



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**EVALUACIÓN DE RIESGO POR VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA Y HORTALIZAS DE  
XOCHIMILCO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**NALLELY VÁZQUEZ SALVADOR**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
COMITÉ TUTOR: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH  
INSTITUTO DE GEOGRAFÍA  
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**EVALUACIÓN DE RIESGO POR VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA Y HORTALIZAS DE**  
**XOCHIMILCO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**NALLELY VÁZQUEZ SALVADOR**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
COMITÉ TUTOR: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH  
INSTITUTO DE GEOGRAFÍA  
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 27 de abril de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna VÁZQUEZ SALVADOR NALLELY con número de cuenta 303142874 con la tesis titulada "EVALUACIÓN DE RIESGO POR VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA Y HORTALIZAS DE XOCHIMILCO", bajo la dirección de la DRA. MARISA MAZARI HIRIART:

Presidente:	DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
Vocal:	DR. MIGUEL ÁNGEL TORRES VEGA
Secretario:	DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
Suplente:	DR. LUIS ZAMBRANO GONZÁLEZ
Suplente	DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de julio de 2015.

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de realizar la maestría en su programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A mi tutora, la Dra. Marisa Mazari Hiriart porque por segunda ocasión me ha dado su asesoría, por tener confianza en mí y por el apoyo que me ha brindado en esta etapa de culminación. Eres una persona admirable y un ejemplo a seguir.

A los miembros del comité tutor, a la Dra. Silke Cram Heydrich por su valiosa participación durante cada evaluación tutorial, por sus revisiones y comentarios respecto a este trabajo.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por permitirme realizar los experimentos en el Laboratorio de Virología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por su apoyo incondicional, por los conocimientos que me ha brindado, por su humanidad, por las aportaciones en cada tutorial y por sus revisiones.

## Agradecimientos a título personal

A la UNAM excelente universidad que hace un par de años me recibió con los brazos abiertos, la cual se ha convertido en mi segunda casa y que me ha permitido conocer personas estupendas.

A los miembros del jurado, al Dr. Javier Carmona Jiménez, al Dr. Miguel Ángel Torre Vega y al Dr. Luis Zambrano González por sus revisiones y comentarios.

A la Dra. Ana Cecilia Espinosa García, aunque no formó parte oficial de este proyecto, sus consejos y conocimientos fueron fundamentales.

A Xavier, propietario de las parcelas en las que trabajé en San Gregorio Atlapulco, Xochimilco.

A mis amigos del Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad del Instituto de Ecología, Chucho, Omar, Toño, Miguel, Caro, Stephanie, Elisa, Jannice, Adriana Pérez, Julio, Paty, Erick, Ramón, Ale, Rosa, Tere, Gustavo, gracias por su presencia y felicidad, qué sería del laboratorio sin ustedes. A Eduardo, Stephanie y Elisa por acompañarme de muestreo.

A todos los amigos del Laboratorio de Virología de la Facultad de Veterinaria por aquellas convivencias académicas y no académicas. Agradezco a Rosa Elena, Tere, Susana y Juan Carlos el apoyo técnico y cada minuto en el lab, gracias por aceptar una más en su espacio. Mario gracias por la amistad brindada y cada momento de alegría. Los quiero mucho y los extraño más.

Víctor gracias por las innumerables experiencias durante tanto tiempo, gracias por tu valiosa compañía y amistad. Alejandro gracias por esa amistad, siempre agradeceré a ti y a Omar el que hayan compartido conmigo ese tan apreciado campeonato del Galaxy. Agradezco a mis queridas roomies Joselin y Claudia y a todos esos grandes amigos que la trayectoria académica me ha dejado, José, Sacbel, Martha, Rubén, Diana Laura, Ramiro, Gerardo, Oso, Verónica, Erendira, Ulianov, Itzi, Pablo, Poncho y Paco. A pesar de que no los veo con la misma frecuencia, cada uno de ustedes hace que mi vida sea más feliz.

## Dedicatoria

### A mi familia

A mis padres Antonio y Eugenia.

A mis hermanos Caín, Carmina y Jahir.

A mis adorados sobrinos Ángel y Arturo.

A aquellos compañeros que se han ido, pero de alguna manera están a mi lado, Pelusa, Negra, Camila, Blas, Sombra y aquellos que siguen en el camino Peluso, Miausa y Camila.

A cada uno de ustedes agradezco su entusiasmo y la confianza que han depositado en mí, gracias por soportar mi humor, gracias por apoyar mis ideales. Gracias niños por hacerme sonreír.

Es muy triste para mí el despedirme de ustedes cada fin de semana.

Los quiero, los admiro y los extraño.

# Índice

Resumen.....	1
Abstract .....	2
1 Introducción .....	4
1.1 Virus patógenos transmitidos por agua y alimentos: implicaciones en la salud pública .....	4
1.1.1 Rotavirus .....	5
1.1.2 Enterovirus .....	6
1.1.3 Hepatitis E .....	8
1.1.4 Factores que afectan la presencia de virus .....	9
1.2 Estudio de los virus en el agua .....	10
1.2.1 Evaluación de riesgo.....	11
1.3 Monitoreo e indicadores de contaminación fecal .....	11
1.4 Uso del agua residual en Xochimilco.....	13
2 Justificación .....	14
3 Hipótesis y objetivos .....	15
3.1 Hipótesis.....	15
3.2 Objetivo general.....	15
3.3 Objetivos particulares .....	15
4 Métodos .....	16
4.1 Métodos de campo .....	16
4.1.1 Ubicación geográfica .....	16
4.1.2 Muestreo .....	16
4.1.3 Mediciones <i>in situ</i> .....	20
4.1.4 Radiación Ultravioleta .....	20
4.2 Análisis experimentales.....	20
4.2.1 Filtración a través de membrana de las muestras sin concentrar .....	20
4.2.2 Concentración de muestras de agua y lechugas .....	21
4.2.3 Doble capa de agar.....	22
4.2.4 Sistema Integrado de Cultivo Celular y Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa .....	23
4.2.4.1 Rotavirus .....	23
4.2.4.1.1 Células y virus.....	23
4.2.4.1.2 Determinación de la infectividad .....	23
4.2.4.1.3 Titulación de las muestras que causaron efecto citopático por TCID <sub>50</sub> .....	24

4.2.4.1.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	24
4.2.4.1.5 Extracción de RNA con el kit QIAamp MinElute Virus Spin.....	25
4.2.4.1.6 RT-PCR.....	25
4.2.4.1.7 Límite de detección de la RT-PCR.....	26
4.2.4.1.8 Controles de la RT-PCR.....	27
4.2.5 Enterovirus.....	27
4.2.5.1 Extracción de ácidos nucleicos y purificación.....	27
4.2.5.2 RT-PCR.....	28
4.2.5.3 Límite de detección.....	29
4.2.5.4 Controles de la RT-PCR.....	30
4.2.5.5 Secuenciación.....	31
5 Resultados.....	31
5.1 Mediciones <i>in situ</i> .....	31
5.1.1 Parámetros fisicoquímicos.....	31
5.1.2 Radiación Ultravioleta.....	32
5.2 Indicadores de contaminación fecal.....	32
5.2.1 Coliformes fecales.....	32
5.2.2 Enterococos fecales.....	33
5.2.3 Colifagos.....	35
5.3 Rotavirus.....	36
5.3.1 Límite de detección.....	36
5.3.2 ICC/RT-PCR.....	36
5.4 Enterovirus.....	37
5.4.1 Límite de detección.....	37
5.4.2 RT-PCR.....	37
5.4.3 Secuenciación.....	42
6. Discusión.....	46
7. Conclusiones.....	50
8. Recomendaciones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexo.....	60

## Índice de Tablas

Tabla 1. Factores que afectan la estabilidad de los virus entéricos en ambientes acuáticos. Adaptado de Bosch <i>et al.</i> , 2006 y Saavedra <i>et al.</i> , 2012. ....	9
Tabla 2. Comparación de dosis reportadas en mJ/cm <sup>2</sup> para la reducción de 1 (90%), 2 (99%), 3 (99.9%) y 4 (99.99%) logaritmos de diferentes virus entéricos (Health Canada, 2011). ....	10
Tabla 3. Estabilidad de los virus entéricos sobre alimentos que son consumidos en crudo. TA: Temperatura Ambiente. Adaptado de Rzezutka y Cook, 2004. ....	10
Tabla 4. Distribución temporal de los cinco muestreos realizados en Huerta y Tlilac.....	19
Tabla 5. Títulos virales correspondientes a cada dilución seriada para calcular el límite de detección de la RT-PCR para la detección de RV. ....	26
Tabla 6. Secuencias de primers utilizados en la RT-PCR para la detección de rotavirus y enterovirus. nt: nucleótidos, pb: pares de bases. * Posición de los nucleótidos con respecto a la cadena rotavirus de simio A/SA11, segmento 6. Acceso en GenBank: AY187029.1 ** Posición de los nucleótidos con respecto a la cadena Sabin 1, poliovirus humano. Acceso en GenBank: V01150.1. ....	29
Tabla 7. Títulos virales de la VAO correspondientes a cada dilución seriada para calcular el límite de detección de la RT-PCR de la detección de EV. ....	30
Tabla 8. Promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados durante los cinco muestreos en el agua de los canales que se utiliza en el riego de las parcelas agrícolas, Huerta y Tlilac.....	31
Tabla 9. Datos mínimos, máximos y promedios con desviación estándar de la radiación UV-A correspondientes a cada uno de los muestreos, obtenidos de la estación meteorológica del Pedregal del SIMAT. ....	32
Tabla 10. Resumen del tratamiento de las muestras positivas a enterovirus que fueron sometidas a la purificación. (-) y (+) indican muestras negativas y positivas respectivamente a RT-PCR. ....	38
Tabla 11. Concentración de ácidos nucleicos de las muestras positivas a EV .....	39
Tabla 12. Títulos virales calculados para las muestras positivas por ICC/RT-PCR.....	40
Tabla 13. Semanas Nacionales de Vacunación de 2013 y 2014.....	41
Tabla 14. Similitud de las muestras positivas a enterovirus con secuencias del GenBank.....	42

## Índice de Figuras

Figura 1. Localización de las parcelas Huerta y Tlilac en San Gregorio Atlapulco, Xochimilco. ....	18
Figura 2. Esquema de muestreo.....	19
Figura 3. Conteos de coliformes fecales (CF) en las muestras de agua de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996.....	33
Figura 4. Conteos de CF en la superficie de lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. ....	33
Figura 5. Conteos de enterococos fecales (EF) en las muestras de agua de Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en Warrinton, 1981.....	34
Figura 6. Conteos de EF sobre la superficie de las lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. ....	35
Figura 7. Conteos de colifagos en el agua de Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en Carolina del Norte, EU (Stiegel <i>et al.</i> , 2013). ....	35
Figura 8. Conteos de colifagos en lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco.....	36
Figura. 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Reamplificación. MP: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb); CN: Control negativo; 3 a 17: muestras positivas; +: Control positivo (Vacuna Antipoliomielítica Oral). Tamaño del fragmento 194 pb. ....	40
Figura 10a. Alineación de secuencias de nucleótidos de la región no codificante de los poliovirus tipo I. ....	44
Figura 10b. Árbol filogenético construido entre las secuencias obtenidas de poliovirus tipo I presente en las muestras de agua y lechugas.....	45
Figura 11. Parámetros fisicoquímicos asociados al porcentaje de muestras positivas a enterovirus por la técnica de ICC/RT-PCR.....	60

## **Abreviaturas (por orden alfabético)**

ATCC American Type Culture Collection

Birmex Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CF Coliformes fecales

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECP Efecto Citopático

EF Enterococos fecales

EV Enterovirus

HEV Hepatitis E

ICC/RT-PCR Sistema Integrado de Cultivo Celular y PCR con Transcriptasa Reversa

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses

NCBI National Center for Biotechnology Information

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS Buffer Fosfato Salino

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PRRS Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

PTAR Planta de tratamiento de Aguas Residuales

QMRA Quantitative Microbial Risk Assessment

RV Rotavirus

SFB Suero Fetal Bovino

SIMAT Sistema de Monitoreo Atmosférico del Distrito Federal

TCID<sub>50</sub> Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos 50%

TYGB Tryptone-Yeast Extract-glucose Broth

UFC Unidades Formadoras de Colonia

UFP Unidades Formadoras de Placa

USEPA Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

UV Radiación Ultravioleta

VAO Vacuna Antipoliomielítica Oral

## Resumen

La materia orgánica e inorgánica, los sólidos suspendidos, los nutrientes, los compuestos químicos y los microorganismos como bacterias, parásitos y virus son los componentes más comunes del agua residual. Los virus se transmiten a través de diferentes vías como son el agua y los alimentos, destacando aquellos que se consumen crudos. La ruta fecal-oral es la principal vía por la que se propagan los virus, en las heces de un individuo infectado se evacuan hasta  $10^{11}$  partículas virales por gramo de heces, por lo que a través de la descarga de desechos los virus son dispersados en el medio acuático. Además de la tasa de excreción, el tratamiento inadecuado de las aguas residuales contribuye a la presencia de los virus en esta matriz ambiental, lo cual representa una amenaza para la salud pública, pues los virus sólo requieren de dosis infecciosas bajas para ocasionar enfermedades.

