta de gran utilidad, es que los enfermos de hepatitis A requiere atención médica y por tanto acuden al servicio donde se registra y reportar el caso, así como se le da seguimiento. Este seguimiento es de gran utilidad para monitorear el manejo del agua y/o los alimentos que eventualmente están contaminados con heces. El tiempo de la enfermedad ofrece la opción de una localización de fuentes contaminantes así como de su control.

En este sentido se reportan los avances experimentales para utilizar al VHA como herramienta para el monitoreo ambiental. Asimismo las opciones de diagnóstico rápido y que aporten la mayor información posible son de suma importancia para prevenir y controlar brotes de enfermedades virales transmitidas por agua.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Si la contaminación fecal del agua puede ser evaluada utilizando colifagos que tienen diferentes estrategias para infectar bacterias coliformes, entonces la presencia y abundancia ampliará la capacidad de evaluación de calidad de agua, empleando colifagos como agentes modelo de virus entéricos en agua.

3.2 Objetivo general

- Evaluación del uso de las bacterias hospederas *Escherichia coli* HS pFamp y *Escherichia coli* K12 Hr en la detección de colifagos.
- Determinar la presencia y carga viral de hepatitis A por medio de técnicas de RT-qPCR.

3.3 Objetivos particulares

- Detección de colifagos utilizando dos cepas de bacterias hospederas *E. coli* HS pFamp y K12 Hr en dos sistemas acuáticos de un ambiente urbano y un ambiente rural.
- Adaptación de un protocolo de RT-qPCR para la detección del virus de la hepatitis A en muestras ambientales en diferentes tipos de agua.

4. Área de estudio

En el estudio se consideraron dos áreas: La cuenca del río Cuitzmala, Jalisco y el río Magdalena, Distrito Federal. Ambas son áreas naturales, pero el río Cuitzmala se localiza en un entorno rural, mientras que el río Magdalena se localiza en la periferia de una zona urbana. Se eligieron estos dos contextos ambientales con la idea de contrastar la presencia de los indicadores de contaminación fecal.

4.1 Río Magdalena, Distrito Federal

El río Magdalena se ubica en la Sierra de las Cruces al suroeste del D. F., a los 19°15'06" de latitud norte y 99°17'30" de longitud oeste. Tiene una extensión de 28.2 km, abarca 3 delegaciones políticas: Magdalena Contreras (78%), Álvaro Obregón (5%) y Cuajimalpa (17%) (Monges, 2009). Existen dos tipos de clima debido al gradiente altitudinal. En la parte urbana y hasta los 3,050 m el clima es templado subhúmedo y en la parte más alta entre los 3,100 y 3,800 msnm el clima es semi-frío. La temperatura media anual oscila entre 10 y 14°C, la precipitación en la parte baja es cerca de los 1,000 mm, y hasta 1,500 mm en la zona más alta (García, 1988) (Figura 2).

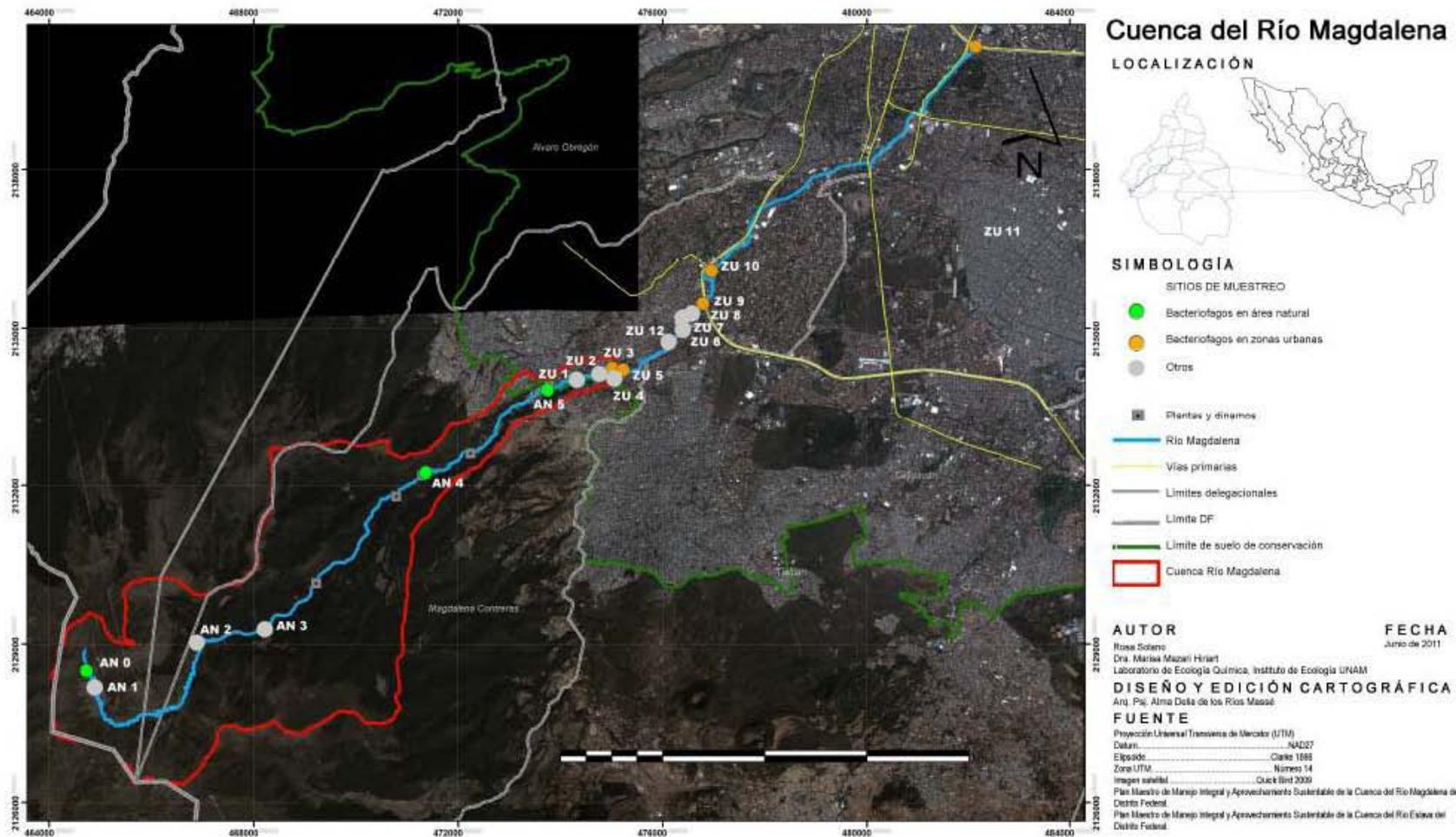


Figura 2. Sitios de muestreo para la detección de colifagos en el río Magdalena, D.F.

4.2 Río Cuitzmala, Jalisco

La cuenca del río Cuitzmala se localiza en la Costa del Pacífico mexicano al suroeste del Estado de Jalisco. Cuenta con una extensión de 1,089.27 km² y se ubica en los municipios de La Huerta y Villa Purificación.

Las principales localidades son La Eca, Emiliano Zapata, San Miguel, Jirosto, los Achiotes, Nacastillo, Francisco Villa, Espinos del Judío y San Miguelito.

El clima es cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 24.9°C con una precipitación media anual de 748 mm.

Las principales actividades que se realizan en la cuenca son la agricultura y la ganadería extensiva (Rojas, 2010).

Para el año 2010 el INEGI reporta una población de 23,428 habitantes para el municipio de La Huerta y de 11,623 habitantes para el municipio de Villa Purificación (Figura 3).

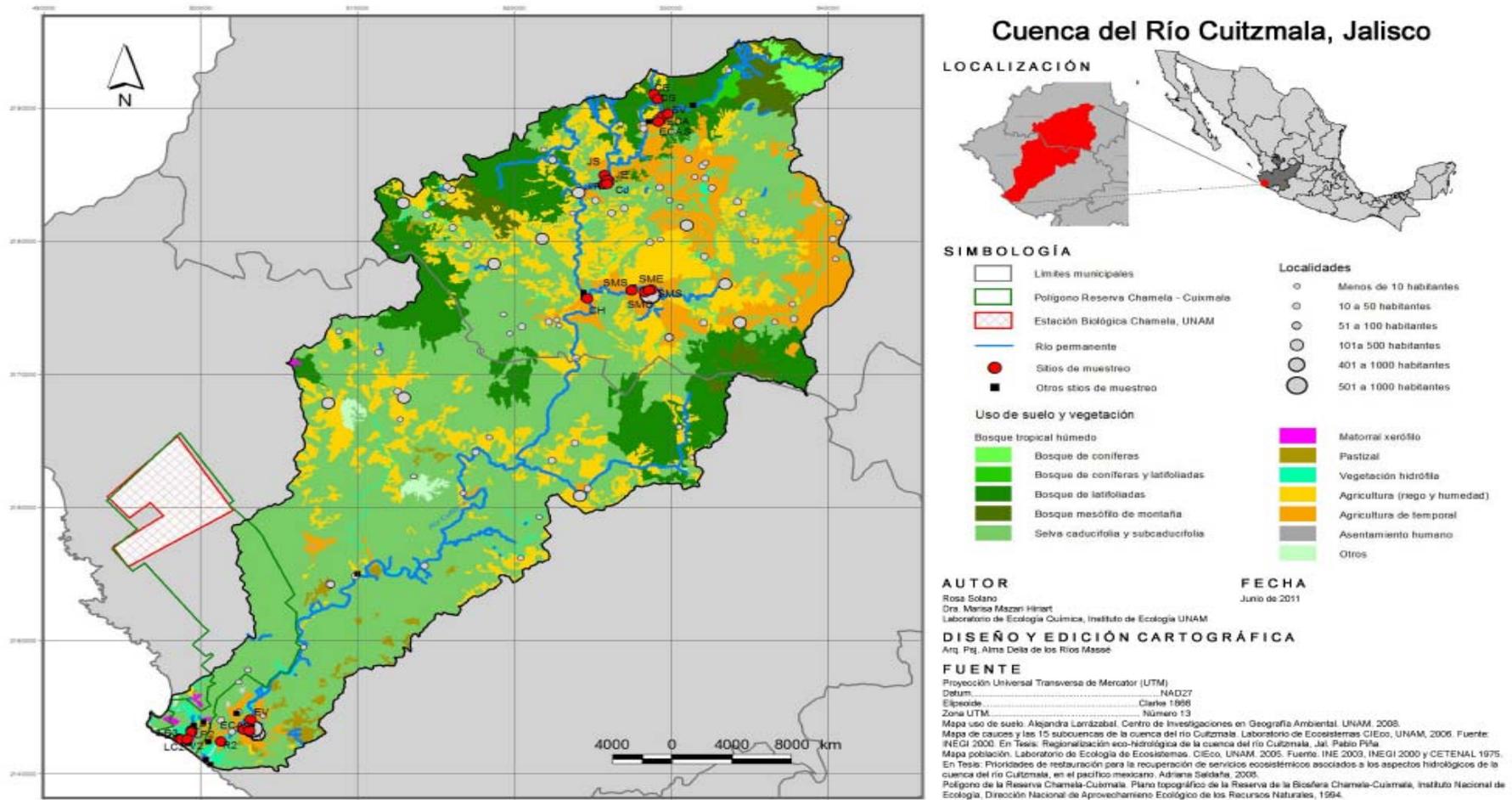


Figura 3. Sitios de muestreo para la detección de colifagos en la cuenca del río Cuitzmala, Jalisco.