Del agua residual previamente tratada y no tratada que se usa para el riego agrícola se obtienen beneficios, por ejemplo, su alto contenido de nutrientes funciona como fertilizante natural, sin embargo, existe un riesgo para los consumidores de los productos regados con este tipo de agua debido a la presencia de patógenos. Uno de los agroecosistemas más productivos de la ciudad de México es Xochimilco, en el cual el agua residual o residual tratada de su sistema de canales es utilizada para producir flores, forraje, maíz y verduras.

En el periodo comprendido de agosto de 2013 a abril de 2014 se trabajó en dos matrices ambientales: agua de reúso utilizada para el riego y 84 lechugas regadas con la misma, en dos parcelas agrícolas de San Gregorio Atlapulco, comunidad perteneciente a la delegación Xochimilco.

En ambas matrices, se realizó la detección de indicadores de contaminación fecal: coliformes fecales, enterococos fecales y colifagos, estos últimos utilizados también como modelos de virus entéricos debido a su similar comportamiento en el ambiente. Los resultados arrojaron niveles de los indicadores por encima de lo establecido en diferentes criterios nacionales e internacionales.

Además, con esas mismas muestras se evaluó la capacidad de cuatro grupos virales para producir infecciones o efecto citopático en la línea celular MA104 y se realizó su búsqueda por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR

por sus siglas en inglés), la unión de ambas técnicas es conocida como un Sistema Integrado de Cultivo Celular y RT-PCR (ICC/RT-PCR).

A las muestras que causaron efecto citopático se les realizó RT-PCR para la búsqueda de rotavirus, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, hepatitis E y enterovirus. De los cuatro grupos virales estudiados el único que resultó positivo a las pruebas moleculares fue enterovirus, por lo que se concluyó que ese grupo fue el agente responsable del efecto citopático observado en las células. Posteriormente se realizó la secuenciación de las muestras positivas por ICC/RT-PCR y se determinó que poliovirus tipo I fue el agente presente en las muestras ambientales. La presencia de poliovirus tipo I indica la circulación de cepas vacunales en el agua residual con títulos virales calculados entre  $10^3$  y  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL (Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos 50) referida como la dosis capaz de infectar al 50% de las células.

Se confirmó que las cepas vacunales de poliovirus están circulando todo el año en el medio, tanto en agua como en lechugas, la Organización Mundial de la Salud sugiere que el riesgo de la inmunización constante no altera la erradicación global de la poliomielitis.

## **Abstract**

The most common components in wastewater are organic and inorganic matter, suspended solids, nutrients, chemical compounds and microorganism such as bacteria, parasites and viruses. Regarding viruses these are transmitted through different matrices as water and food, taking particular importance those consumed raw. The fecal-oral route is the main via by which viruses are spread; in the feces of an infected individual are evacuated approximately  $10^{11}$  viral particles per gram of stool, then through waste discharge the virus can be dispersed in the aquatic environment. In addition to the rate of excretion, inadequate treatment of wastewater contributes to the presence of the virus in this environmental matrix, which represents a threat to public health because viruses require low infectious doses to cause disease.

Wastewater previously treated and not treated for agricultural irrigation has benefits like its high nutrient content that acts as natural fertilizers, however there is a risk for consumers of products because the presence of pathogens. One of the most productive

agroecosystems in Mexico City is Xochimilco. Wastewater and treated wastewater from their canal system is used to produce flowers, fodder, corn and vegetables.

In the period between August 2013 and April 2014 we worked with two environmental matrices: reused water for irrigation and 84 lettuces irrigated with it, in two agricultural plots of San Gregorio Atlapulco, community belonging to the Xochimilco.

In both matrices, detection of fecal indicator bacteria (fecal coliforms and fecal enterococci) and virus used as models of the behavior of enteric viruses (coliphages) was performed. The results showed levels of the indicators above the established different national and international criteria.

With these samples the ability of four viral groups to produce infections or cytopathic effect in the cell line MA104 was evaluated and we searched by RT-PCR, this was performed through an Integrated Cell Culture System and RT-PCR (ICC/RT-PCR).

The samples that caused cytopathic effect were subsequently analyzed by RT-PCR to search rotavirus, porcine virus reproductive and respiratory syndrome, hepatitis E and enterovirus. Of the four viral groups studied only enterovirus was positive to molecular tests, we concluded that the group was responsible for the cytopathic effect observed in cells. Later sequencing of positive samples to ICC/RT-PCR was performed and found to poliovirus type 1 was the agent found in environmental samples. The presence of poliovirus type 1 indicates vaccine strains circulating in the wastewater, calculating viral titers between  $10^3$  and  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL.

We confirm that poliovirus vaccine strains are circulating during all year in the environment, the World Health Organization suggests that the risk of immunization constant does not alter the global eradication of poliomyelitis.

# 1 Introducción

La agricultura urbana es una de las principales actividades relacionadas a la producción de alimentos desarrollada en las ciudades (Smit y Nars, 1992). Existen problemas asociados al desarrollo de los agroecosistemas como la urbanización, que implica una alta demanda de recursos y de servicios ecosistémicos (Aguilar *et al.*, 2013), el uso excesivo de los recursos conlleva a la generación aumentada de desechos que provoca daños colaterales como es la contaminación de los sistemas acuáticos.

Los sistemas acuáticos pueden presentar diferentes tipos de contaminación como es la de tipo biológico representada por la presencia de bacterias, parásitos y virus que afectan la salud humana (Arcos-Pulido *et al.*, 2005).

## 1.1 Virus patógenos transmitidos por agua y alimentos: implicaciones en la salud pública

Los virus entéricos son agentes que infectan células del tracto gastrointestinal de humanos, son transmitidos por la ruta fecal-oral y se excretan en las heces de los individuos afectados (Greening, 2006; Saavedra *et al.*, 2012). Al necesitar células específicas para su replicación, de ninguna manera pueden multiplicarse en el ambiente (Wyn-Jones y Sellwood, 2001).

Los virus entéricos son considerados una amenaza para la salud pública, esto debido a las enfermedades gastrointestinales, respiratorias y hepáticas que causan (Masclaux *et al.*, 2013). Lo que les confiere importancia en la salud es su capacidad de provocar enfermedades en dosis infecciosas bajas, en un intervalo de 10 a 100 partículas virales (Fong y Lipp, 2005; Espigares-García, 2006; Greening, 2006; Saavedra *et al.*, 2012).

Se pueden excretar alrededor de  $10^5$ - $10^{11}$  partículas virales por gramo de heces y debido a esta alta tasa de eliminación los virus son abundantes en descargas de agua residual urbana (Saavedra *et al.*, 2012). Cabe mencionar que se han reportado concentraciones de 5,000 a 100,000 Unidades Formadoras de Placa por litro (UFP/L) en agua residual (Bosch *et al.*, 2006), lo que muestra que su transmisión puede ocurrir indirectamente a través del agua.

Los alimentos también son un medio de transmisión de virus entéricos, estos agentes son transportados a los sistemas agrícolas por diferentes vías: la aplicación de abono, composta, por el contacto de los alimentos con el agua, por riego o por inundación y a través del manejo de los alimentos (Hirneisen y Kniel, 2013).

El hecho de que estos virus sean abundantes en el agua residual hace que la práctica del riego de alimentos con agua residual tratada o no tratada juegue un papel importante en su transmisión, con efectos potenciales en la salud pública (Bosch *et al.*, 2006), debido a que el riego con agua residual es una práctica común, principalmente en países en desarrollo (Pachepsky *et al.*, 2011).

Rotavirus, enterovirus, hepatitis E, hepatitis A, astrovirus, adenovirus y norovirus son encontrados comúnmente en el agua y tienen repercusiones en la salud pública (Szewzyk *et al.*, 2000; Greening, 2006). Rotavirus y enterovirus se han sugerido como indicadores de contaminación fecal (Mara y Horan, 2003), debido a que los organismos indicadores son la base de esta investigación, pruebas para la detección de ambos fueron realizadas. Durante el avance de los resultados se decidió hacer la detección de hepatitis E por las características propias del virus y por las condiciones del sitio de estudio, las cuales se explican más adelante; la importancia de estos tres virus se resalta a continuación.

### **1.1.1 Rotavirus**

Rotavirus (RV) es el agente causante de gastroenteritis severa en infantes más importante a nivel mundial (Svraka *et al.*, 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 527,000 niños de todo el mundo mueren anualmente por la infección que causa rotavirus (OMS, 2010) y en México en el Boletín Epidemiológico que emite la Secretaría de Salud se reportan 4,522 casos de infecciones para el año 2013 (DGE, 2014). Rotavirus se distribuye mundialmente, incluso en países desarrollados (Rojas, 2008), su dosis infecciosa es de 1 UFP (Saavedra *et al.*, 2012) y está presente en el agua residual (Bosch *et al.*, 2006).

Rotavirus es un género perteneciente a la familia *Reoviridae*, es un virus no envuelto compuesto de tres capas proteicas concéntricas, la partícula infecciosa es equivalente a la partícula de tres capas y es conocida como TLP por sus siglas en inglés (triple-layered particle). La capa más externa está formada por las proteínas VP4 y VP7, VP4 se caracteriza por ser una proteína sensible a la acción por proteasas como la tripsina y es escindida en dos subunidades: VP8 y VP5. La capa externa rodea la capa intermedia o DLP (double-layered particle) formada por la proteína estructural VP6, la capa interna, core shell o SLP (single-layered particle) se compone de la proteína VP2. El complejo de replicación consta de una RNA polimerasa dependiente de RNA viral (VP1) y de la enzima del cap (VP3), el

genoma viral insertado en el core se encuentra dividido en once segmentos de RNA de doble cadena; cada segmento codifica para una proteína específica con excepción del segmento 11, que codifica para dos (Desselberger, 2014).

El ciclo de replicación de rotavirus comienza cuando la partícula de triple capa mediante la proteína VP8, la cual surge como el producto de la ruptura de VP4 interactúa con el ácido siálico de los receptores celulares, y por endocitosis la partícula se libera al endosoma temprano en donde se pierde la capa externa, VP7 se pierde junto con VP5, la DLP entonces es liberada al citoplasma celular en donde se activa el complejo de replicación y comienza la transcripción de RNA de polaridad positiva (+) a partir de cada segmento de RNA de doble cadena, el RNA(+) sirve como RNA mensajero para la síntesis de proteínas estructurales y no estructurales y como templado para producir RNA de polaridad negativa para dar lugar al RNA de doble cadena. Dos proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 interactúan para formar estructuras denominadas viroplasmos en donde se secuestran componentes necesarios para el ensamblaje de las partículas virales de doble capa, posteriormente en el retículo endoplásmico adquieren la tercera capa. La nueva progenie viral es expulsada por lisis viral (Rojas *et al.*, 2008; Desselberger, 2014).

Existe prevención para la infección que provoca rotavirus en humanos, en 1998 se aplicó a más de un millón de niños en Estados Unidos una vacuna viva atenuada denominada comercialmente RotaShield®, sin embargo surgieron casos de intususcepción o invaginación intestinal a partir de la vacunación. Actualmente en diferentes países incluido México, la inmunización de rotavirus se basa en una vacuna viva atenuada monovalente derivada de un rotavirus humano, comercialmente es conocida como Rotarix®, en Estados Unidos y Europa el control se realiza con una vacuna viva atenuada pentavalente compuesta de cadenas de rotavirus bovinos y humanos (RotaTeq®), ninguna de las dos vacunas ha sido asociada a intususcepción (Desselberger, 2014).

### **1.1.2 Enterovirus**

Según la clasificación del Comité Internacional de la Taxonomía de Virus, 2014 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), el género Enterovirus (EV) pertenece a la familia *Picornaviridae* y está integrado por los enterovirus, poliovirus, coxsackievirus y echovirus. Se transmiten por la ruta fecal-oral, son virus que pueden

causar gastroenteritis y enfermedades más severas como parálisis, meningitis y miocarditis (Greening, 2006). Sobreviven eficientemente en el ambiente debido a que soportan intervalos amplios de pH (3-10), sin embargo son sensibles al cloro y a la radiación ultravioleta. Se ha calculado que los enterovirus presentes en el agua residual se encuentran alrededor de  $10^5$  UFP/L (Wyn-Jones y Sellwood, 2001).