5. Métodos

5.1 Diseño experimental

Las muestras de agua utilizadas para el análisis de bacteriófagos del río Magdalena corresponden a los años de muestreo 2008-2009, como parte del Proyecto del Plan Maestro del Río Magdalena como una colaboración entre el Gobierno del Distrito Federal y la UNAM (PUEC-UNAM-GDF, 2007)

Del área de río Cuitzmala se trabajó con muestras colectadas durante los años 2008, 2009 y 2010, como parte del proyecto Desarrollo interdisciplinario de modelos conceptuales y herramientas metodológicas para el estudio de los servicios ecosistémicos con clave SEP-Conacyt 50955.

La colecta fue de 51 muestras en los periodos que comprenden de octubre 2008, junio y octubre 2009 y mayo 2010, considerando dos temporadas de muestreo correspondiente a las temporadas de secas y lluvias, durante dos ciclos anuales.

Las muestras fueron colectadas en botellas de polipropileno, Nalgene de 1 y 10 L previamente esterilizados a 115 atmósferas de presión, durante 15 minutos. Durante el transporte las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C. Una vez en laboratorio las muestras fueron congeladas a -70°C hasta ser procesadas.

5.2 Concentración de las muestras de agua

Las muestras de agua fueron concentradas por ultrafiltración, tomando como base los trabajos de Hill *et al* (2005), y de Polaczyk *et al* (2008).

En este método se utilizaron filtros de polisulfona F80A (Fresenius Medical Care), el cual tiene un intervalo de filtración de moléculas con peso molecular entre 15–20 kDa (kilo daltones). El ultrafiltro se bloqueó previamente haciendo recircular un 1 L de una solución de NaPP 0.1% (polifosfato de sodio) durante 30 min, con lo cual se logra cargar negativamente las fibras del filtro

incrementando la repulsión entre la carga negativas de los microorganismos y la superficie del filtro, minimizando la adhesión. También se prepararon las muestras antes de ser concentradas agregando NaPP como disgregante a una concentración final de 0.1% (Polaczyk, 2008). La concentración se realizó a un flujo constante de 1,700 mL/min y una presión de 15 a 20 psi, que se logro por medio de una bomba peristáltica (Masterflex, Cole Palmer, USA). El volumen final aproximado del concentrado fue de 100mL. Las muestras concentradas fueron preservadas a -70°C para su posterior análisis.

5.3 Detección de colifagos

5.3.1 Cultivo de bacterias hospederas

Las bacterias hospedera utilizadas fueron *E. coli* K12–Hfr 3000 (ATCC 23631) y *E. coli* HS (pFamp) R (ATCC 700891).

Para el crecimiento de la cepa *E. coli* K12–Hfr, se prepararon 50 mL de medio líquido TGYB (Bioxon), previamente esterilizado, al cual se le adicionó una solución de Ca-glucosa (calcio-glucosa) en una proporción de 1 mL por cada 100 mL. En el medio se inocularon 0.5 mL de la bacteria *E. coli* K12–Hfr en 50 mL de medio TGYB, este se incubó durante 12 horas aproximadamente, a una temperatura de 37°C (ISO, 1995).

Para el crecimiento de la cepa *E. coli* HS (pFamp) se prepararon 50 mL de medio líquido TSB (Fluka), previamente esterilizado al cual se le adicionó la solución de antibiótico ampicilina/estreptomicina (Sigma) en una proporción de 10 mL por cada litro, teniendo una concentración de antibióticos de 1.5%. En el medio se inocularon 0.5 mL de bacteria *E. coli* HS en 50 mL, éste se incubó durante 2 horas aproximadamente a una temperatura de 37°C con agitación en Baño María (EPA, 2001).

5.3.2 Ensayo en doble capa de agar

La cuantificación de colifagos se realizó utilizando el método de doble capa de agar según los lineamientos de la International Standard “Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages” ISO 10705-1:1995.

Se mezclaron 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de bacteria hospedera (*E. coli* K12) en 5 mL de agar semisólido de medio TGYB (Bioxon) (estéril y con Ca-glucosa). La mezcla de agar semisólido se vació en cajas de Petri (100 X 15 cm) que contenía medio TGYB sólido (con Ca-glucosa) previamente preparadas. Una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron por 18 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó la cuantificación de las placas y los resultados se reportaron en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

La cuantificación de colifagos detectados con la bacteria hospedera *E. coli* HS (pFamp) se realizó según los lineamientos de la EPA “Method 1602: Male-specific (F⁺) and Somatic Coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure”.

De manera general, se mezclaron 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de bacteria hospedera (*E. coli* HS), en 5 mL de agar semisólido de medio TSB (Fluka), estéril y con los antibióticos. La mezcla de agar semisólido se vació en cajas de Petri (100 X 15 cm) que contenía medio TSB sólido (con antibióticos) previamente preparadas. Las cajas se incubaron por 18 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el conteo de las placas y los resultados se reportaron en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

El límite de detección del método de doble capa de agar se determinó entre 1 y 10 UFP (Fonseca, 2010).

5.4 Detección de virus en muestras de agua

5.4.1 Controles del virus de hepatitis A (VHA) y poliovirus

Para la adaptación del protocolo para la amplificación del VHA se utilizaron como controles positivos del HAV el reactivo *HAV RNA Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Techniques* de NIBSC (código NIBSC 01/488). También se trabajó con una muestra de heces positiva a VHA (positiva a anti-VHA y niveles altos de ALT), donada por el Dr. Miguel Ángel Torres Vega del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Y como control positivo para enterovirus se usó polio vacunal (VOP, BIRMEX).

5.4.2 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el Mini kit QIAmp Viral RNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo un volumen de recuperación final de 80 µL.

5.4.3 Curva estándar

Las curvas estándar para cada virus se construyeron con cinco puntos de referencia y cada punto se ensayo por duplicado. Para la construcción de la curva estándar del VHA se realizaron cuatro diluciones seriales 1:2, iniciando con una concentración de 40 genomas. Para la curva estándar de enterovirus se realizaron siete diluciones seriales 1:5, tomando las últimas cinco para la curva iniciando con una concentración de 7×10^3 genomas.

5.4.4 RT-qPCR

En el ensayo de qRT-PCR se usó el kit Taqman One-step RT-PCR (Applied Biosystems), teniendo un volumen final de reacción de 30 µL (10 µl del extracto y 20 µL de la mezcla de reacción).

Los oligonucleótidos utilizados para la detección del virus de la hepatitis A hibridan en la región 5'NCR (no codificante) (Jothikumar *et al.*, 2005), al igual que los oligonucleótidos utilizados para enterovirus (EV) los cuales también

hibridan en la región 5'NCR (Monpoeho *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la región 5'NCR es muy conservada en el genoma de la familia *Picornaviridae*, lo cual es favorable cuando se quiere utilizar a EV como indicador de enterovirus.

Las sondas TaqMan para la detección de los virus fueron marcadas con el fluoróforo 6-carboxiufluoresceína (FAM) en el extremo 5' y con el quencher Black Hole (BHQ) el extremo 3'.

Las condiciones de las corridas tanto del VHA como de poliovirus fueron 50 °C por 30 min., 95 °C por 15 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C por 20 s y 72 °C por 15 s.

5.5 Análisis de datos

Para poder determinar si existían diferencias entre las bacterias hospederas considerando el tipo de zona en la que se tomaron las muestras de agua, se uso estadística paramétrica. La prueba se realizó aplicando un Análisis de la Varianza (ANDEVA) usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.2.06.

6. Resultados

Como primer punto se presentan los resultados de la detección de colifagos, en los cuales se muestran las frecuencias en la detección con cada una de las hospederas en cada sitio de acuerdo con la temporada y el año de la muestra, y los resultados obtenidos del análisis estadístico, reportando si existe o no una diferencia en el conteo de colifagos en función de la bacteria hospedera y el sitio de muestreo.

En el segundo punto se muestran los avances de la estandarización de la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de VHA.

6.1 Detección de colifagos

Con respecto a la detección de colifagos en agua del río Magdalena, se consideraron muestras de la temporada de lluvias y secas del año 2008. La

muestra de la zona urbana 9 (Zu9) de la temporada de secas los conteos más altos se obtuvieron con la bacteria hospedera *E. coli* K12 (134 UFP/mL). En este mismo sitio pero para la temporada de lluvias los conteos más altos se registraron con la bacteria hospedera *E. coli* HS (200 UFP/mL) (Figura 4).

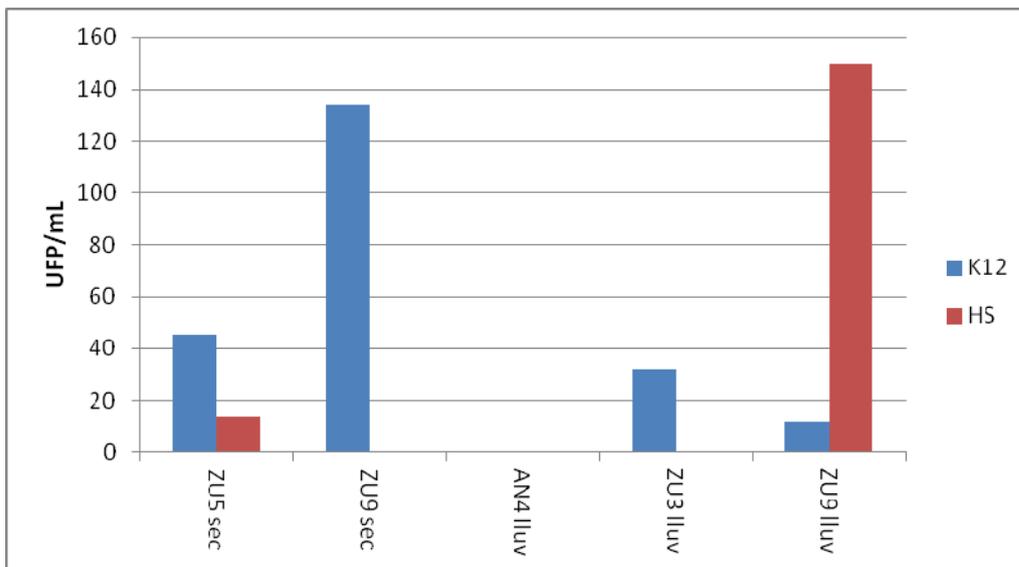


Figura 4. Frecuencia de colifagos con ambas hospederas en las temporadas de lluvias y secas de 2008 en río Magdalena. Sec= secas y Lluv= lluvias; K12 y HS son las bacterias hospederas.

En el año 2009 en la zona urbana 11 (ZU11) en las de lluvias secas los conteos más altos se obtuvieron con la bacteria hoppedera *E. coli* K12, lluvias con 112 UFP/mL y secas con 116 UFP/mL, mientras que con *E.coli* HS se registró un conteo alto para la temporada de secas en ZU11 (71 UFP/mL) (Figura 5).

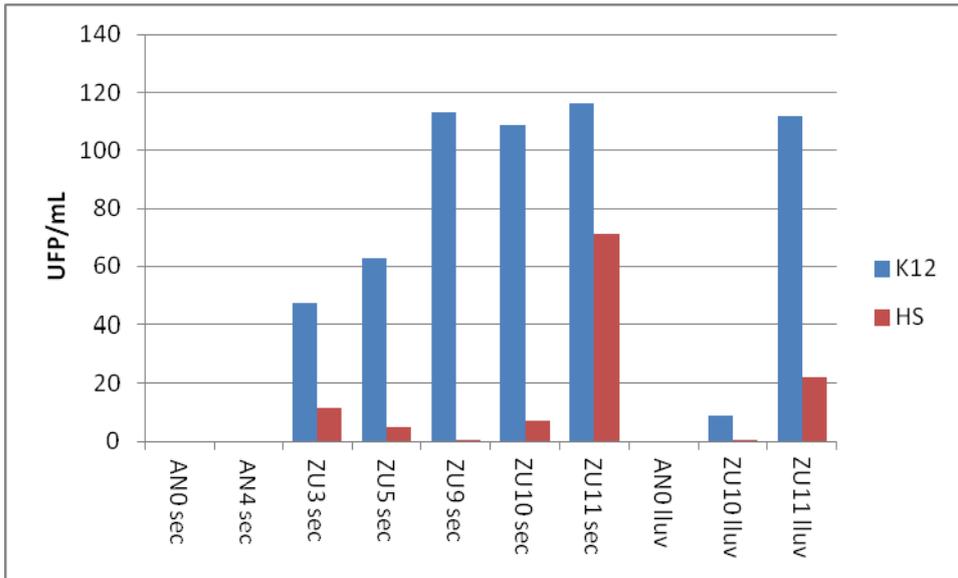


Figura 5. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas en las temporadas de lluvias y secas de 2009 en río Magdalena. Sec= secas y lluv= lluvias; K12 y HS son las bacterias hospederas.

En el área de del río Cuitzmala en la temporada de lluvias 2008, San Miguel (SM) fue el sitio donde se obtuvieron conteos más altos con ambas bacterias hospederas, los cuales fueron 0.045 UFP/mL con K12 y 0.06 UFP/mL con HS (Figura 6).

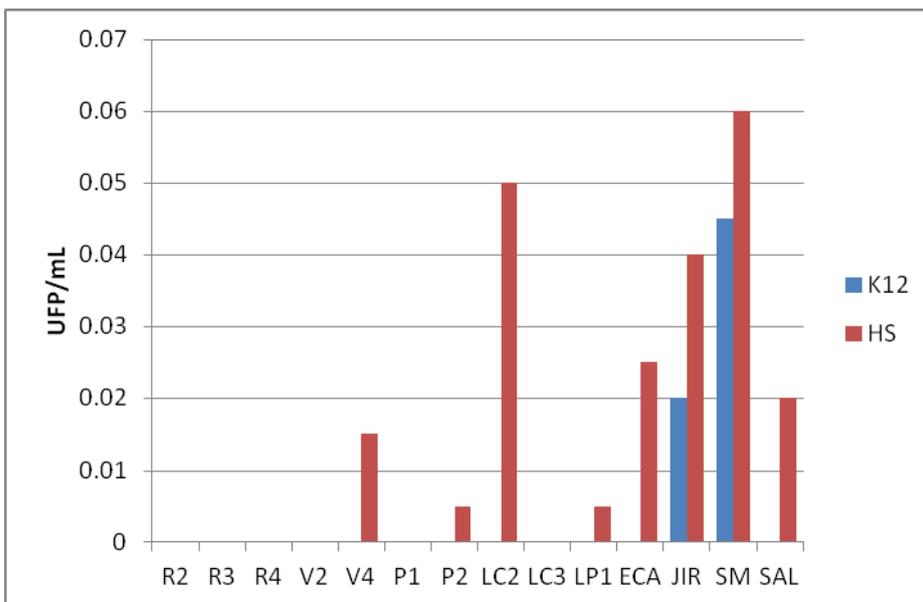


Figura 6. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas en la temporada de lluvias de 2008 en río Cuitzmala; K12 y HS son las bacterias hospederas.

Para la temporada de secas 2009 la ECA fue el sitio donde se obtuvo un conteo relativamente mayor con la bacteria hospedera *E. coli* K12 (0.105 UFP/mL). Mientras que con la bacteria hospedera *E. coli* HS el mayor conteo se registró en la Laguna Principal 2 (LP2) (0.025UFP/mL), aunque éste no fue significvativo (Figura 7).

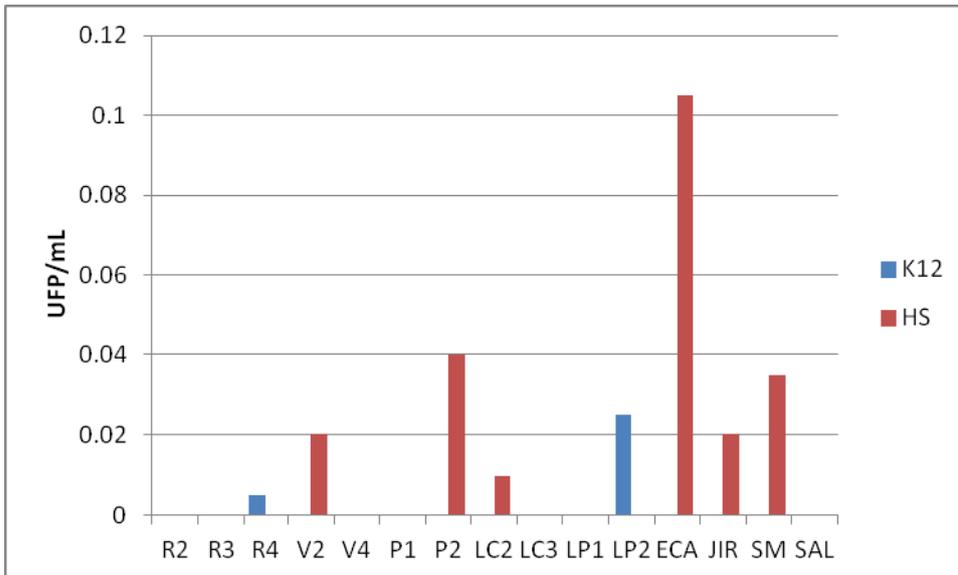


Figura 7. Frecuencia de colifagos con ambas bacterias hospederas en la temporada de secas de 2009 en río Cuitzmalá; K12 y HS son las bacterias hospederas.

En la temporada de lluvias 2009 fue el Canal Francisco Villa (CV) donde se tuvo el mayor conteo con la hospedera *E. coli* K12 (4.563 UFP/mL), para los demás sitios los conteos fueron bajos o nulos en algunos casos (Figura 8).

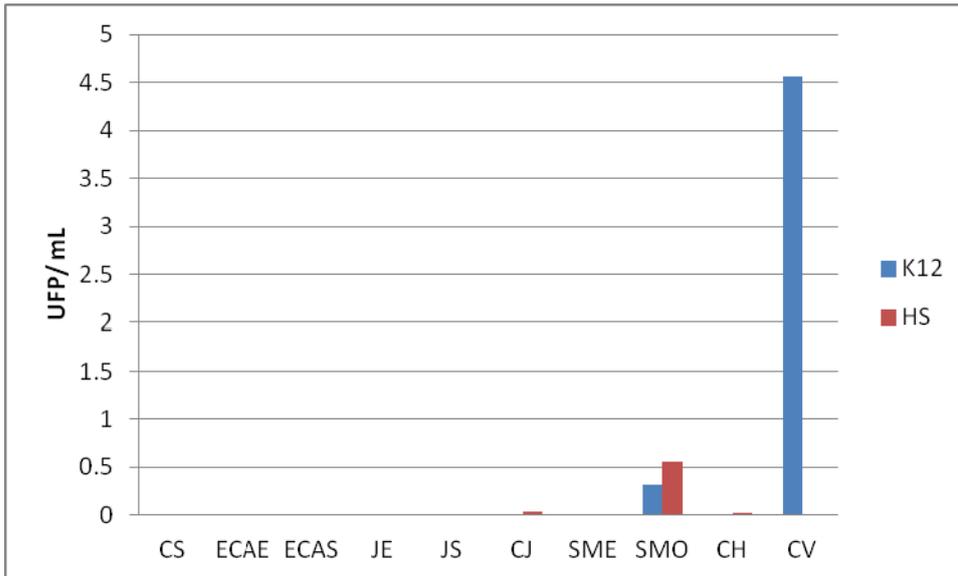


Figura 8. Detección de colifagos con ambas bacterias hospederas en la temporada de lluvias de 2009 en río Cuitzmala; K12 y HS son las bacterias hospederas.

Para la temporada de secas 2010 los conteos más altos se registraron en El Camalote entrada (CE) con la hospedera *E. coli* K12 (1.104 UFP/mL). Las detecciones de colifagos con *E. coli* HS fueron muy bajas (Figura 9).

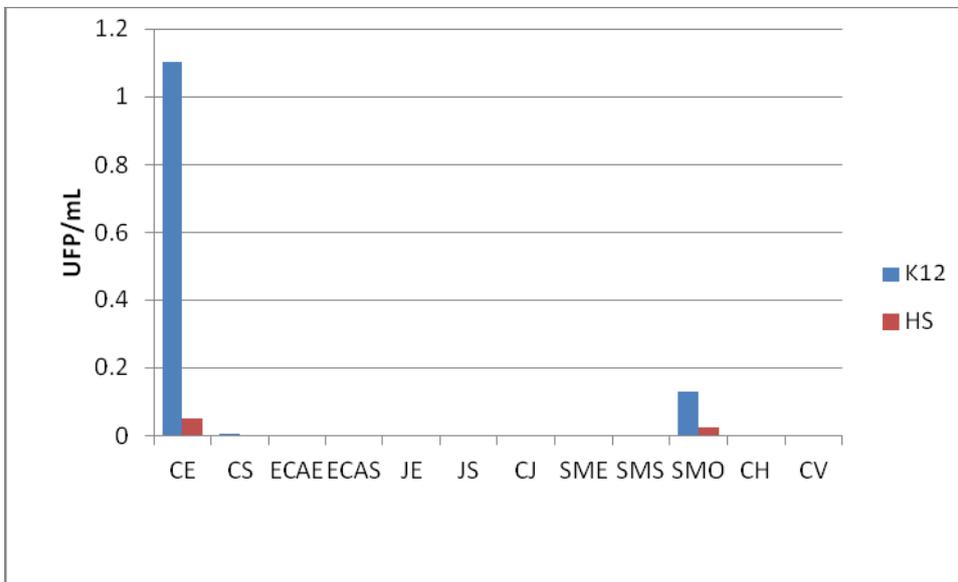


Figura 9. Detección de colifagos con ambas hospederas en la temporada de secas de 2010 del río Cuitzmala.