Se trata de un virus no envuelto que mide aproximadamente 27-30 nm de diámetro, consta de un RNA genómico de cadena simple de sentido positivo. El genoma posee una región no codificante denominada VPg de 22 aminoácidos que se une en el extremo 5' del RNA viral. Tiene una longitud aproximada de 7500 nucleótidos, cuenta una región no codificante en el extremo 5' de aproximadamente 750 nucleótidos de longitud y otra en el extremo 3'. Posee un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que se procesa proteolíticamente originando las proteínas estructurales de la cápside (VP1-VP4) y siete proteínas no estructurales (2A, B, C y 3A, B, C, D). La proteína viral 3B es comúnmente conocida como VPg y juega un papel importante en la replicación al funcionar como iniciador de la transcripción.

La cápside del virus está conformada por VP1 a VP4, las cuales participan en el proceso de replicación, el ciclo comienza cuando el virus se une a los receptores celulares, en particular poliovirus utiliza a CD155, una molécula de adhesión. Al entrar la partícula viral, el genoma es liberado en el citoplasma, el genoma de polaridad positiva, actúa como un RNA mensajero y a su vez, la RNA polimerasa dependiente del genoma viral (VP3) sintetiza una copia negativa la cual es utilizada para sintetizar nuevas copias de RNA. La síntesis de proteínas del hospedero es inhibida por la acción de la proteasa 2A que escinde uno de los factores de iniciación de la traducción, mientras que la traducción viral se inicia (Hyypiä *et al.*, 1997). Posteriormente, el ensamblaje de nuevas partículas se lleva a cabo y la salida de estas ocurre por lisis celular.

La poliomiелitis paralítica es una de las enfermedades más representativas de los enterovirus y como resultado de un esfuerzo global se ha reportado erradicada desde 1990 en México (Esteves-Jaramillo y López-Collada, 2012). La prevención universal de la enfermedad se ha logrado con el uso de la Vacuna Antipoliomiелítica Oral (VAO) en sus diferentes modalidades (monovalente, bivalente, trivalente, o con virus inactivado). En México, se utiliza la vacuna atenuada trivalente que incluye los tres serotipos de poliovirus

(I, II, y III), la aplicación continua a niños desde 2 meses hasta los 5 años de edad ha permitido mantener controlada la infección causada por poliovirus (Birmex, 2015).

### 1.1.3 Hepatitis E

Hepatitis E (HEV) es un virus perteneciente al género *Hepevirus*, dentro de la familia *Hepeviridae*, es un virus no envuelto de 32-34 nm de diámetro, de RNA de cadena simple. Se considera que Hepatitis E es causante de enfermedades zoonóticas, siendo los cerdos los principales reservorios (Mirazo *et al.*, 2014). Este virus se transmite a través de carne cruda o mal cocinada. Se ha demostrado la presencia de HEV en agua residual y se ha sugerido que la partícula viral es estable en el ambiente, lo que favorece su transmisión a través de matrices ambientales (Masclaux *et al.*, 2013).

Es un virus no envuelto de 32-34 nm de diámetro, de RNA de cadena simple de polaridad positiva. Su genoma tiene aproximadamente 7200 nucleótidos de longitud y está constituido por una región no codificante en el extremo 5' (27 a 35 nucleótidos), por tres marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) y una región no codificante en el extremo 3' (65-74 nucleótidos) la cual se encuentra poliadenilada. El ORF 1 está involucrado en la codificación de proteínas no estructurales, dentro de éste se ubica una región hipervariable la cual es crucial en cuanto a diversidad genética se refiere. El ORF 2 codifica las proteínas estructurales del virus y el ORF 3 codifica para una fosfoproteína de 123 aminoácidos que participa en la replicación y en la activación de vías de señalización celular (Mirazo *et al.*, 2014). La replicación del virus se da cuando la partícula viral ingresa a la célula hospedera, aún se desconoce la proporción a la que se adhieren los virus con los receptores celulares. Una vez ocurrida la entrada, el RNA es liberado al citoplasma en donde la síntesis de proteínas produce una proteína no estructural (proORF1) la cual es procesada proteolíticamente. También se genera RNA de polaridad negativa, el cual funciona como molde para sintetizar nuevos RNAs de polaridad positiva los cuales funcionan como RNA mensajeros de los precursores de los tres marcos de lectura y por su parte, son incorporados a las partículas virales recién ensambladas, de las que aún se desconoce el mecanismo por el que son expulsadas de las células (Rodríguez-Frías *et al.*, 2012).

Actualmente se han desarrollado dos vacunas recombinantes contra HEV genotipo 1, la fabricación de una de ellas se probó en hombres nepalíes, sin embargo se discontinuó su desarrollo, la segunda vacuna se probó en voluntarios chinos y por su alta eficacia fue aprobada en China en el 2011 (Mirazo *et al.*, 2014).

#### 1.1.4 Factores que afectan la presencia de virus

En general, el tiempo de persistencia de los virus en los ambientes acuáticos es prolongado, esto se debe a diferentes factores físicos y químicos que contribuyen a su estabilidad en diferentes matrices ambientales (Tabla 1) (Bosch *et al.*, 2006; Saavedra *et al.*, 2012). Resalta el efecto germicida de la radiación ultravioleta. En la Tabla 2 se indican los intervalos de dosis de radiación ultravioleta que son necesarias para la inactivación de diferentes virus; adenovirus es el virus más resistente. El tiempo que persisten los virus varía según las interacciones que tengan con los factores ambientales que predominan en un periodo y espacio determinados. En la Tabla 3 se muestra el tiempo de persistencia en alimentos que se consumen crudos.

Tabla 1. Factores que afectan la estabilidad de los virus entéricos en ambientes acuáticos. Adaptado de Bosch *et al.*, 2006 y Saavedra *et al.*, 2012.

Factor	Efecto
Temperatura	Mayor persistencia a bajas temperaturas
Luz ultravioleta	Causa daños en los ácidos nucleicos, tiene un efecto germicida
pH	Virus son poco estables en valores de pH extremos
Sólidos	Asociaciones con los virus prolonga la persistencia, confieren protección ante la inactivación

Tabla 2. Comparación de dosis reportadas en mJ/cm<sup>2</sup> para la reducción de 1 (90%), 2 (99%), 3 (99.9%) y 4 (99.99%) logaritmos de diferentes virus entéricos (Health Canada, 2011).

Virus	Dosis en mJ/cm <sup>2</sup>			
	1 log	2 log	3 log	4 log
Hepatitis A	4.1-5.5	8.2-13.7	12.3-22	16.4-29.6
Poliovirus tipo I	4-8	8.7-15.5	14.2-23	20.6-31
Rotavirus SA11	7.1-10	14.8-26	23-44	36-61
Adenovirus	58	100	143	186

Tabla 3. Estabilidad de los virus entéricos sobre alimentos que son consumidos en crudo. TA: Temperatura Ambiente. Adaptado de Rzezutka y Cook, 2004.

Matriz	Virus	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Referencia
Lechuga	Hepatitis A	7	4	Croci <i>et al.</i> , 2002
Lechuga	Hepatitis A	6	TA	Bidawid <i>et al.</i> , 2001
Apio	Poliovirus	76	4	Ward e Irving, 1987
Espinaca	Poliovirus	55	4	Ward e Irving, 1987
Lechuga	Poliovirus	12	4	Kurdziel <i>et al.</i> , 2001
Lechuga	Rotavirus	30	25	Badawy, 1985
Rábano	Rotavirus	30	25	Badawy, 1985

## 1.2 Estudio de los virus en el agua

El análisis de los virus entéricos está basado en tres pasos generales: concentración, detección y verificación de la infectividad. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es un método útil y común para la detección de los virus, siendo el resultado de su aplicación la amplificación de un segmento del material genético. En ese sentido, la PCR convencional únicamente arroja la presencia o ausencia de los virus. Sin embargo, la amplificación del genoma no indica la presencia de virus infecciosos, por lo que se ha sugerido que el uso de métodos moleculares y el riesgo potencial a la salud deben de ser interpretados con precaución (van Lieverloo *et al.*, 2007).

Se requieren métodos complementarios en los que se logre determinar si los agentes detectados son infecciosos, como es el caso de infección de células cultivadas (Goyal, 2006).

Además se sugiere realizar una evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico (QMRA, por sus siglas en inglés) para estimar la relación con la exposición a los patógenos presentes en agua o alimentos con su impacto en la salud pública (Balderrama *et al.*, 2011).

### **1.2.1 Evaluación de riesgo**

El QMRA es un modelo basado en la exposición a un patógeno y en datos epidemiológicos, con él se genera una estimación del riesgo anual de una infección en particular. Una evaluación de riesgo va de la mano con el establecimiento de criterios microbiológicos para el reúso del agua, pues al establecerlos se busca proteger a la salud pública. En el caso del agua de consumo la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) sugiere el riesgo de una infección por cada 10,000 personas por año (Blumenthal *et al.*, 2000).

Respecto al agua residual se han realizado algunas evaluaciones de riesgo con virus entéricos en diferentes países del mundo, sin embargo en México tales estudios son escasos, los más cercanos son los estudios de Cifuentes *et al.*, (1993) y Cifuentes, (1998) en donde se determinó el efecto de la exposición al agua residual utilizada para el riego. El resultado fue que el riesgo por la exposición al agua residual aumentó en términos de infecciones por *Ascaris lumbricoides* en niños y adultos mayores.

### **1.3 Monitoreo e indicadores de contaminación fecal**

La enumeración de *Escherichia coli* y coliformes fecales, ha sido generalmente utilizada para evaluar la calidad del agua, estos organismos son considerados indicadores microbiológicos de la misma (McQuaig *et al.*, 2006). Un organismo indicador sugiere la presencia de microorganismos patógenos en el agua, estos organismos habitan en el intestino de animales de sangre caliente (humanos, ganado, animales silvestres) y se excretan en sus heces, no se pueden replicar en el agua, pero pueden ser cuantificados debido a que crecen cuando son inoculados en un medio artificial (Yates, 2007).

En el uso del agua residual se deben considerar aspectos de calidad microbiológica con el fin de evitar riesgos a la salud pública, principal motivo por el cual se establecen guías y regulaciones para el uso y reúso seguro del agua. Generalmente el agua residual tiene dos destinos: es vertida directamente a los cuerpos de agua o es vertida al suelo, sin embargo, estas prácticas no siempre cumplen con los criterios de calidad (Silva *et al.*, 2008). En México, la regulación correspondiente a la calidad microbiológica del agua que es utilizada para el riego agrícola no incluye la detección de virus, ésta únicamente se basa en la detección del grupo más común de bacterias: las coliformes fecales y los huevos de helminto. La detección de éstos dos grupos no necesariamente indica la presencia de agentes patógenos (Ashbolt *et al.*, 2001). Las bacterias coliformes se utilizan como indicadores de contaminación fecal a nivel internacional, instituciones como la OMS establecen que el agua que es utilizada para el riego no debe de exceder más de 1000 coliformes por cada 100 mL de agua (Gerba y Choi, 2006). En México el límite máximo permisible es el mismo y está establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (DOF, 1997). Por sus propiedades, otros grupos de microorganismos se han sugerido como indicadores de contaminación fecal como es el caso de los enterococos fecales y por su parte, virus como los bacteriófagos son considerados modelos de virus entéricos, aquellos que infectan a *E. coli* son conocidos como colifagos.

Los enterococos fecales son un grupo de bacterias Gram positivas que habitan en el intestino humano y animal, crecen en niveles altos de salinidad (6.5% de NaCl) y en un intervalo de temperatura entre los 10° y 45°C (Ashbolt *et al.*, 2001). A comparación de los coliformes, este grupo de bacterias persiste en el ambiente durante más tiempo y posee mayor resistencia a tratamientos y a las condiciones ambientales (Yates, 2007), sin embargo la presencia de bacterias no se relaciona con la contaminación por virus entéricos, principalmente por las diferencias existentes entre sus propiedades físicas como es el tamaño (Hot *et al.*, 2003; Yates, 2007). Los bacteriófagos funcionan mejor para representar este tipo de contaminación debido a que son virus similares a los virus patógenos en cuanto al tamaño, transporte, ecología, persistencia y densidad (Hot *et al.*, 2003; Pillai, 2006). Los bacteriófagos están ampliamente distribuidos en el ambiente y se han encontrado en diferentes tipos de agua: superficial, residual, utilizada para el riego agrícola (Ceballos *et al.*, 2003) y en superficies vegetales (Endley *et al.*, 2003).

## 1.4 Uso del agua residual en Xochimilco

El agua residual tratada y no tratada es ampliamente utilizada para la agricultura, principalmente en países en vías de desarrollo. Países como China, India y México practican comúnmente el riego con agua residual (Hussain *et al.*, 2002). La escasez de agua es el motivo fundamental por el que el agua residual es reutilizada, además de la alta cantidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo) que funcionan como fertilizantes para el suelo (Blumenthal *et al.*, 2000). El agua residual contiene materia orgánica e inorgánica, compuestos químicos y patógenos (Blumenthal *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008); bacterias, parásitos y virus están presentes en al agua residual (Hussain *et al.*, 2002).