6.2. Análisis estadístico

Los resultados del análisis estadístico de las ANDEVA (Análisis de la Varianza) de los datos del río Magdalena, en el cual se tomó en cuenta a las dos hospederas se encontró que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la frecuencia de detección de colifagos, ya que fue la hospedera *E. coli* K12 con la que se obtuvieron los conteos más altos (Figura 10).

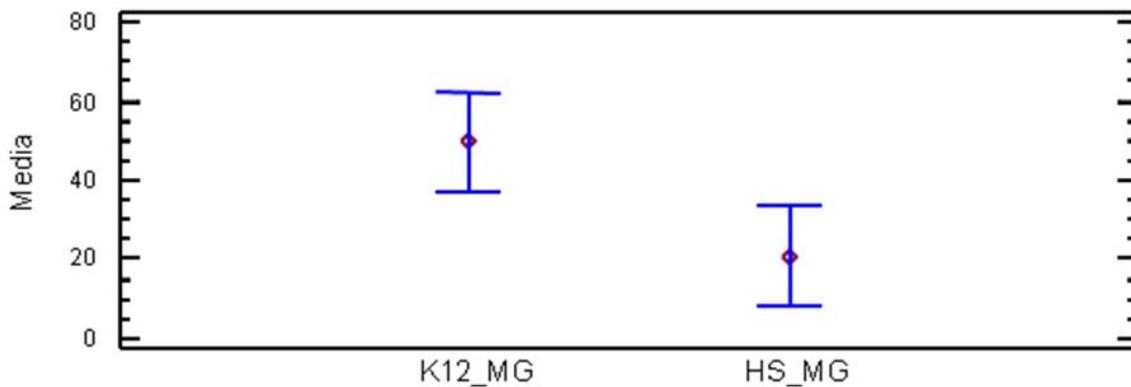


Figura 10. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas *E. coli* K12 y *E. coli* HS en el río Magdalena ($p = 0.0262$ con 95% de confianza) *MG= río Magdalena.

En los resultados de las ANDEVA obtenidas al comparar todos los datos en río Cuitzmala en donde también se tomaron en cuenta las dos bacterias hospederas no se encontraron diferencias significativas entre las dos hospederas, ya que las frecuencias de detección fueron similares ($p > 0.05$) (Figura 11).

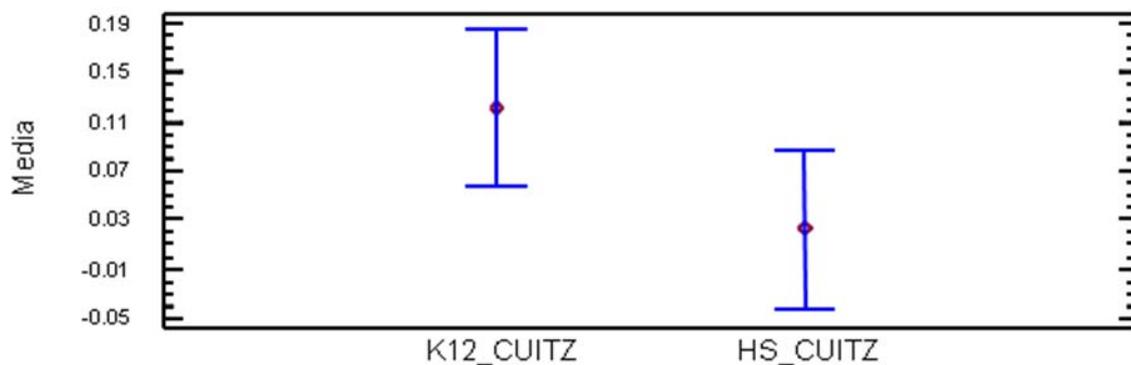


Figura 11. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas *E. coli* K12 y *E. coli* HS en río Cuitzmala ($p = 0.1301$ y 95 % de confianza) *Cuitz= río Cuitzmala.

Cuando se compararon las hospederas en los dos sistemas se encontró que si existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de detección entre las hospederas, sobretodo en el área de río Magdalena con *E. coli* K12 ($p < 0.05$) (Figura 12).

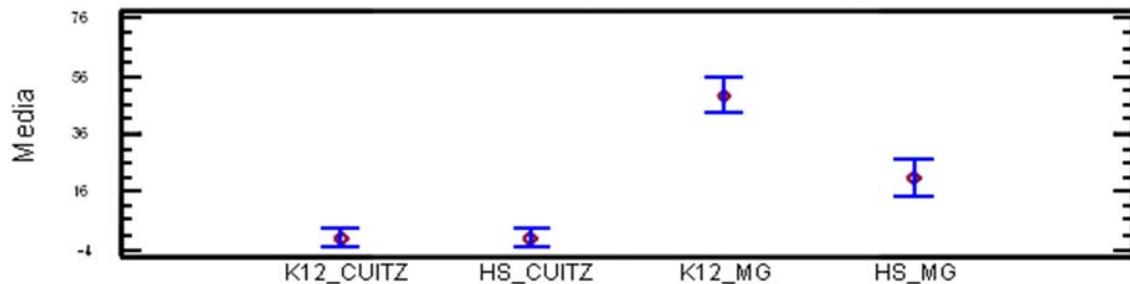


Figura 12. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas *E. coli* K12 y *E. coli* HS para ambas áreas (río Magdalena y río Cuitzmalá) ($p = 0.0000$ y 95% de confianza).

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al comparar a las bacterias hospederas en los dos áreas, incluyendo solo los datos de los sitios más cercanos a los poblados, encontrando que las frecuencias de detección de ambas hospederas en el río Magdalena son mayores en comparación del río Cuitzmalá, además de ser *E. coli* K12 la hospedera que tiene los valores de las medias más altos, pero además en Cuitzmalá las dos bacterias hospederas no presentan una variación en la frecuencia de detección entre ellas, ya que si bien *E. coli* HS registró mayor conteo que *E. coli* K12, las detecciones no fueron significativas. A diferencia de la frecuencia de detección de las muestras de río Magdalena (Figura 13).

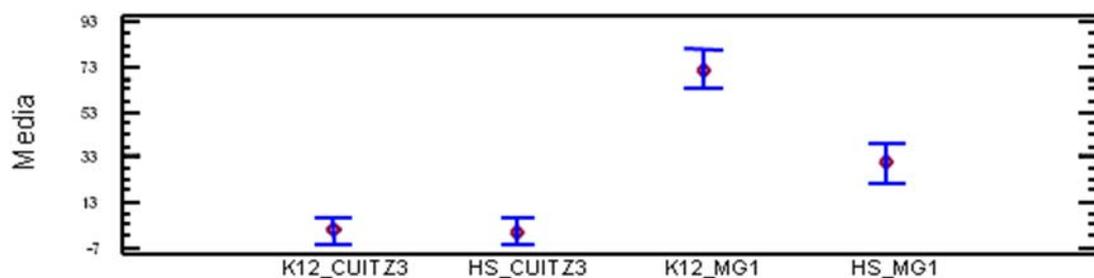


Figura 13. Prueba de medias para el conteo de colifagos con las bacterias hospederas de *E. coli* K12 y *E. coli* HS solo tomando en cuenta los datos de las muestras cercanas a los poblados Magdalena y Cuitzmalá ($p = 0.0000$ y 95% de confianza).

5.7 Estandarización del método de detección del virus de Hepatitis A

El experimento realizado para probar las condiciones de amplificación y la construcción de la curva estándar del VHA usando como control positivo *HAV RNA* (NIBSC), muestra que para el primer punto de la curva que contenía 40 genomas el C_T umbral estuvo entre el 33-34 (Figura 14).

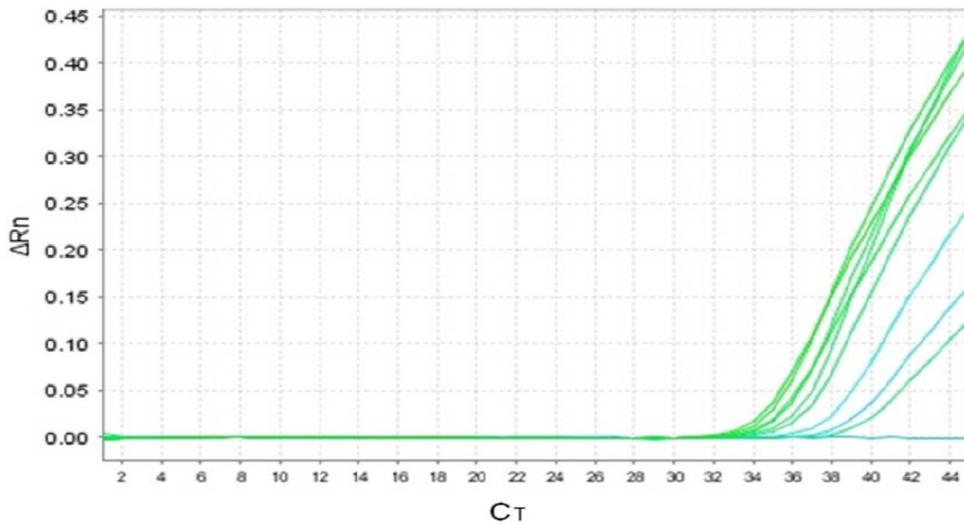


Figura 14. Amplificación de VHA usando como control el reactivo HAV RNA de NIBSC. ΔRn es la magnitud de la señal generada, C_T (threshold cycle) es el número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado.

Al usar heces de un individuo positivo para VHA como control para la amplificación y construcción de la curva estándar, se encontró que el ciclo umbral es el mismo que cuando de usó como control positivo el *HAV RNA* (NIBSC) (C_T 33-34) (Figura 15).

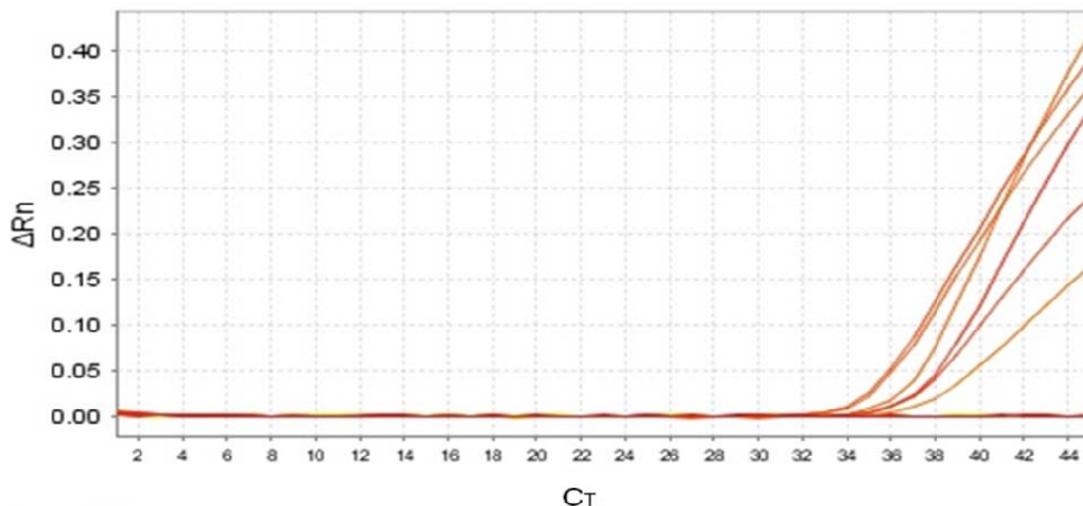


Figura 15. Amplificación del VHA usando como control positivo de heces de un individuo que dio positivo a hepatitis A. ΔRn es la magnitud de la señal generada, C_T (threshold cycle) es el número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado.

Se realizó un ensayo para ver si las condiciones de amplificación usadas para el VHA funcionaban para amplificar poliovirus. En el mismo experimento se construyeron dos curvas estándar, una de poliovirus y otra del VHA (Figura 16A y 16B).

Los resultados del ensayo muestran que el protocolo utilizado para amplificar el VHA también funciona para amplificar poliovirus. En la Figura 16 se muestra que el umbral de detección para las muestras con poliovirus vacunal fue en el ciclo 25, mientras que para las muestras que tenían como control el VHA fue en el ciclo 33 (Figura 16).

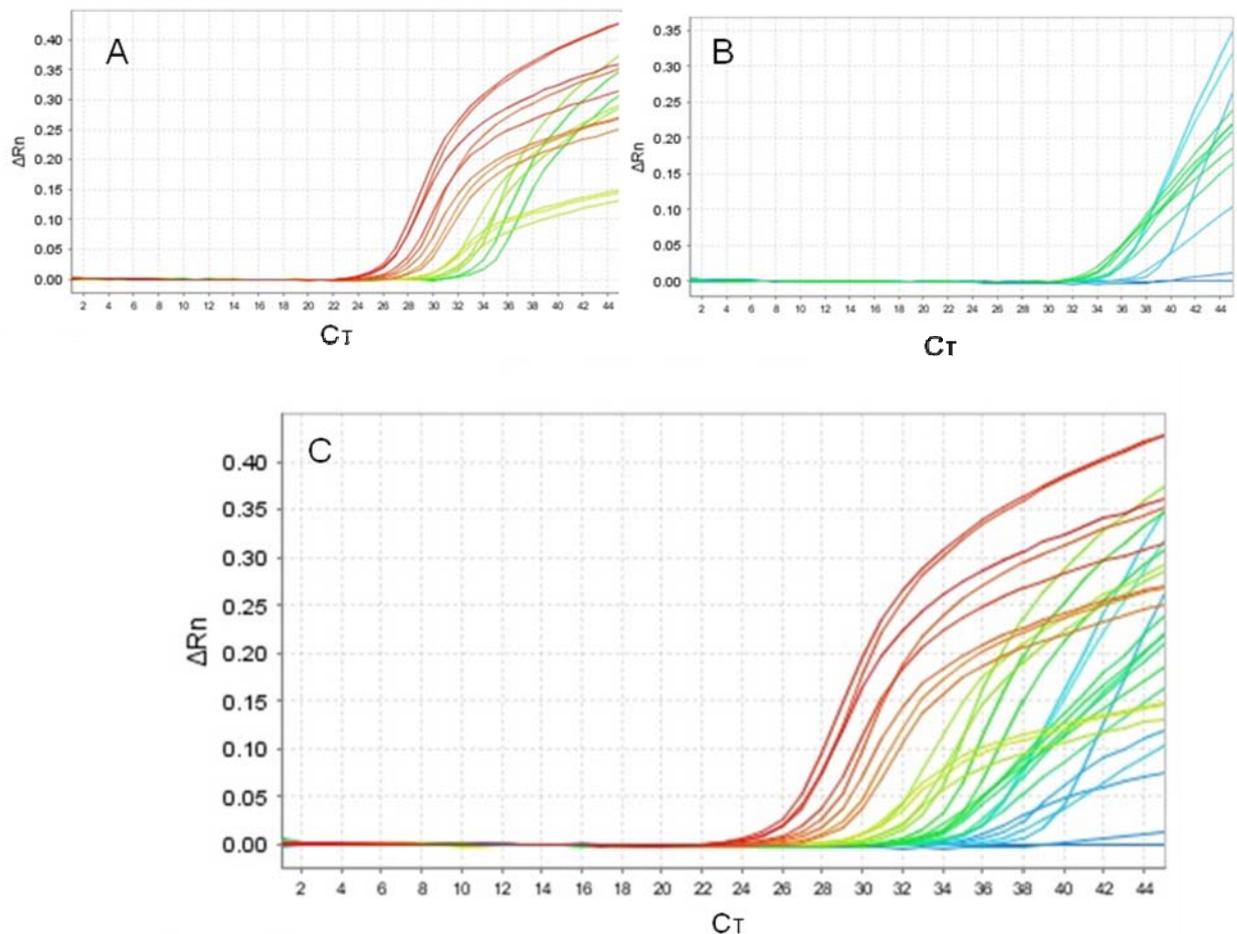


Figura 16. Gráficas de amplificación del VHA y poliovirus. En la gráfica A solo se muestran los puntos de la amplificación usando como control positivo el HAV RNA (NIBSC) (VHA); en la B se muestran solo los puntos usando el control de polio vacunal y en la C se muestra la gráfica de amplificación con ambos virus. ΔR_n es la magnitud de la señal generada, C_T (threshold cycle) es el número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado.

7. Discusión

Trabajar con muestras ambientales es relativamente complicado, ya que cada sistema presenta características particulares desconocidas, que pueden interferir con la obtención de los resultados y hacer que estos varíen dependiendo del sistema de estudio.

7.1 Colifagos

En los resultados de las muestras de río Magdalena los conteos de colifagos siempre fueron mayores en la zona urbana con respecto al área natural; esto puede atribuirse a que en áreas urbanas se tienen aportes de agua residual las cuales provienen de diversas fuentes aportando a la matriz agua y diversos elementos en cantidades variables mientras que en las áreas naturales las fuentes potenciales de contaminación son menores

En el río Cuitzmala las muestras en donde continuamente se detectaron colifagos fue en los puntos más cercanos a los poblados, sin embargo aún y cuando los conteos no fueron significativos, también hubo detecciones en las áreas alejadas de los poblados.

Como ya se mencionó, las muestras de agua que fueron analizadas para la detección de colifagos de ambos sistemas estuvieron almacenadas (-70 °C) durante un tiempo antes de realizar este estudio, lo cual probablemente causó pérdida de infectividad en los colifagos, lo cual pudo haber afectado la frecuencia y cantidad de conteo. Pero a pesar de esto, hubo detecciones lo que nos indica no solo la persistencia sino también la resistencia de estos.

Parte del trabajo se dirigió hacia el entendimiento de si alguna de las dos hospederas presentaba alguna ventaja o no en su uso a partir de la frecuencia de infección por los colifagos y facilidad de manejo de los métodos. Al analizar estadísticamente los resultados comparando la frecuencia de infección de las hospederas en el sistema de río Magdalena, se encontró que si existían diferencias significativas ya que *E. coli* K12 fue infectada por colifagos con

mayor frecuencia, mientras que las infecciones para *E. coli* HS fueron menos frecuentes.

Estos resultados se explican por las características biológicas de cada una de las hospederas, ya que la posibilidad que tengan los bacteriófagos para infectarlas dependerá principalmente de la disponibilidad de los receptores que tenga la bacteria (Havelaar y Hogeboom, 1984) y los conteos altos pueden deberse a que *E. coli* K12 es una hospedera que puede ser infectada tanto por la pared celular (colifagos somáticos) como por pilli sexual (F-específicos), además de que se debe tomar en cuenta que el medio usado para ésta bacteria no es tan selectivo y si las muestras de agua con las que se trabajó presentan otras bacterias, estas pudieron interferir con la cepa hospedera, por lo que los conteos probablemente no solo fueron los obtenidos por la infección a *E. coli* K12 (Debartolomeis y Cabelli, 1991).

Para el caso de la *E. coli* HS los conteos bajos pueden deberse a que el medio que se utiliza para esta bacteria esta complementado con antibióticos (ampicilina/estreptomicina), aprovechando el hecho de que esta cepa tienen un plásmido que le confiere resistencia a antibióticos. Esta particularidad reduce o elimina el crecimiento de las bacterias que se encontraban de manera natural en las muestras, por lo que el conteo fue solo de los colifagos que infectaron a esta hospedera (Leclerc *et al.*, 2000), resultando ser un medio más específico.

En el análisis estadístico realizado para el área de río Cuitzmala no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de detección entre las hospederas, ya que aunque *E. coli* HS detecto más colifagos comparado con los detectados por *E. coli* K12, la frecuencia de detección no fue significativa. Lo anterior podría explicarse por el tamaño de población que está contribuyendo con el aporte de agua residual al sistema, ya que en río Cuitzmala en las poblaciones más grande se tiene entre 400 a 1,000 habitantes, así como por tratarse de aportes menos diversos que en una zona urbana.

Cuando se comparó a las dos hospederas en ambos sistemas se encontró que en río Cuitzmala tanto *E. coli* K12 como *E. coli* HS no mostraban diferencias en su frecuencia de detección, pero en río Magdalena estas diferencias eran muy marcadas, ya que con *E. coli* K12 se detectaron más colifagos, lo puede estar asociado con los sistemas que están sometidos a diferentes presiones ambientales ya que el río Magdalena se encuentra en un medio urbano y el río Cuitzmala un área rural, estas condiciones pueden repercutir en la diversidad y abundancia de los colifagos.