Las plantas de lodos activados y las lagunas de oxidación son los procesos más comunes por los que se trata el agua residual en nuestro país, en resumen, el proceso de lodos activados es un proceso biológico, en donde un lodo de microorganismos se ventila con agua residual con la función principal de degradar la materia orgánica. En las lagunas de oxidación, el agua residual es almacenada en estanques naturales o artificiales y sin la adición de insumos la materia orgánica se degrada lentamente. Se ha demostrado que agentes patógenos no son removidos por completo en el tratamiento de aguas residuales (Casas y Suñén, 2002; van den Berg *et al.*, 2005), en México el tratamiento es deficiente debido a diferentes factores tales como falta de recursos para la operación y el mantenimiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Bunge, 2010).

En la ciudad de México, el agua residual tratada está destinada para cuatro usos principalmente: llenado de canales en Xochimilco, riego agrícola, riego de áreas verdes y reúso industrial (Burns, 2009). Aunque el riego agrícola también está suministrado por aguas residuales no tratadas, pues de los 320 m<sup>3</sup>/s de agua residual que se generan tan sólo en el Distrito Federal, únicamente se trata aproximadamente el 10%, de este porcentaje el 31% ingresa a los canales de Xochimilco (Aguilar *et al.*, 2006). El agua de los canales de Xochimilco es utilizada para el riego de flores, forraje, maíz y verduras (Juárez-Figueroa *et al.*, 2003). La zona chinampera de Xochimilco actualmente está conformada por tres poblados: Xochimilco, San Luis Tlaxialtemalco y San Gregorio Atlapulco, las flores y las hortalizas son los productos representativos de los últimos dos respectivamente (López *et al.*, 1996).

Xochimilco es considerado uno de los más diversos y productivos agroecosistemas de la cuenca de México (Jiménez *et al.*, 1995). Este sistema presenta alteraciones hidrológicas debido al uso intensivo del agua para abastecer a la ciudad de México (Crossley, 2004). A partir de 1971, el agua de los canales comenzó a ser sustituida por agua residual tratada proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Cerro de la Estrella. En 1989, los canales de la zona turística y chinampera empezaron a recargarse con agua proveniente de la Planta Experimental de Tratamiento de San Luis Tlaxiátemalco (López *et al.*, 1996). Además con el crecimiento de la mancha urbana y los asentamientos irregulares que no cuentan con un sistema de drenaje formal se facilita la transmisión de organismos patógenos (Juárez-Figueroa *et al.*, 2003).

San Gregorio Atlapulco es el sitio en el que se trabajó en este estudio, debido a que dentro de la delegación Xochimilco destaca esta zona por presentar una producción chinampera intensiva a cielo abierto, pues de las 204 hectáreas (ha) que se utilizan para el cultivo, 103 ha se dedican a la producción de hortalizas (De la Rosa Benítez, 2006)

## **2 Justificación**

Es fundamental estudiar la concentración de los virus entéricos en el agua que se utiliza para el riego de productos que se consumen crudos, debido a que su detección y cuantificación es necesaria para determinar la calidad de los productos y evaluar los riesgos de exposición a los consumidores. Es importante generar información que contribuya a la propuesta de nuevos criterios, sobre el uso de aguas residuales para su uso en la agricultura, los cuales estarían en función de la mitigación del riesgo a la salud.

## **3 Hipótesis y objetivos**

### **3.1 Hipótesis**

Debido a las descargas que reciben los canales de Xochimilco se detectarán virus entéricos en agua destinada para el riego agrícola y en lechugas regadas con ella, los resultados obtenidos se podrán comparar con criterios que se sugieren diferentes escenarios de riesgo.

### **3.2 Objetivo general**

Evaluar la presencia de organismos indicadores de contaminación fecal y de virus patógenos en agua que se utiliza para el riego y en lechugas que se cultivan en dos parcelas de San Gregorio Atlapulco para comparar con criterios nacionales e internacionales considerados como riesgosos.

### **3.3 Objetivos particulares**

3.2.1 Medir en el agua que es utilizada para el riego de las lechugas parámetros fisicoquímicos que favorecen la persistencia de los indicadores y de los virus patógenos en las parcelas Huerta y Tlilac.

3.2.2 Realizar en ambas matrices un monitoreo de coliformes fecales, único organismo indicador de calidad del agua en la normatividad mexicana y además determinar enterococos fecales y colifagos como indicadores complementarios al monitoreo.

3.2.3 Estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección de enterovirus, determinando su límite de detección, así como el límite de detección de la RT-PCR para rotavirus.

3.2.4 Determinar la infectividad y la presencia de rotavirus, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, hepatitis E y enterovirus en agua y en lechugas, por medio de un Sistema Integrado de Cultivo Celular y Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (ICC/RT-PCR).

3.2.5. Comparar los resultados obtenidos con criterios establecidos a nivel nacional e internacional asociados al riesgo por el uso del agua residual en el riego agrícola.

## 4 Métodos

### 4.1 Métodos de campo

#### 4.1.1 Ubicación geográfica

Se trabajó en dos parcelas agrícolas localizadas entre los 19° 15' 43.9" latitud norte y los 99° 3' 59.1" longitud oeste, en la comunidad de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco, al sur de la ciudad de México.

Las dos parcelas muestreadas se denominaron Huerta y Tlilac, éstas se eligieron debido a que están asociadas a un apantle (canal angosto, útil para las labores agrícolas), que soporta el riego de los cultivos, en ambos sitios se da la producción de hortalizas durante todo el año, en específico la producción de lechugas y además éstas se distribuyen en puntos de venta concurridos, como son la Central de Abastos y centros de autoservicio. En la Figura 1 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo, en color negro se ubican los puntos en donde se colectaron las muestras de agua, mientras que los puntos naranjas representan los puntos de colecta de lechugas.

#### 4.1.2 Muestreo

Se realizaron cinco muestreos, cuatro en la época de lluvias, de agosto a noviembre del año 2013 y uno en la época seca, en abril de 2014. Se realizó la toma de 1 L de agua por triplicado en dos puntos extremos del apantle: en el sitio en donde se coloca la bomba utilizada para extraer el agua en la época seca y en la esquina opuesta a ésta. Para la toma del agua se utilizó un instrumento que en su interior contenía un frasco de polipropileno de 1L de capacidad.

En las parcelas se tomaron 12 lechugas, para ello se abarcó con cuatro puntos la longitud total y en cada punto se colectaron tres lechugas abarcando el ancho total en cada parcela; la colecta de las lechugas se realizó cortando con un cuchillo la sección aérea de las mismas y se almacenaron en bolsas de polietileno estériles. En la Figura 2 se esquematiza el diseño utilizado para la toma de muestras.

La frecuencia de los muestreos dependió de la duración de cada ciclo de producción y dependiendo de lo que se encontrara en las parcelas en el momento del muestreo se colectaron entre dos variedades de lechugas (batadía y francesa), en dos etapas de

crecimiento, una juvenil de aproximadamente 15 a 20 días de crecimiento y la fase de cosecha de aproximadamente 60 días, la que se consume. La producción de lechugas en Huerta y Tlilac no fue simultánea, cuando en una parcela no había lechugas cultivadas no se realizó la toma de agua, por lo que en total se colectaron 14 muestras de agua por triplicado y 84 lechugas, en la Tabla 4 se desglosa el número de muestras colectadas en cada caso.

Ambos tipos de muestras se mantuvieron en una hielera durante el traslado al Instituto de Ecología de la UNAM, en donde se procesaron para la determinación de bacterias indicadoras de contaminación fecal.

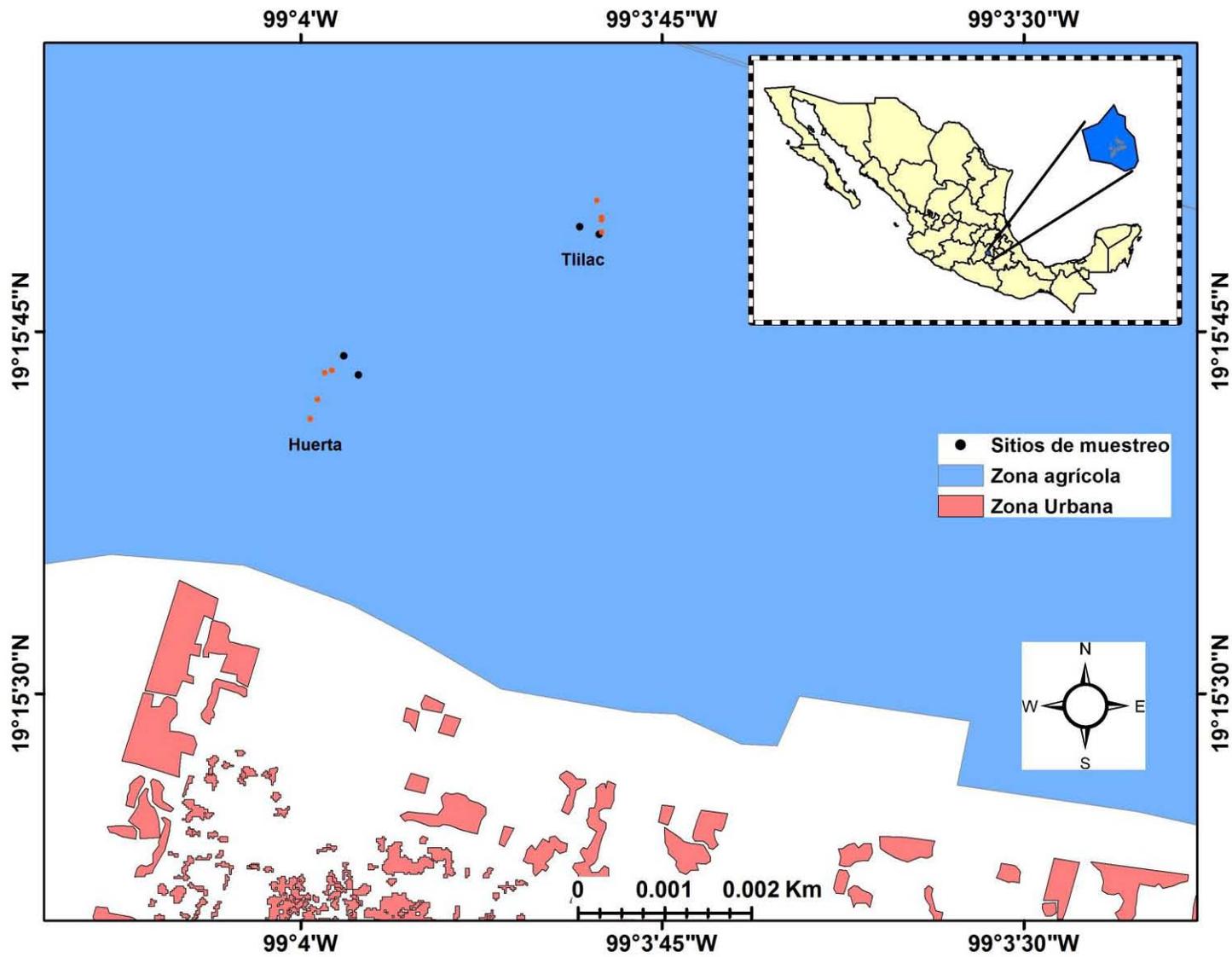


Figura 1. Localización de las parcelas Huerta y Tlilac en San Gregorio Atlapulco, Xochimilco.

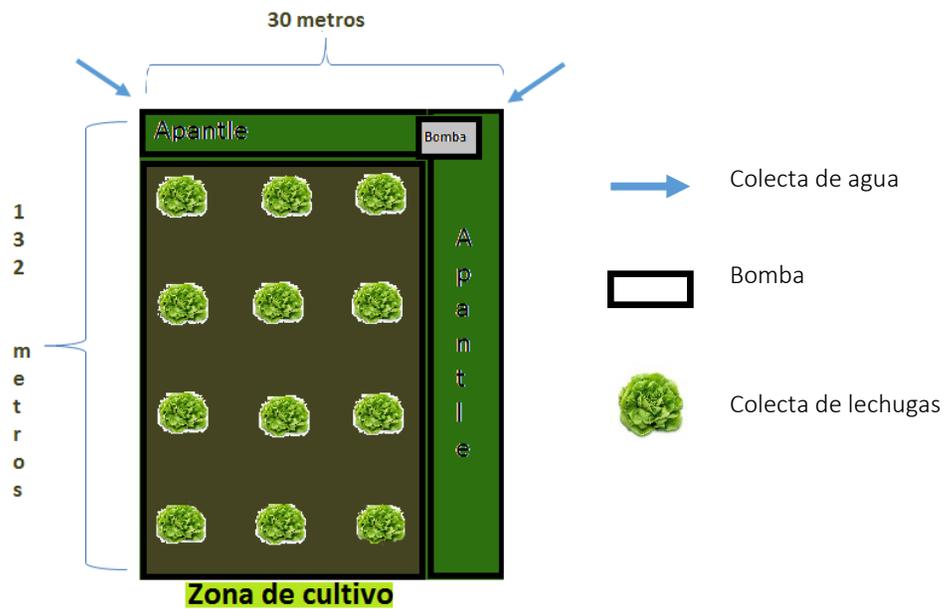


Figura 2. Esquema de muestreo.