Por lo que al usar ambas bacterias hospederas la información que se obtuvo fue complementaria, dado que cada una detecta un grupo de bacteriófagos en específico

7.2 Estandarización del RT- qPCR para VHA

En lo que respecta al análisis molecular con el virus de hepatitis A, se tuvo que cambiar de estrategia en los ensayos para su detección, ya que inicialmente se consideró estandarizar un protocolo de RT-PCR de punto final, pero se enfrentaron dos puntos limitantes. Por un lado, la cantidad de partículas de VHA en el control positivo eran bajas (80 partículas/mL) y por otro lado los límites de detección del protocolo de RT-PCR son altos. Esto ultimo coincide con lo reportado por De Paula *et al* (2007), quienes reportan que logran detectar el VHA por RT-PCR de punto final anidada en muestras que contenían cargas virales mayores a 1,700 copias/L.

Debido a estas dificultades se optó por estandarizar la técnica de RT-qPCR, el cual tiene ventajas sobre el PCR de punto final como el de ser un método de detección rápida, específica y sensible, además de generar datos cuantitativos.

Entre los trabajos que respaldan este cambio de estrategia está el de De Paula y colaboradores (2007), en el cual compara el RT-PCR en tiempo real y RT-PCR de punto final anidada, reportando que el primero es un método más sensible ya que logra detectar un 92% de las muestras, mientras que el segundo sólo logra detectar el 23% de muestras.

Una vez realizado el ensayo de qRT-PCR se logró amplificar VHA, sin embargo, la concentración de partículas virales del control positivo, tanto de las heces como el del control NIBSC eran insuficientes para realizar las diluciones necesarias para la validación del protocolo. Esto fue reconocido al evaluar el rango dinámico y determinar la eficiencia tanto de amplificación como la sensibilidad de la técnica, ya que para esta se necesita construir una curva estándar, para la cual se requieren concentraciones mínimas de 2,000 partículas/ μ L.

Al tener estas limitantes se optó por realizar un ensayo de cuantificación relativa, para reportar presencia/ausencia usando como control de amplificación la vacuna de polio vacunal (VOP). Cuando se corrió una placa en donde se colocó por separado las muestras que tenían a VHA y poliovirus se encontró que el protocolo si funcionaba para amplificar a ambos virus. Pero debido a que las sondas usadas para detectar el virus de hepatitis A y enterovirus (poliovirus) estaban marcadas con el mismo reportero (FAM en ambos) y amplifican la misma región (5'NCR), que es de las más conservadas dentro de la familia a la cual pertenecen ambos virus (*Picornaviridae*), no fue posible seguir con este ensayo dado las condiciones que se requieren, no obstante es una opción que se pretende seguir trabajando durante la maestría.

Como segunda opción se planteo en realizar un análisis cualitativo para así poder usar como control al virus de hepatitis A y reportar presencia/ausencia. Al realizar de nuevo el ensayo para corroborar que las condiciones de corrida eran las óptimas para el virus no se obtuvieron resultados positivos en la amplificación. La curva estándar resulto atípica (no se muestras estos datos) y por comentario personal de otros especialista consultados que trabajan con PCR en tiempo real atribuían la rareza de la curva a que el control posiblemente se estaba degradando.

8. Conclusiones

- Las detecciones de bacteriófagos fueron mayores con la bacteria hospedera *E. coli* K12 en el río Magdalena; mientras que en el río Cuitzmala fue *E. coli* HS, la que tuvo un frecuencia de detección ligeramente mayor, aunque no fue significativa.
- Usar ambas hospederas nos da información complementaria, ya que a *E. coli* HS (pFamp) R la infectan principalmente F-específicos (RNA o DNA), mientras que a *E. coli* K12 puede ser infectada por colifagos somáticos. Por lo tanto recomiendo el uso de ambos.
- Una de las ventajas de usar a *E. coli* HS (pFamp) R son el uso de medios con antibióticos, por lo que solo crecerán las bacterias que se están usando como hospedera, eliminando a las bacterias que la muestra pueda tener, dando como resultado que la detección de los colifagos sean solo los que infecten a *E. coli* HS. Pero con ambas es fácil el trabajo.

Perspectivas

La detección de bacteriófagos para el monitoreo de calidad de agua es una herramienta práctica y económica que permite conocer de manera indirecta la probable existencia de virus entéricos.

Por lo que el uso combinado de indicadores alternativos junto con los tradicionales permitirá obtener información más completa para analizar contaminación fecal y su posible asociación con los microorganismos patógenos como son virus entéricos. Ya que el número y tipo de patógenos que se pueden encontrar en matrices ambientales varía espacial y temporalmente.

Es recomendable contar con un control positivo idóneo si se quiere realizar ensayos de RT-qPCR. Una alternativa si no se cuenta con controles es la clonación, con la cual se puede tener la región que se desea usar como control en el proceso de amplificación. Esto no solo podrá ayudar a realizar ensayos cuantitativos, también se puede usar para ensayos de genotipificación.

Por lo que técnica de RT-qPCR para la detección y cuantificación de virus en matrices ambientales resulta una herramienta que nos permite tener resultados en poco tiempo, además que puede detectar microorganismos que son difíciles y más laboriosos cultivar como VHA o que no se ha logrado cultivar como los norovirus.

Apéndice

En uno de los ensayos realizados, donde se vio que las condiciones de amplificación empleado para hepatitis A funcionaban para detectar enterovirus, se decidió realizar un ensayo de validación del protocolo de amplificación usando polio vacunal (VOP) como control positivo. VOP contiene polio 1,2 y 3, y es de las más utilizadas como control positivo para amplificar enterovirus (polivirus, echovirus, coxsakievirus y enterovirus) que al igual que hepatitis A es miembro de la familia *Picornaviridae*, y presentan regiones del genoma muy conservadas, como la región 5'NCR usada en este ensayo, razón por lo cual creemos que es factible el uso de polio para validar el ensayo del VHA durante el proceso de extracción y amplificación del ácido nucleico (Costafreda *et al.*, 2006). Aunado a esto, se tienen reportes donde se documenta el uso de otros virus como controles internos o externos en los procesos de extracción y amplificación de hepatitis A, casos como el que reporta Di Pasquale *et al* (2010) donde usan Calicivirus felino (FCV) o Costafreda *et al* (2006) a Mengovirus (cepa vMC₀), como control interno de amplificación.

Sin embargo, el uso de otros virus como controles ya sea internos o externos, se debe hacer siempre y cuando cumplan con las características que se requieran en el ensayo, como podría ser que las T_m de los oligos para cada virus tengan diferencias mínimas para no afectar la eficiencia de alguno de ellos, y si se intenta un qRT-PCR los reporteros (fluoróforos) no deben ser los mismos.

Para este ensayo se usaron muestras previamente colectadas como parte del proyecto “Programa universitario para el manejo, uso y reúso del agua” (PUMAGUA), que fueron colectadas en las temporadas cálida-seca, cálida-lluvia y frías secas de 2009 y 2010.

En el método usado para la validación de protocolo de amplificación del VHA con poliovirus, consistió en inocular 1 µL de VOP con una cantidad aproximada de 1.17×10^4 partículas virales en volumen de 140 µL de cada muestra de agua residual

Se estimó que el RNA extraído de la muestra inoculada con polio vacunal correspondía a 9,360 partículas virales en 80 μL (117 partículas/ μL), esto debido a que el porcentaje de recuperación en la extracción es de 80%.

Según las condiciones del ensayo, en el volumen final de reacción de 30 μL cada muestra tenía 1,170 partículas, por lo que se esperaba que el ciclo de amplificación de las muestras se ubicara entre el 27 o 29; ciclos entre los que amplifican los puntos de la curva que tienen una concentración de 1400 partículas (C_T 27) y 280 partículas (C_T 29). Contrario a esto encontramos que los ciclos de amplificación fueron más altos (C_{Ts} entre 30-32) y en algunos casos se obtuvieron C_T indeterminados (Figura 17 y anexo III y IV). El valor de la pendiente fue de -3.582 y tuvo una eficiencia del 90.187% (Figura 18).

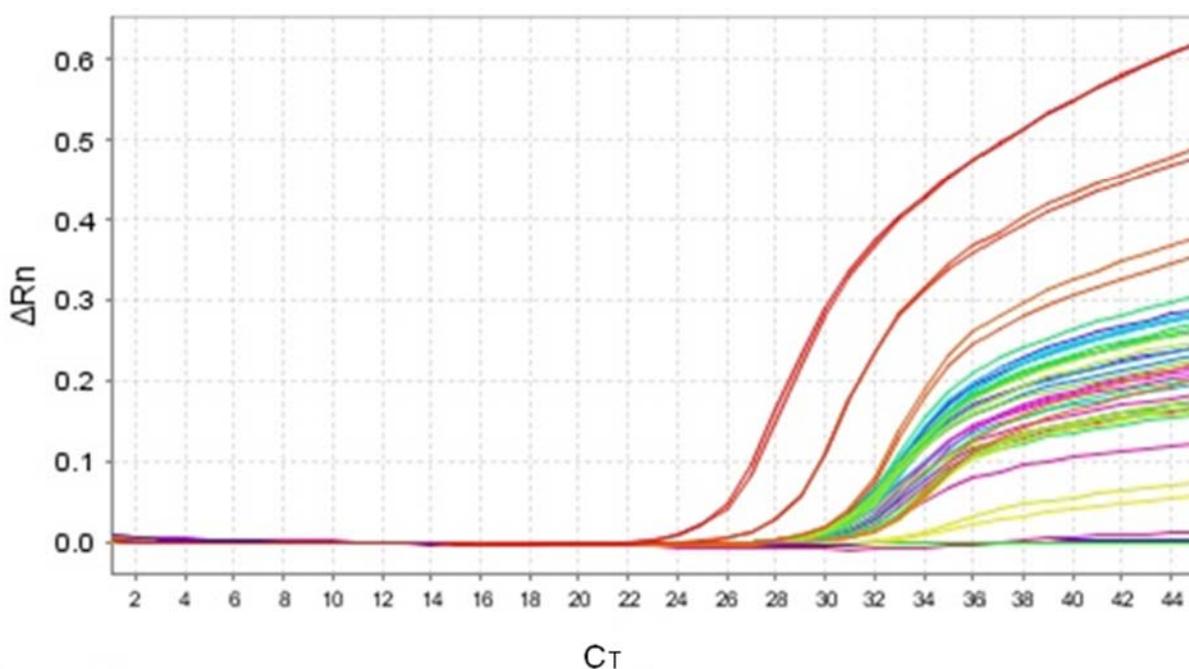


Figura 17. Amplificación de poliovirus inoculado en muestras de agua residual y usando las mismas condiciones del protocolo de amplificación del VHA. ΔR_n es la magnitud de la señal generada, C_T (threshold cycle) es el número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado

En el experimento se considero que la muestra al ser agua residual tratada posiblemente podría contener enterovirus, por lo que se esperaba que el C_T umbral disminuyera, ubicándose en el primer punto de la curva de validación o por lo menos entre ciclos 27-29 dada la concentración que se le inoculó a las