Tabla 4. Distribución temporal de los cinco muestreos realizados en Huerta y Tlilac.

Parcela	Muestreo	Claves	Etapas de crecimiento	Número de lechugas	Muestras de agua (por triplicado)
Huerta	1: Lluvias 1	L1	Cosecha	12	2
	2: Lluvias 2	L2	Juvenil	12	2
	3: Lluvias 3	L3	Cosecha	12	2
	4: Lluvias 4	L4	-	-	-
	5: Secas 1	S1	Cosecha	12	2
Total				48	8
Tlilac	1: Lluvias 1	L1	-	-	-
	2: Lluvias 2	L2	Cosecha	12	2
	3: Lluvias 3	L3	-	-	-
	4: Lluvias 4	L4	Juvenil	12	2
	5: Secas 1	S1	Cosecha	12	2
Total				36	6
Total				84	14

Para un mejor entendimiento del documento, en las claves de las muestras de agua se colocará un I y II, cada número representa los puntos de agua colectados en el extremo de cada apantle respectivamente. Las lechugas se expresarán con los números del I al IV debido que a que la colecta de lechugas se basó en cuatro puntos a lo largo de cada parcela y además se incluyen las claves de los muestreos.

#### **4.1.3 Mediciones *in situ***

Se tomaron parámetros fisicoquímicos en el agua de cada canal con una sonda multiparámetros (YSI 6660-M, Loveland, CO, EU) la temperatura, el pH, la conductividad específica y turbidez del agua fueron registrados. Además con los datos obtenidos, en Microsoft Excel 2013 se realizaron gráficas combinadas para explicar la presencia de virus patógenos.

#### **4.1.4 Radiación Ultravioleta**

El Sistema de Monitoreo Atmosférico del Distrito Federal (SIMAT) reporta valores de radiación ultravioleta por medio de seis estaciones meteorológicas, para nuestros fines se eligió la más cercana al sitio de estudio, se descargaron los datos de la estación del Pedregal correspondientes a las fechas en las que se realizó cada uno de los muestreos. Se trabajó con el supuesto de que la energía reportada para la estación del Pedregal fue la misma que recibieron las lechugas en las parcelas de Huerta y Tlilac, posteriormente se calcularon los valores mínimos y máximos por día y se compararon con lo reportado en la Tabla 2.

### **4.2 Análisis experimentales**

#### **4.2.1 Filtración a través de membrana de las muestras sin concentrar**

Dentro de las 12 horas posteriores al muestreo se realizó la filtración de las muestras de agua y lechugas sin concentrar para la determinación de coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF) siguiendo el método estándar de la *American Public Health Association* (APHA, 2005).

Con las muestras de agua se realizaron por triplicado tres diluciones seriadas de un factor de 10 (1:10), 1 mL de agua se diluyó en 9 mL de una solución Buffer Fosfato Salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés). Cada dilución se filtró mediante un dispositivo conectado al vacío que cuenta con un embudo de filtración y sobre éste se colocó una membrana de nitrocelulosa (Merk-Millipore, Billerica, MA, EU) con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para retener a las bacterias, el embudo junto con la membrana se complementa con un vaso que se colocó encima y a través de él se hizo pasar cada dilución, cada una de las membranas fue removida y colocada en una caja de Petri con medio de cultivo selectivo para CF como mFC agar (Difco, Becton Dickinson, Cuautitlán, Edo. de Méx.) y para EF fue el medio mEnterococcus agar (Difco, Becton Dickinson, Cuautitlán, Edo. de Méx.). La preparación de cada medio de cultivo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En el caso de las lechugas, 25 g de cada una (Fumian *et al.*, 2009) se colocaron en una bolsa de polipropileno estéril y se lavaron con 100 mL de solución de PBS en agitación suave durante 30 minutos. Esta solución de lavado se utilizó para realizar por triplicado tres diluciones seriadas 1:10, cada dilución se filtró siguiendo el mismo procedimiento de las muestras de agua.

Las cajas sembradas se incubaron invertidas a 44.5°C durante 24 horas para CF y a 37°C durante 48 horas para EF. Después del tiempo de incubación se contaron las colonias y a partir de esos valores se expresaron los resultados como Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en 100 mL.

#### **4.2.2 Concentración de muestras de agua y lechugas**

Las muestras de agua se concentraron utilizando tubos Centricon (Merk-Millipore, Billerica, MA, EU), dispositivos de 70 mL de capacidad. Las muestras se fueron concentrando en series de 70 mL a 2500 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se descartaron y se recuperaron concentrados de volúmenes entre 0.2 y 3 mL, volúmenes menores a 1 mL se resuspendieron en PBS 1X.

Por otro lado, otros 25g de cada lechuga se lavaron con 100 mL de PBS 1X+ 1M NaCl en agitación suave durante 30 minutos. Esta solución se filtró por una membrana de poliestireno con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Stericup, Merk-Millipore, Billerica, MA, EU), con la

finalidad de retener bacterias y el material vegetal. Los filtrados también se concentraron utilizando tubos Centricon a 2500 rpm durante 20 min. Las muestras concentradas se almacenaron a -70°C para el análisis posterior de colifagos y pruebas de detección de virus entéricos.

#### **4.2.3 Doble capa de agar**

El procedimiento de doble capa de agar es un método que se ha utilizado para la detección de colifagos, es un método basado en el conteo en placa.

El conteo se realiza a partir de la lisis celular de una bacteria hospedera, en este caso *E. coli*, los responsables de dicha lisis son los colifagos, los cuales al infectar a la hospedera propagada en un medio basal de cultivo pueden replicarse y el resultado de esta infección es una zona de lisis circular en el medio de cultivo que significa la falta de crecimiento de la bacteria (Barquero *et al.*, 2012).

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

Se utilizó un medio basal Triptone-Yeast Extract-glucose Broth (TYGB), en tres diferentes fases (líquido, semisólido y sólido), el cual se compone de tripticasa peptona (BBL, Becton Dickinson, Cuautitlán, Edo. de Méx.), extracto de levadura (Sigma, Toluca, Edo. de Méx.) y cloruro de sodio (J.T. Baker, Edo. de Méx.) para el caso de las fases semisólida y sólida se agregó agar (Bioxon, Becton Dickinson, Cuautitlán, Edo. de Méx.). Los tres medios se suplementaron con una solución de calcio-glucosa (J.T. Baker, Edo. de Méx.).

Se propagó la bacteria hospedera durante 18 horas a 37°C en el medio líquido TYGB. Para el ensayo en placa, 0.5 mL de las muestras concentradas y 0.5 mL del cultivo de la bacteria hospedera en fase de crecimiento exponencial se mezclaron y se vaciaron en el medio semisólido TYGB, posteriormente la mezcla se añadió a cajas de Petri que contenían medio de cultivo sólido TYGB.

Una vez solidificadas, las cajas se incubaron invertidas durante 18 horas a 37°C y se realizó el conteo de las zonas de lisis formadas, reportándose como UFP/100 mL.

## 4.2.4 Sistema Integrado de Cultivo Celular y Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa

### 4.2.4.1 Rotavirus

#### 4.2.4.1.1 Células y virus

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

Las células MA104 (células epiteliales de riñón de mono Rhesus) que se utilizaron para evaluar la infectividad de rotavirus, fueron donadas por el Dr. Carlos F. Arias Ortiz del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las células fueron cultivadas en el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y glutamina a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

El control positivo de rotavirus utilizado tanto en la parte de la infectividad como en la RT-PCR se obtuvo a partir del cultivo de rotavirus de simio SA11 ATCC VR-1565 (Manasas, VA, EU). Para su propagación, el virus fue activado con tripsina (3 µg/mL) durante 45 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y se inoculó en las células MA104. Después de una hora de adsorción a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y sin retirar el inóculo se agregó a las cajas infectadas DMEM sin suplementar. A las 24 horas post-infección se observó desprendimiento y lisis celular, efecto citopático (ECP) reportado por la organización American Type Culture Collection (ATCC). Los virus producidos se recuperaron por congelación-descongelación dos veces y el lisado se almacenó a -70°C hasta su uso posterior (Huang *et al.*, 1992). Los virus se titularon por el método de Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos 50 (TCID<sub>50</sub> por sus siglas en inglés) como posteriormente se describe.

#### 4.2.4.1.2 Determinación de la infectividad

Las muestras concentradas se utilizaron para infectar la línea celular MA104. Las muestras se pre-trataron con tripsina (3 µg/mL) y con una mezcla de penicilina-estreptomicina al 1% (Agbalika *et al.*, 1984); durante 45 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, placas con células confluentes de 6, 12 y 24 pozos (según el número de muestras a procesar) se infectaron con 200 µL/pozo

de las muestras pre-tratadas. Después de una hora de adsorción a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y sin retirar el inóculo, se agregó DMEM sin suplementar y las placas se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 72 horas. Las placas se observaron cada 24 horas en un microscopio invertido para observar el ECP reportado por ATCC. Las muestras que no presentaron ECP se utilizaron para hacer pases ciegos, suponiendo que las muestras contenían pocos virus y que por tal razón no pudo observarse ningún efecto. En un pase ciego la cantidad inicial de los virus va aumentando a través de sucesivas reinfecciones, dos o tres pases son suficientes hasta observar un ECP (Coll-Morales, 1993) en este caso el número máximo de pases ciegos fue de tres. Las muestras que presentaron ECP se cosecharon por congelación-descongelación dos veces, posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, por decantación se separó el lisado del pellet y ambos se almacenaron por separado a -70°C hasta su uso posterior.

#### **4.2.4.1.3 Titulación de las muestras que causaron efecto citopático por TCID<sub>50</sub>**

Placas de 96 pozos con células MA104 confluentes se infectaron con diluciones seriadas de las 18 muestras que causaron ECP (factor de dilución de 10), las diluciones se realizaron en DMEM sin suplementar, el cual también fungió como control negativo. Las muestras se pre-trataron con tripsina 3 µg/mL y con una mezcla de penicilina-estreptomicina al 1%, durante 45 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta observar ECP (72 horas). Después de las 72 horas de incubación las placas se fijaron con metanol frío durante 5 min, se decantaron y se tiñeron con cristal violeta al 1% en al etanol al 70%, el colorante tiñó las células vivas y a partir de esta tinción el título viral se calculó con la fórmula Reed-Muench, la cual está basada en la dilución viral más alta capaz de producir un ECP en el 50% de los pozos que contienen una monocapa de células (se reportó la cantidad de virus que produjo un efecto en el 50% de las células infectadas (TCID<sub>50</sub>/mL) Payment *et al.*, 1993).

#### **4.2.4.1.4 Extracción de ácidos nucleicos**

A los lisados de las muestras que presentaron ECP se les realizó la extracción de RNA con la técnica basada en el uso de Tioisocianato de guanidina (Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, EU), para ello una alícuota de 500 µL de cada muestra y 500 µL de Trizol se agregaron en un

tubo de 1.5 mL, dejándose incubar en hielo durante 10 min. Posteriormente se agregaron 250 µL de cloroformo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL que previamente contenía 500 µL de isopropanol frío y se dejó precipitar a -70°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min dos veces. Se desechó el etanol por decantación y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 15 min. El RNA se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNasas y se almacenó a -70°C hasta su posterior análisis.

#### **4.2.4.1.5 Extracción de RNA con el kit QIAamp MinElute Virus Spin**

Seis muestras se extrajeron con el kit QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.4.1.6 RT-PCR**

Previo a la reacción de RT-PCR, se desnaturalizó el RNA a 99°C durante 5 min. Para la reacción de transcripción reversa y la amplificación se utilizó el QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Se trabajó con una reacción final de 25 µL, para ello se agregaron 5 µL de RT-PCR buffer 5x, 1 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de enzima RT-PCR, 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen), 1 µL de cada primer (15 µM) y 11 µL de agua libre de RNasas. A cada tubo de reacción se le agregaron 5 µL de RNA desnaturalizado.

Se utilizó el par de primers que reporta Villena *et al.* (2003) y que amplifican en el segmento que codifica para la proteína VP6 del rotavirus humano Wa, sin embargo en este estudio no se utilizó una cadena humana como control positivo sino un rotavirus de simio con el que se obtiene un amplicon de 183 pb. Las condiciones de la transcripción reversa y amplificación fueron: 50°C durante 2 min; 50°C durante 30 min; 95°C durante 15 min; 95°C durante 9 min; 40 ciclos de 94°C durante 1 min; 60°C durante 1 min; 72°C durante 1 min y una extensión final de 72°C durante 10 min. En la Tabla 6 se resumen las características de cada primer y se incluyen los primers de la RT-PCR para enterovirus, la cual se describe a continuación.

Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% y 100 V, teñidos con bromuro de etidio durante 10 min y observados en un transiluminador con luz UV.

#### 4.2.4.1.7 Límite de detección de la RT-PCR

Una placa de 96 pozos con células MA104 confluentes se infectó con diluciones seriadas de rotavirus SA11 (factor de dilución de 10), las diluciones se realizaron en DMEM sin suplementar, el cual también fungió como control negativo. Los rotavirus se pre-trataron con tripsina 3 µg/mL durante 45 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

La placa con células infectadas se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, después de este lapso, en un microscopio invertido se observó el efecto citopático causado por rotavirus. Después de las 24 horas de incubación se fijó la placa con metanol frío durante 5 min, se decantó y la placa se tiñó con cristal violeta al 1% en alcohol al 70%, el colorante tiñó las células vivas y a partir de esta tinción el título viral se calculó con la fórmula Reed-Muench (Payment *et al.*, 1993). Se reportó la cantidad de virus que produjo un efecto en el 50% de las células infectadas (TCID<sub>50</sub>/mL). Un título de 1x10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL fue calculado.

Una vez calculado el título viral se hicieron ocho diluciones seriadas (factor de 10) de rotavirus SA11, el título viral correspondiente a cada dilución se expresa en la Tabla 5.

A cada dilución se les realizó la extracción de ácidos nucleicos y se amplificaron por RT-PCR de punto final, el número mínimo de partículas que fue detectado es lo que se reportó como el límite de detección de la técnica.

Tabla 5. Títulos virales correspondientes a cada dilución seriada para calcular el límite de detección de la RT-PCR para la detección de RV.

Dilución	TCID <sub>50</sub> /mL
10 <sup>-1</sup>	1,000,000
10 <sup>-2</sup>	100,000
10 <sup>-3</sup>	10,000
10 <sup>-4</sup>	1,000
10 <sup>-5</sup>	100
10 <sup>-6</sup>	10
10 <sup>-7</sup>	1
10 <sup>-8</sup>	0.1

#### **4.2.4.1.8 Controles de la RT-PCR**

Previamente a la reacción de RT-PCR se cuantificó la concentración de RNA de cada una de las muestras que causaron ECP en un espectrofotómetro (Nanodrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE).

A pesar de que hubo cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras (datos no mostrados) y de que los controles negativos y positivos de la RT-PCR funcionaron correctamente no se obtuvieron resultados positivos para rotavirus y se procedió a buscar otros virus capaces de producir efecto citopático en la línea celular MA104. Se encontró que la línea celular MA104 puede ser infectada por otros virus: virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) (de Abin *et al.*, 2009) y algunos enterovirus (Agbalika *et al.*, 1984).

En el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ de la UNAM se realizaron una qRT-PCR y una RT-PCR anidada para la detección de PRRS en ocho muestras que causaron ECP. Este virus es capaz de replicarse en las células MA104 (de Abin *et al.*, 2009) y se utilizó bajo la premisa de que las actividades agropecuarias llevadas a cabo en San Gregorio podrían verse reflejadas en la presencia de PRRS, los resultados fueron negativos.

Consecutivamente en el Laboratorio de Virología de la FMVZ de la UNAM se realizó una RT-PCR para la determinación de HEV. En este caso la extracción de las muestras no se realizó a partir de los lisados de las muestras que causaron ECP, sino directamente de ocho muestras concentradas de agua y lechugas, los resultados de esta prueba también fueron negativos.

#### **4.2.5 Enterovirus**

##### **4.2.5.1 Extracción de ácidos nucleicos y purificación**

Cronológicamente, enterovirus fue el último grupo viral que se buscó en este estudio, por tal razón, el origen de las muestras para realizar la extracción de RNA dependió de su disponibilidad, es decir, se identificaron todas las muestras que causaron ECP y no siempre se contó con los lisados correspondientes a cada muestra pues habían sido utilizados previamente. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos de todas las muestras que causaron ECP en la línea celular MA104 (a partir de lisados, pellets de los lisados y muestras

concentradas). Las extracciones se realizaron como se describió anteriormente, con la técnica basada en el uso de Trizol. Del total de muestras extraídas, nueve fueron purificadas con el kit Direct-zol RNA Mini Prep (Zymo Research, Irvine, CA, EU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 4.2.5.2 RT-PCR

Se estandarizó la técnica de RT-PCR para la amplificación de EV utilizando como control positivo la Vacuna Antipoliomielítica Oral (VAO) de Birmex (Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V.), se utilizaron los primers reportados en (Le Guyader *et al.*, 1994), que amplifican un fragmento de 194 pares de bases en la región no codificante de la familia de los Picornavirus.

Para la retrotranscripción y la amplificación de la región no codificante de los picornavirus se utilizó el QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. En una reacción final de 20  $\mu$ L se agregaron 4  $\mu$ L de buffer 5X, 0.8  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 1.2  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ L de enzima mix, 0.2  $\mu$ L de inhibidor y se agregó agua hasta 15  $\mu$ L, a cada tubo de reacción se agregaron 5  $\mu$ L de RNA.

Las condiciones de retrotranscripción y la amplificación fueron las siguientes: 50°C durante 30 min, 95°C durante 15 min, 94°C durante 1 min, 33 ciclos de 94°C durante 30 seg, 50°C durante 30 seg y 72°C durante 25 seg, finalmente una elongación final de 72°C durante 7 min, 5, se amplificó un fragmento de 194 pares de bases (Tabla 6).

Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% y 100 V, teñidos con bromuro de etidio durante 10 min y observados en un transiluminador con luz UV.

Tabla 6. Secuencias de primers utilizados en la RT-PCR para la detección de rotavirus y enterovirus. nt: nucleótidos, pb: pares de bases. \* Posición de los nucleótidos con respecto a la cadena rotavirus de simio A/SA11, segmento 6. Acceso en GenBank: AY187029.1 \*\* Posición de los nucleótidos con respecto a la cadena Sabin 1, poliovirus humano. Acceso en GenBank: V01150.1.

Virus (Género)	Primers	Secuencia (5'-3')	Ubicación	Longitud (nt)	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
Rotavirus	VP6-3	GCTTTAAAACGAAGTCT TCAAC	2-23*	22	183	Villena <i>et al.</i> , 2003
	VP6-4	GGTAAATTACCAATTCCT CCAG	166-184*	22		
Enterovirus	EV FW	TCCGGCCCCTGAATGCG G	446-463**	18	194	Le Guyader <i>et al.</i> , 1994
	EV RV	CACCGGATGGCCAATCC AAT	639-620**	20		

#### 4.2.5.3 Límite de detección

El título viral de la VAO no fue calculado, con base en información de la Secretaría de Salud se conoce que la VAO está compuesta de tres serotipos: poliovirus tipo I, poliovirus tipo II y poliovirus tipo III, las dosis de cada serotipo es de 1, 000, 000 TCID<sub>50</sub>, 10,000 TCID<sub>50</sub> y 600,000 TCID<sub>50</sub> respectivamente (Secretaría de Salud, 2006). A partir de esos títulos virales se hicieron ocho diluciones seriadas (factor de 10), los títulos correspondientes a cada dilución y para cada serotipo se muestran en la Tabla 7. A cada dilución se les realizó la extracción de ácidos nucleicos y se amplificaron por RT-PCR de punto final, el número mínimo de partículas que fue detectado es lo que se reportó como el límite de detección de la técnica.

Tabla 7. Títulos virales de la VAO correspondientes a cada dilución seriada para calcular el límite de detección de la RT-PCR de la detección de EV.

Serotipo (TCID <sub>50</sub> /mL)	Dilución	TCID <sub>50</sub> /mL
Poliovirus tipo I (1,000,000)	10 <sup>-1</sup>	100,000
	10 <sup>-2</sup>	10,000
	10 <sup>-3</sup>	1000
	10 <sup>-4</sup>	100
	10 <sup>-5</sup>	10
	10 <sup>-6</sup>	1
	10 <sup>-7</sup>	0.1
	10 <sup>-8</sup>	0.01
Poliovirus tipo II (100,000)	10 <sup>-1</sup>	10,000
	10 <sup>-2</sup>	1000
	10 <sup>-3</sup>	100
	10 <sup>-4</sup>	10
	10 <sup>-5</sup>	1
	10 <sup>-6</sup>	0.1
	10 <sup>-7</sup>	0.01
	10 <sup>-8</sup>	0.001
Poliovirus tipo III (600,000)	10 <sup>-1</sup>	60,000
	10 <sup>-2</sup>	6,000
	10 <sup>-3</sup>	600
	10 <sup>-4</sup>	60
	10 <sup>-5</sup>	6
	10 <sup>-6</sup>	0.6
	10 <sup>-7</sup>	0.06
	10 <sup>-8</sup>	0.006

#### 4.2.5.4 Controles de la RT-PCR

Previamente a la reacción de RT-PCR se cuantificó la concentración de RNA de cada una de las muestras que causaron ECP en un espectrofotómetro (Nanodrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific) (Tabla 10).

Para corroborar los resultados de la RT-PCR se realizó una re-amplificación de los productos que resultaron positivos, utilizando la Taq polimerasa de Invitrogen (Carlsbad, CA, EU), para lo cual se agregaron 2.5 µL de buffer 10X, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de cada primer 10 µM, 0.2 µL de enzima 5 U/µL, 14.05 µL de agua y 5 µL de cDNA.

#### 4.2.5.5 Secuenciación

Posteriormente, los productos de la re-amplificación se purificaron utilizando un E-Gel EX whit SYBR Gold II SizeSelect (Invitrogen, Carlsbad, CA, EU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se trasladaron al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM para su secuenciación.

Las secuencias resultantes alinearon en la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda MD, EU), posteriormente usando el programa ClustalW incluido en el software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) se realizó una alineación de las muestras con secuencias disponibles en el GenBank, finalmente, un árbol filogenético se construyó usando el modelo Tamura Nei del software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

## 5 Resultados

### 5.1 Mediciones *in situ*

#### 5.1.1 Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 8 se muestra el promedio y la desviación estándar de cada uno de los parámetros registrados en las parcelas durante los cinco muestreos.

Tabla 8. Promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados durante los cinco muestreos en el agua de los canales que se utiliza en el riego de las parcelas agrícolas, Huerta y Tlilac.

Parcela	Temperatura (°C)	pH	Conductividad ( $\mu$ S/cm)	Turbidez (NTU)
Huerta	17.6 $\pm$ 0.76	7.59 $\pm$ 0.44	1433.13 $\pm$ 447.53	21.69 $\pm$ 15.02
Tlilac	15.87 $\pm$ 1.09	7.35 $\pm$ 0.42	2049 $\pm$ 115.06	3.04 $\pm$ 3.09

Los canales de riego presentaron agua con temperatura y pH semejantes, sin embargo, se observa que en el agua de cada parcela existen condiciones distintas, debido a los valores de la conductividad. A pesar de esas diferencias se observa la tendencia de que en cada parcela se presentan condiciones favorables para la posible presencia de patógenos.

### 5.1.2 Radiación Ultravioleta

Los datos de la estación meteorológica del Pedregal se reportan en  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  para la radiación UV-A (Tabla 9), estos resultados se relacionaron con la detección de los virus por ICC/RT-PCR. Con una dosis promedio mayor a  $2.848 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  la detección viral es negativa.

Tabla 9. Datos mínimos, máximos y promedios con desviación estándar de la radiación UV-A correspondientes a cada uno de los muestreos, obtenidos de la estación meteorológica del Pedregal del SIMAT.

Muestreo	UV-A ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )			Detección viral por ICC/RT-PCR
	Mínimo	Máximo	Promedio	
L1	0.002	5.603	$2.848 \pm 2.133$	-
L2	0.096	2.602	$0.834 \pm 0.787$	+
L3	0.013	1.983	$1.081 \pm 0.695$	+
L4	0.001	2.292	$0.804 \pm 0.835$	+
S1	0.14	4.685	$1.93 \pm 1.516$	+

## 5.2 Indicadores de contaminación fecal

### 5.2.1 Coliformes fecales

La mayoría de las muestras de agua utilizada para riego en los dos sitios de muestreo, Huerta y Tlilac rebasaron las  $1 \times 10^3$  UFC/100 mL de coliformes fecales (CF), criterio de la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (Figura 3).