Referencias

- Abbaszadegan M., Stewart P. y LeChevallier M. 1999. A strategy for detection of virus in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2): 444-449.
- Albinana-Giménez N., Miagostovich P.M., Calgua B., Huguet M.J., Matia L. y Girones R. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research* 30; 1-9.
- Amado A.L., Villar M.L., De Paula S.V., Gaspar C.A.M. 2008. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *Journal of Virological Methods* 148: 74-80.
- Bofill M.S., Clemente C.P., Albiñana G.N., Maluquer M.C., Hundesa G.A. y Girones L.R. 2005. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista Española Salud Pública* 79 (2): 253-260.
- Bosch A. 1998. Human enteric viruses in water environment: a Minireview. *International Microbiol* 1: 191-196.
- Brion M. G., Meschke S. J. y Sobsey D. M. 2002. F- specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in water natural waters. *Water research*, 36: 2419-2425.
- Brooks A.H., Gersberg M.R y Dhar K.A. 2005. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 127:109-118.
- Carabias J. y Landa R. 2005. Agua, medio ambiente y sociedad: Hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México. Universidad Nacional Autónoma de México, El Colegio México: Fundación Gonzalo Río Arronte. México D.F, 219 pp.
- Carter J. M. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98:1354-1380.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiología y Control de Enfermedades (CENAVECE). Boletín Epidemiología Semana 33 año 2010. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem33/pdf/cua10.pdf>

- Cole D., Long C.S. y Sobsey D.M. 2003. Evaluation of F+RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6507-6514.
- Costafreda M.I., Bosch A., y Pintó M.R. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3846-3855.
- De Paula V.S., Diniz-Mendes L., Villar L.M., Luz S.L.B., Silva L.A., Jesus M.S., Da Silva N.M.V.S. y Gaspar A.M.C. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research* 41: 1169-1179.
- Debartolomeis J. y Cabelli J.V. 1991. Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of male-specific bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (5): 1301-1305.
- Di Pasquale S., Paniconi M., De Medici D., Suffredini E. y Croci L. 2010. Duplex real time PCR for detection of hepatitis A virus in shellfish using feline calicivirus as a process control. *Journal of Virological Methods* 163: 96-100.
- Donia D., Bonanni E., Diaco E. y Divizia M. 2009. Statistical correlation between enterovirus genome copy numbers and infectious viral particles in wastewater samples. *Letters in Applied Microbiology* 50: 237-240.
- Downs J.T., Cifuentes E., Ruth E. y "Mel" Suffet I. 2000. Effectiveness of natural treatment in a wastewater irrigation District of Mexico City Region: A synoptic field. *Water Environmental Research* 72(1): 4-21.
- Dubois E., Hennechart C., Merle G., Burger C., Hmila N., Ruelle S., Perelle S., y Ferré V. 2007. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *International Journal of Food Microbiology* 117: 141-149.
- Enteric viruses in drinking. 2010. Health Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/consult/_2010/enteric-enteriques/enteric-enteriques-eng.pdf
- Escalante V., Cardoso L., Ramírez E., Moeller G., Mantilla G.,

- Montecillos J., Servín C. y Villavicencio F. 2002. El reusó del agua residual tratada en México. Seminario Internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales, México.
- Espigares G.M. 2006. Virus en aguas de consumo. *Higiene y Sanidad Ambiental* 6: 173-189.
 - Espinosa A.C., Arias C.F. y Mazari-Hiriart M. 2004. Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiología* 14 (2): 166-178.
 - Espinosa C.A., Arias F.C., Sánchez C.S. y 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): 1-10.
 - Espinosa G.A.C. 2008. Presencia de virus entéricos en agua: efecto de la calidad del agua sobre su estabilidad e infectividad. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 100 pp.
 - Espinosa G.A.C. y Mazari-Hiriart M. 2009. El agua en la ciudad de México. *En: Salazar N.D., González P.C. y Barrón M.A. Foro Metropolitano primero el agua, asamblea legislativa del Distrito Federal IV Legislatura, Universidad Autónoma de México, Imagen Futura Publicidad.*
 - Feng Y.Y., Ong L.S., Hu Y.J., Tan L.X. y Ng J.W. 2003. Effects of pH and temperatura on the survival of coliphages MS2 and Q β . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:549-552.
 - Fong T.T. y Lipp K.E. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potencial water quality assement tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2): 357-371.
 - Fonseca S.M. A. 2010. Bacteriófagos como indicadores de la calidad del agua en Ciudad Universitaria. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, 54 pp.
 - Formiga C.M., Hundesa A., Clemente C.P., Albañana G.N., Allard A. y Girones R. 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*

125: 111-118.

- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Larrios. 4^a Ed. México. 217 pp.
- Gerba P.C. 2006. Bacteriophages as pollution indicators. *En: Calender R. (ed) The Bacteriophages, 2^{da} ed. Nueva York: 701.*
- Gortares M.P. y Naranjo E.J. 2001. Enfermedades propagadas por el agua, patógenos emergentes y reglamentos mundiales de agua potable. *De la llave: 30-32.*
- Grabow W. 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA 27(2): 251-268.*
- Greening E.G. 2006. Human and animal viruses in food (Including taxonomy of enteric viruses. *En: Goyal S.M. Viruses in Food ed. Springer Science and Business Media, New York, pp. 5-42.*
- Havelaar H.A y Hogeboom M.W. 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *Journal of Applied Bacteriology 56: 439-447.*
- Hernandez M.J., Leon F.J., Perez G.F., Gil S.B., y Chaidez C. 2009. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. *Journal of Applied Microbiology 106 (5): 1579-1590*
- Houde A., Guévremont E., Poitras E., Leblanc D., Ward P., Simard C., Trottier Y.L. 2007. Comparative evaluation of new TaqMan real-time assays for the detection of hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods 140: 80-89.*
- Hurst J.C. 1991. Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bulletin of the World Health Organization 69(1):113-119*
- Hurst J.C., y Reynolds A.K. 2007. Detection of viruses in environmental waters, sewage and sewage sludges, pp. 290-298. *En: Hurst J.C., Garland L.J., Mills L.A., Crawford L.R., Lipson A.D. y Stetzenbach D.L. Manual of Environmental Microbiology, American Society for Microbiology press Washinton D. C.*
- Hussain Z., Das C.B., Husain A.S., Polipalli K.S., Ahmed T., Begum N.,

- Medhi S., Verghese A., Raish M., Theamboonlers A., Poovorawan Y., y Kar P. 2006. Virological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles. *World Journal of Gastroenterology* 12(29): 4683-4688.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011. <http://www.inegi.org.mx/>
 - ISO, 1995. 10705-1: Water quality—Detection and enumeration of bacteriophages-part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization
 - Jacobsen H.K y Koopman S.J. 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiology and Infection* 132: 1005–1022.
 - Jemba K.P. 2004. *Environmental Microbiology. Principles and Applications*. Science Publisher, Inc. USA.
 - Jiang C.S. 2006. Human Adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A Critical Review. *Environmental Science and Technology* 40 (23): 7132-7140.
 - Jiménez B. 2006. Irrigation in Developing Countries Using Wastewater. *International Review for Environmental Strategies* 6 (2): 229-250.
 - Jimenez B. y Chávez A. 2004. Quality assessment of an aquifer recharged with wastewater for its potential use as drinking source: “El Mezquital Valley case”. *Water Science and Technology* 50(2): 269-276.
 - Jiménez B.C. y Torregrosa M.L. 2009. El servicio del agua como prioridad política. *En: Salazar N. D., González P.C. y Barrón M.A. Foro Metropolitano Primero el Agua, Asamblea Legislativa del Distrito Federal IV Legislatura, Universidad Autónoma de México, Imagen Futura Publicidad*, 183 pp.
 - Jofre J. 2002. Bacteriophage Indicators. *En: Bitton G. (ed.) Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Nueva York: 354-363.
 - Jothikumar N., Cromeans T.L., Sobsey M.D., y Robertson B.H. 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 3359-3363.

- Kaboré H., Levallois P., Michel P., Payment P., Déry P. y Gingras S. 2010. Association between potential zoonotic enteric infections in children and environmental risk factors in Quebec, 1999-2006. *Zoonoses and Public Health* 57: 195-295.
- Khaled H., Abd El Galil., El Sokkary A.M., Kheira M.S., Salazar M.A., Yates V.M. Chen W., y Mulchandani A. 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 7113-7116.
- Kiulia M.N., Netshikweta R., Page A.N., van Zyl B.W., Kiraithe M.M., Nyachio A., Mwenda M.J. y Taylor B.M. 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: 818-828.
- Koopmans M. y Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90: 23-41.
- Leclerc H., Edberg S., Pierzo V. y Delattre M.J. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology* 88: 5-21.
- Long C.S. y Sobsey D.M. 2004. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of Water and Health* 2(1): 15-22.
- Long C.S., El-Khoury S.S., Oudejans G.S., Sobsey D.M. y Vinjé J. 2005. Assessment of sources and diversity of Male-Specific coliphages for source tracking. *Environmental Engineering Science* 22(3): 367-377.
- Mazari-Hiriart M., López Vidal. Y., Ponce de León S., José C.J., Rojo C.F. y Castillo R.G. 2005. Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the México City Metropolitan Area water supply system. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5129-5137.
- Mazari-Hiriart. M., Ponce de León S., López Vidal Y., Islas P., Amieva Fernández R.I., y Quiñones F. 2008. Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *Plos One* 3 (5): 1-8.
- Mendez J., Jofre J., Lucena F., Contreras N., Mooijman K. y Araujo R. 2002. Conservation of phage reference material and water samples

- containing bacteriophages of enteric bacteria. *Journal of Virological Methods* 106:215-224.
- Monges M.Y.L. 2009. Calidad del agua como elemento integrador para la rehabilitación del río Magdalena, Distrito Federal. Tesis de maestría, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 77 pp.
 - Mooijman A.K., Bahar M., Muniesa M. y Havelaar H.A. 2002. Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *Journal of Virological Methods* 103: 129-136.
 - Moreira D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research* 26(13): 3309-3310.
 - Muniesa M. y Jofre J. 2004. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 65-76.
 - Nasser M.A., y Oman D.S. 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research* 33 (7): 1748-1752.
 - Noble T.R., Moore F.D., Leecaster K.M., McGee D.C. y Weisberg B.S. 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research* 37: 1637-1643.
 - Ogarzaly L., Tissier A., Bertrand I., Maul A. y Gantzer C. 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research* 43: 1257-1264.
 - Ogorzaly L. y Gantzer C. 2006. Development of real time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138: 131-139.
 - Park E.J., Ahn S.T., Lee J.H. y Lee O.Y. 2006. Comparison of total and fecal coliforms as fecal indicator in eutrophicated surface water. *Water Science and Technology* 54(3): 185-190.
 - Payment P. y Locas A. 2010. Pathogens in water: value and limits of

- correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49(1): 4-11.
- Percial L.S., Chalmers M.R., Embrey M., Hunter R.P., Sellwood J., Wyn J.P. 2004. *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier Academic Press, New York.
 - Pillai S.D. 2006. Bacteriophages as fecal indicator organisms. En: Goyal S. M. *Viruses in foods. Food Microbiology and Food Safety*, Ed. Springer: 205-222.
 - Pina S. 2001. *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Barcelona, España 280 p.
 - Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre F., y Girones R. 1998. Viral pollution in the environmental and shellfish: human adenoviruses detection by PCR as an index of human virus. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9): 3376-3382.
 - Polaczyk L.A., Narayanan J., Cromeans L.T., Hahn D., Roberts M.J., Amburgey E.J. y Hill R.V. 2008. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of Microbiological Methods* 73: 92-99.
 - Poovorawan Y., Chatchatee P., y Chongsriawat V. 2002. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: A global perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 155-166.
 - PUEC-UNAM- GDF. *Reporte ejecutivo de acciones 2007-2011*.
 - Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G. y Girones R. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (8): 2963-2970.
 - Purcell H.R. y Emerson U.S. 2008. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *Journal of Hepatology* 48: 494-503.
 - Queiroz A.P.S., Santos F.M., Sassaroli A., Hársi C.M., Monezi T.A y Mehnert D.U. 2001. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors form sewage and water samples. *Applied Environmental Microbiology* 67(10): 4614-4618.
 - Reynolds A.K. y Pepper L.I. 2009. "Microorganisms in the environment"

En: Maier M.R., Pepper L.I. y Gerba P.C. Environmental Microbiology. Academic Press, New York.

- Rojas M.E. 2010. Valoración contingente del servicio ecosistémico del agua en la cuenca Cuitzmala, Jalisco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Economía, Universidad Nacional Autónoma de México, 186 pp.
- Sair I.A., D'Souza D.H y Jaykus L.A. 2002. Human enteric viruses as causes of foodborne diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1: 73-89.
- Sánchez G., Populaire S., Butot S., Putallaz T. and Joosten H. 2006. Detection and differentiation of human hepatitis A strains by commercial quantitative real-time RT-PCR tests. *Journal of Virological Methods* 132: 160-165.
- Santos G.J., Guerrero M.L., Reyna C.R. y Mejía V.G. 2009. Marco legislativo del suministro de agua en México. *Revista Panamericana de Salud Pública* 26(6): 549-552.
- Savichtcheva O. y 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: 2463-2476.
- Schaper M. y Jofre J. 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of fecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* 89: 1-10.
- Seymour J.I. y Appleton H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* 91: 759-773.
- Shan C.X., Wolfs P., y Griffiths W.M. 2005. Rapid and quantitative detection of hepatitis A virus from green onion and strawberry rinses by use of real-time reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5624-5626
- Shay F.G., Martinson C.B., Moyer W.N.M. y Dahling R.D. 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6): 3158-3164.

- Silva M.M. A. Uso de indicadores virales para la evaluación de la calidad de agua potable y de reusó en ciudad universitaria, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México (en preparación).
- Skraber S., Gassilloud B. y Gantzer C. 2004. Comparasion of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river wáter. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3644-3649.
- Skraber S., Ogorzaly L., Helmi K., Maul A., Hoffmann L., Michel C.H. y Gantzer C. 2009. Ocurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research* 43: 4780-4789.
- Stewart P.J., Daugomah W.J., Chestnut E.D., Graves A.D., Sobsey D.M. y Scott I.G. 2006. F+ RNA coliphages typing for microbial source tracking in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1015-1026.
- Strauss H.J. y Strauss G.E. 2008. *Viruses and Human Diseases*. Academic Elsevier, Amsterdam: 468.
- Tanaka J. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18:57-60.
- Tapia C.R., Santos J.I., Cavalcanti A.M., Urdaneta E., Rivera L., Manterola A., Potin M., Ruttiman R., y Tanaka K.J. 1999. Hepatitis A in Latin América: A changing epidemiologic pattern. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 61(5): 825-829.
- Toledo A. 2009. Agua, hombre y paisaje. *En: Salazar D., Núñez, C., González P. y Barrón M. A. Foro Metropolitano primero el agua, asamblea legislativa de Distrito Federal IV Legislatura, Universidad Autónoma de México. Imagen Futura Publicidad.*
- Toranzos A.G., McFeters A.G., Borrego J.J., y Savill. M. 2007. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters, 249-260. *En: Hurst J.C., Garland L.J., Mills L.A., Crawford L.R., Lipson A.D. y Stetzenbach D.L. Manual of Environmental Microbiology, ASM Press Washinton D. C.*
- Toze S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* 33(17): 3545-3556.

- US Environmental Protection Agency (US EPA). 2001. Method 1602: Male-specific (F⁺) and Somatic Coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure, Washington D. C.
- Valdespino J.L., Ruiz G.J., Olaiz F.G., Arias T.E., Conde G.C.J., Palma O. y Sepúlveda J. 2007. Seroepidemiología de la hepatitis A en México. Sensor de inequidad social e indicador de políticas de vacunación. Salud pública de México 49:377-385
- World Health Organization. 2003. Emerging issues in water and infectious disease. http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf
- World Health Organization. 2011. Guidelines for drinking-water quality 4thed. WHO, Prees Geneva, Switzerland.
- Yates M.V. 2007. Classical indicators in the 21st century far and beyond the coliform. Water Environment Research 79(3):279-285.

Anexos

Anexo I. Presencias y ausencias de colifagos detectados con las hospederas en el área de río Magdalena, Distrito Federal.

SITIOS DE MUESTREO- CLAVE		2008				2009			
		Lluvias		Secas		Lluvias		Secas	
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> HS						
Origen del río	AN0	*	*	*	*	—	—	—	—
Segundo Dinamo	AN4	—	+	*	*	*	*	—	—
Planta potabilizadora 2 Magdalena Contreras	AN5	—	—	*	*	*	*	*	*
R. Magdalena antes del R. Eslava	ZU3	+	+	*	*	*	*	+	+
Ambos ríos	ZU5	*	*	+	+	*	*	+	+
Atrás del hospital	ZU9	+	+	+	+	*	*	+	+
Presa Anzaldo	ZU10	*	*	*	*	+	+	+	+
Viveros de Coyoacán	ZU11	*	*	*	*	+	+	+	+

* significa que no se proceso esa muestra.

Anexo II. Presencias y ausencias de colifagos detectados con las hospederas en el área de río Cuitzmala, Jalisco.

SITIOS DE MUESTREO- CLAVE		2008		2009			2010		
		Lluvias		Lluvias		Secas	Secas		
		<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> HS						
Río 2	R2	—	—	*	*	—	—	*	*
Río 3	R3	—	—	*	*	—	—	*	*
Río 4	R4	*	*	*	*	+	—	*	*
Vena 2	V2	—	—	*	*	—	+	*	*
Vena 4	V4	—	+	*	*	—	—	*	*
Pozo Careyes	P1	—	—	*	*	—	—	*	*
Pozo Francisco Villa	P2	—	+	*	*	—	+	*	*
Laguna Corte 2 (centro)	LC2	—	+	*	*	—	+	*	*
Laguna de corte 3 (orilla)	LC3	—	—	*	*	—	—	*	*
Laguna Principal 1 (orilla)	LP1	—	+	*	*	—	—	*	*
Laguna Principal 2 (centro)	LP2			*	*	+	—	*	*
La ECA	ECA	—	+	*	*	—	—	*	*
Jirosto	JIR	+	+	*	*	—	+	*	*
San Miguel	SM	+	+	*	*	—	+	*	*
El Salto	SAL	—	+	*	*	—	—	*	*
Camalote entrada	CE	*	*	*	*	*	*	+	+
Camalote salida	CS	*	*	+	—	*	*	+	—
La ECA entrada	ECAE	*	*	+	—	*	*	—	—
La ECA salida	ECAS	*	*	—	—	*	*	—	—

Jirosto entrada	JE	*	*	-	+	*	*	-	-
Jirosto salida	JS	*	*	-	-	*	*	-	-
San Miguel entrada	SME	*	*	-	+	*	*	-	-
San Miguel salida	SMS	*	*	*	*	*	*	-	-
El Chino	CH	*	*	-	+	*	*	-	-
Canal Jirosto	CJ	*	*	-	+	*	*	-	-
Canal Francisco Villa	CV	*	*	+	-	*	*	-	-
Laguna de oxidación San Miguel	SMO	*	*	+	+	*	*	+	+

* no se proceso muestra.

Anexo III. Claves de las muestras de agua residual usadas en el ensayo de RT-qPCR con polio vacunal.

Nombre de la muestra	Clave	Temporada
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 1	PTICP CL1	Cálida-lluvias
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 2	PTICP CL2	Cálida-lluvias
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 3	PTICP CLP3	Cálida-lluvias
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 1	PTICP CSP1	Cálida- seca
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 2	PTICP CSP2	Cálida- seca
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 3	PTICP CSP3	Cálida- seca
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 1	PTICP FSP1	Fría-seca
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 2	PTICP FSP2	Fría-seca
Planta de tratamiento Ciencias Políticas – influyente. Semana 3	PTICP FSP3	Fría-seca
Planta de tratamiento Cerro del Agua – influyente. Semana 1	PTICA CSP1	Cálida- seca
Planta de tratamiento Cerro del Agua – influyente. Semana 2	PTICA CSP2	Cálida- seca

Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 1	TF M1P	Fría
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 2	TF M2P	Fría
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 1	TS M1P	Seca
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 2	TS M2P	Seca
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 3	TS M3P	Seca
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 1	TLL M1P	Lluvias
Planta de tratamiento Cerro del agua. Semana 2	TLL M2P	Lluvias

Muestras corresponden a proyecto PUMAGUA, 2009 y 2010.

Anexo IV. CT (ciclo del treshold) y concentración promedio de poliovirus en las muestras de agua residual inoculadas y en los puntos de la curva estándar.

Muestra	CT Promedio	Concentración
PTICP CL1	32.02032	65.4631424
PTICP CL2	30.18284	213.2805328
PTICP CL3	30.24447	206.1959229
PTICP CS1	Indeterminado	Indeterminado
PTICP CS2	30.36731	189.332489
PTICP CS3	31.28972	105.5261383
PTICP FS1	30.92254	153.4927063
PTICP FS2	30.24508	205.6968994
PTICP FS3	30.63887	158.9029236
PTICA CS2	30.26287	203.5491943
PTICA CS1	30.01012	238.3180237
TF M1P	Indeterminado	Indeterminado
TF M2P	Indeterminado	Indeterminado
TS M1P	30.19842	210.9268951
TS M2P	30.66804	161.2154999
TS M3P	31.06858	121.0865402
TLL M1P	30.79021	144.7371521
TLL M2P	31.68958	81.55230713