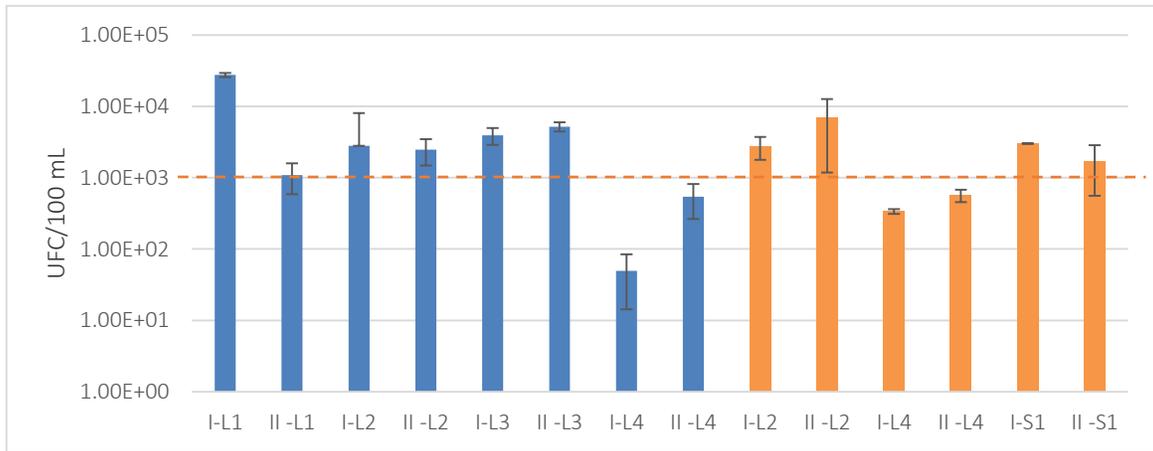


Figura 3. Conteos de coliformes fecales (CF) en las muestras de agua de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

La carga bacteriana en la superficie de las lechugas se muestra en la Figura 4. En ambas parcelas se cuantificaron CF en el orden de  $1 \times 10^3$  UFC/100 mL en la mayoría de los muestreos.

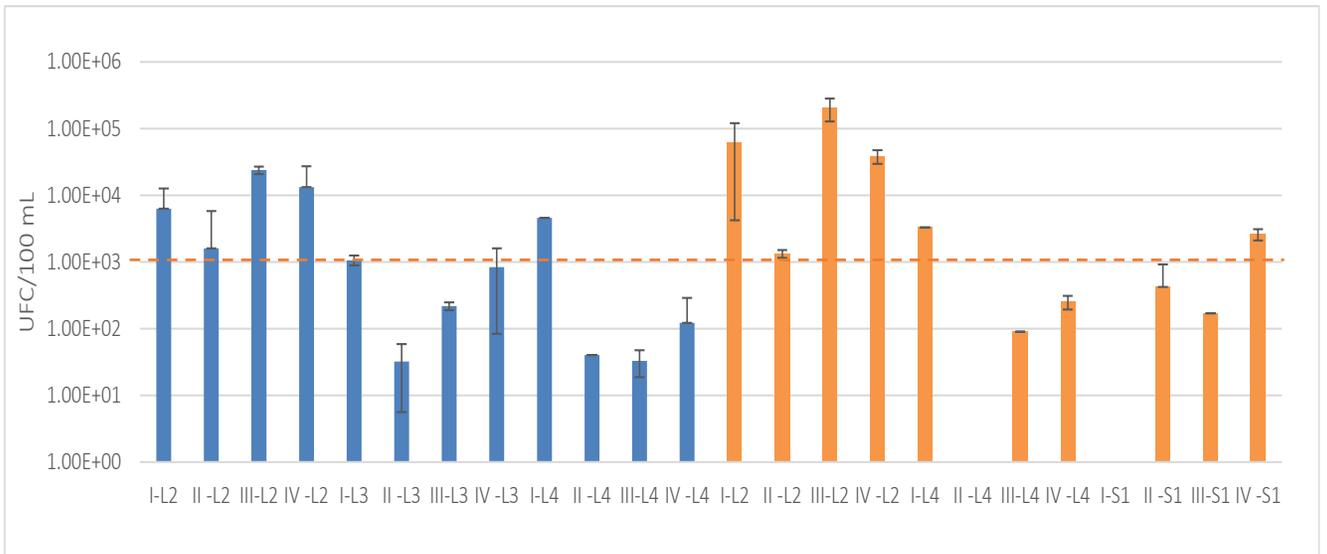


Figura 4. Conteos de CF en la superficie de lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco.

### 5.2.2 Enterococos fecales

Nuevamente, la mayor parte de las muestras de agua de ambas parcelas rebasan las  $1 \times 10^3$  UFC/100 mL de enterococos fecales (EF). (Figura 5). Los resultados se compararon con la directriz utilizada en la Columbia Británica (Warrinton, 1981) que establece un límite de 20 enterococos fecales por cada 100 mL de agua destinada al riego de cultivos que se consumen crudos.

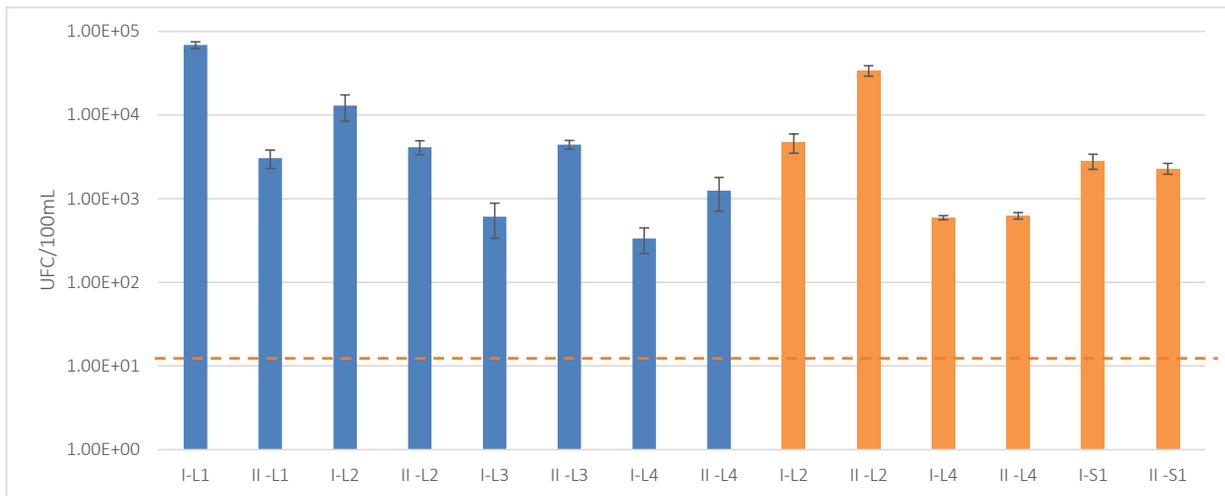


Figura 5. Conteos de enterococos fecales (EF) en las muestras de agua de Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en Warrinton, 1981.

La carga bacteriana de EF presente en el agua también se reflejó en la superficie de las lechugas, El intervalo cuantificado en ambas parcelas rebasa las 1000 UFC/100 mL. Estos resultados no se compararon con ningún criterio, sólo se coloca una línea punteada para la ubicación de las 1000 UFC (Figura 6).

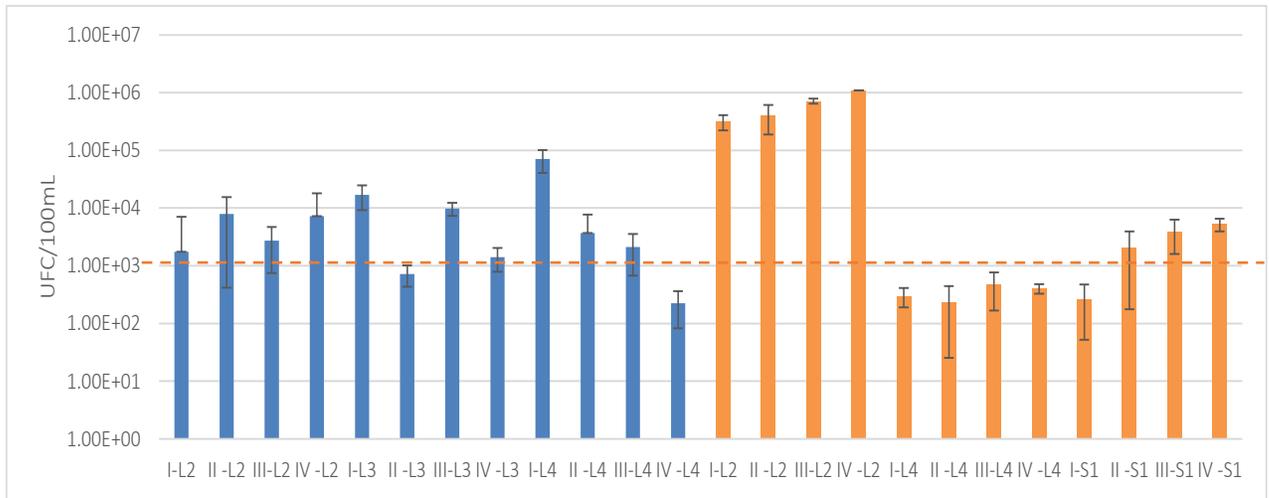


Figura 6. Conteos de EF sobre la superficie de las lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco.

### 5.2.3 Colifagos

En el agua de ambas parcelas, hubo detección de colifagos, de tal manera que en ambas se sugiere contaminación fecal en el agua. Los colifagos se compararon con el criterio de 5 UFP/100 mL establecido en Carolina del Norte, Estados Unidos (Stiegel *et al.*, 2013). Este valor se rebasa en todas las muestras tomadas en este estudio (Figura 7).

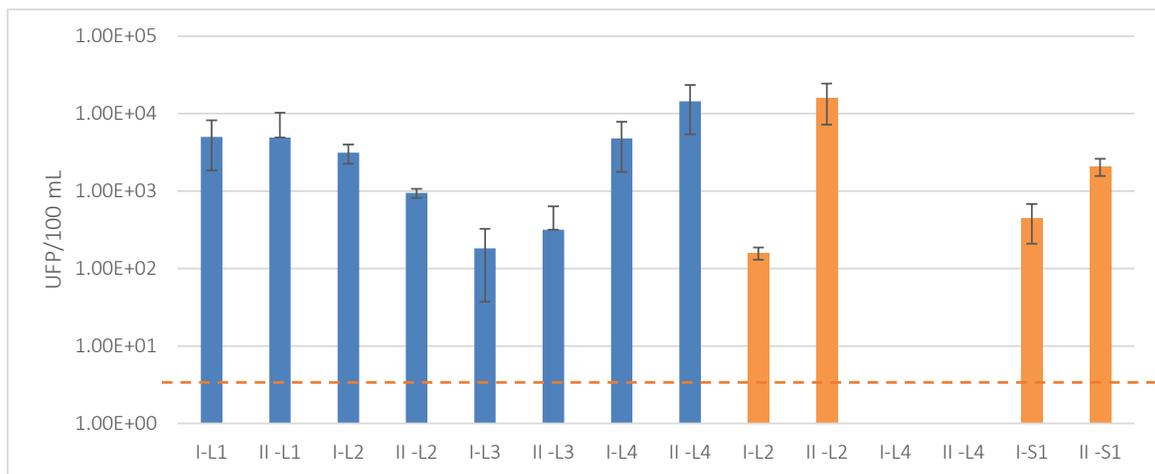


Figura 7. Conteos de colifagos en el agua de Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco. La línea punteada indica el límite máximo permisible establecido en Carolina del Norte, EU (Stiegel *et al.*, 2013).

En las lechugas, conteos de colifagos por arriba de 100 UFP/100 mL fueron encontrados, se coloca una línea punteada para indicar esta observación (Figura 8).

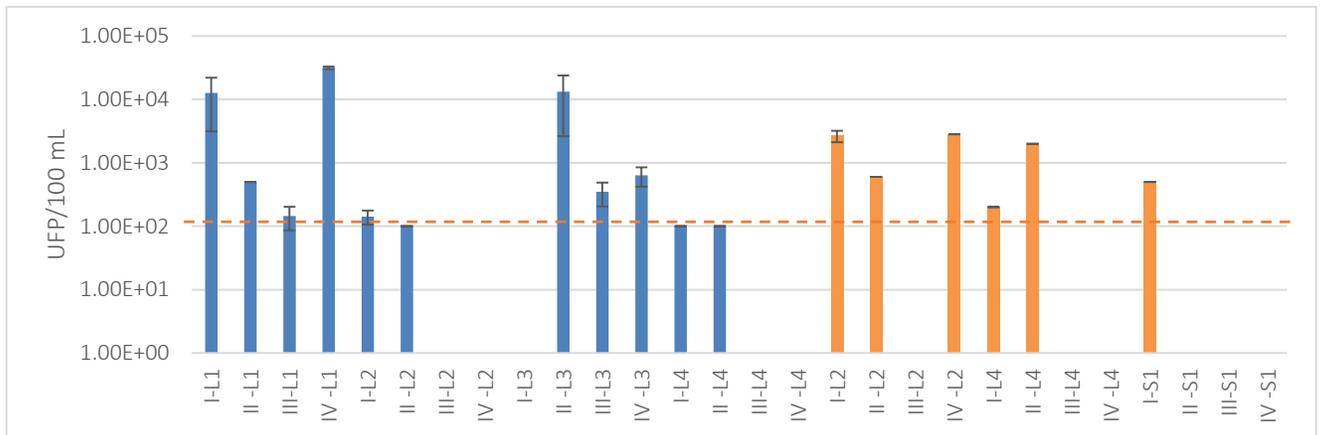


Figura 8. Conteos de colifagos en lechugas de las parcelas Huerta (Barras azules) y Tlilac (Barras naranjas) de San Gregorio Atlapulco.

### 5.3 Rotavirus

#### 5.3.1 Límite de detección

En la RT-PCR se amplificaron todas las diluciones, es decir, se logró detectar hasta 0.1 TCID<sub>50</sub>/mL.

#### 5.3.2 ICC/RT-PCR

Del total de muestras colectadas 18 causaron ECP en la línea celular MA104, después de la infección, esas muestras fueron sometidas a RT-PCR para la detección de rotavirus, los resultados fueron negativos.

En el Laboratorio de Genética Molecular y en Laboratorio de Virología de la FMVZ se realizó la búsqueda de PRRS y HEV respectivamente y los resultados fueron negativos.

Hasta este punto, únicamente se confirmó la presencia de algún elemento capaz de provocar infecciones en las células cultivadas. Con la observación del ECP se resaltó que las lechugas colectadas no fueron inocuas, sin embargo no se confirmó por métodos moleculares la presencia de algún agente viral responsable del ECP.

## **5.4 Enterovirus**

### **5.4.1 Límite de detección**

La amplificación de EV ocurrió para todas las diluciones por lo que se considerará que para cada serotipo el límite de detección es  $<1 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ .

### **5.4.2 RT-PCR**

En la Tabla 10 se indica el nombre de las muestras a partir de las que se hizo la extracción, se muestra si fueron purificadas, cuáles fueron positivas en la RT-PCR y en la re-amplificación.

Tabla 10. Resumen del tratamiento de las muestras positivas a enterovirus que fueron sometidas a la purificación. (-) y (+) indican muestras negativas y positivas respectivamente a RT-PCR.

Muestra (número de identificación)	Origen de la muestra para la extracción de RNA	Purificación de RNA	Resultado RT-PCR	Reamplificación de RT-PCR
R1	Agua		-	
R2	Agua		-	
R3	Pellet	SI	+	+
R4	Pellet	SI	+	+
R5	Pellet	SI	+	+
R6	Cosecha		+	+
R7	Cosecha	SI	+	+
R8	Pellet		+	+
R9	Pellet		+	+
R10	Cosecha		-	
R11	Agua	SI	-	+
R12	Agua	SI	-	
R13	Agua	SI	-	
R14	Agua	SI	-	
R15	Agua		+	+
R16	Pellet		+	+
R17	Cosecha		+	+
R18	Cosecha	SI	-	

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones cuantificadas de las muestras positivas a ICC/RT-PCR y a la re-amplificación.

Tabla 11. Concentración de ácidos nucleicos de las muestras positivas a EV.

<b>Muestras positivas (número de identificación)</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Relación 260/280</b>
R3	207.7	1.53
R4	187.1	1.45
R5	82	1.79
R6	199.3	1.58
R7	158.7	1.58
R8	16.3	1.65
R9	24.9	1.43
R10	152.1	1.49
R15	19.8	1.29
R16	24.3	1.68
R17	16.2	1.46

De las 18 muestras, en la RT-PCR 11 fueron positivas a la amplificación de enterovirus, en la Figura 9 se muestran los resultados observados en un gel de agarosa al 2%. Las 11 muestras positivas a RT-PCR se titularon por medio del método TCID<sub>50</sub> y títulos de las muestras entre 1x10<sup>3</sup> y 1x10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL fueron calculados (Tabla 12).

Además, los muestreos en los que hubo detección se compararon con las campañas nacionales de vacunación de los años 2013 y 2014 para conocer si los resultados encontrados se asociaron temporalmente con las inmunizaciones masivas (Tabla 13).

Figura. 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Reamplificación. MP: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb); CN: Control negativo; 3 a 17: muestras positivas; +: Control positivo (Vacuna Antipoliomielítica Oral). Tamaño del fragmento 194 pb.

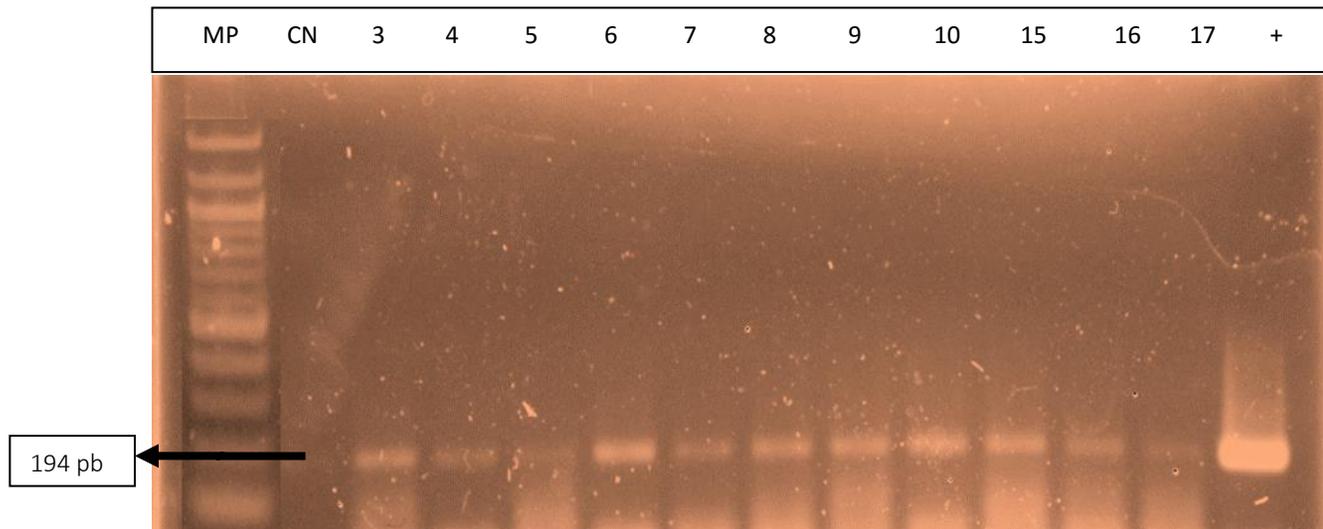


Tabla 12. Títulos virales calculados para las muestras positivas por ICC/RT-PCR.

Número de	TCDI <sub>50</sub> /mL
R3	$1 \times 10^{3.25}$
R4	$1 \times 10^{3.66}$
R5	$1 \times 10^{4.6}$
R6	$1 \times 10^5$
R7	$1 \times 10^{4.06}$
R8	$1 \times 10^3$
R9	$1 \times 10^5$
R10	$1 \times 10^{4.66}$
R15	$1 \times 10^{5.05}$
R16	$1 \times 10^{5.2}$
R17	$1 \times 10^{6.05}$

Tabla 13. Semanas Nacionales de Vacunación de 2013 y 2014.

Semana Nacional de Vacunación	Periodo (2013)	Coincidencia con los muestreos	Semana Nacional de Vacunación	Periodo (2014)	Coincidencia con los muestreos
Primera	23 de febrero-1 de marzo	No coincide	Primera	22 - 28 de febrero	No coincide
Segunda	11-17 de mayo	No coincide	Segunda	24 - 30 de mayo	Se aproxima, un mes de diferencia con el quinto muestreo.
Tercera	7-11 de octubre	Se aproxima, un mes de diferencia con el tercer muestreo.	Tercera	6 al 10 de octubre	No coincide

### 5.4.3 Secuenciación

Los resultados de la alineación del BLAST arrojaron que las muestras amplificadas corresponden a poliovirus tipo I. En la Tabla 14 se indican las secuencias reportadas en el GenBank con las que las muestras tuvieron similitud.

Tabla 14. Similitud de las muestras positivas a enterovirus con secuencias del GenBank.

Número de identificación	Muestreo	Secuencia reportada (número de acceso de GenBank)	% de similitud
R3	L1	Poliovirus tipo I (KJ170436.1)	87
		Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	88
R4	L2	Poliovirus tipo I (EU794964.1)	87
R5	L3	Poliovirus tipo I (AF518096.1)	94
		Poliovirus tipo II (JX274987.1)	92
		Coxsackievirus A21 (EF015031.1)	90
		Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	95
R6	L3	Poliovirus tipo I (EU794964.1)	85
		Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	90
R7	L3	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	97
R8	L3	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	98
R9	L3	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	91
R10	L4	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	95
R15	L4	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	99
R16	L4	Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	98
		Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	98
R17	S1	Poliovirus tipo I (V01148.1)	97
		Poliovirus tipo I (KJ170532.1)	99

Todas las muestras mostraron un porcentaje de similitud arriba del 85% con las cadenas de poliovirus humano tipo I. La alineación realizada en el software MEGA 6.06 se muestra en la Figura 10a, con asteriscos se indican los nucleótidos conservados entre todas las muestras y entre todas las secuencias del GenBank, las muestras que presentaron cambios fueron R3, R5, R7, R10 y R15, tales cambios se resaltan con recuadros y se observan también en el árbol filogenético construido (Figura 10b), pues conformaron diferentes grupos.

	490	500	510	520	530	540
488	c c c a g t g a t t g g c	c t g t c g t a a a	c g c g c a a g t c	c g t g g c g g a a	c c g a c t a c t t	V01150.1
488	. . a g t g a t . g . c .	t g t c g t a . c g .	. . . a a g t c c g t .	g c . g a a c c g a c t a c t t .	g .	EF456706.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	EU794960.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	FJ859059.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	AF405688.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170485.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170510.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170526.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170532.1
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	VAO
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R3
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R4
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R5
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R6
488	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R7

	550	560	570
541	t g g g t g t c c g t g t t t c c t t	t t a t t t t a t t	V01150.1
541	g . t g . c c g t . . t . c c t t . .	a . t . . a . t g .	EF456706.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	EU794960.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	FJ859059.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	AF405688.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170485.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170510.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170526.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170532.1
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	VAO
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R3
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R4
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R5
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R6
541	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R7

	580	590	600	
571	g t g g c t g c t t a t	g g t g a c a a t c a	c	V01150.1
571	. g . c t g g t t a .	g g t . a c . a t c a	c a g	EF456706.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	EU794960.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	FJ859059.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	AF405688.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170485.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170510.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170526.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	KJ170532.1
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	VAO
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R3
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R4
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R5
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R6
571	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . . . . .	R7

	* * * * *	500	* * * * *	510	* * * * *	520				
490	c c a g t g a t t g g	c c t g	t c g t a a a c g c g c a a g				V01150.1			
490	.	.	.	.	.	.	EF456706.1			
490	.	.	.	.	.	.	EU794960.1			
490	.	.	.	.	.	.	FJ859059.1			
490	.	.	.	.	.	.	AF405688.1			
490	.	.	.	.	.	.	KJ170485.1			
490	.	.	.	.	.	.	KJ170510.1			
490	.	.	.	.	.	.	KJ170526.1			
490	.	.	.	.	.	.	KJ170532.1			
490	.	.	.	.	.	.	R8			
490	.	.	.	.	.	.	R9			
490	.	.	.	g	.	.	R10			
490	.	.	.	.	.	.	R15			
490	.	.	.	.	.	.	R16			
490	.	.	.	.	.	.	R17			
	* * * * *	530	* * * * *	540	* * * * *	550				
521	t c c g t g g c g g	a a c c g a c t a c	t t t g g g t g t c				V01150.1			
521	.	.	.	.	.	.	EF456706.1			
521	.	.	.	.	.	.	EU794960.1			
521	.	.	.	.	.	.	FJ859059.1			
521	.	.	.	.	.	.	AF405688.1			
521	.	.	.	.	.	.	KJ170485.1			
521	.	.	.	.	.	.	KJ170510.1			
521	.	.	.	.	.	.	KJ170526.1			
521	.	.	.	.	.	.	KJ170532.1			
521	.	.	.	.	.	.	R8			
521	.	.	.	.	.	.	R9			
521	.	.	.	.	a t	a	R10			
521	.	.	.	.	.	.	R15			
521	.	.	.	.	.	.	R16			
521	.	.	.	.	.	.	R17			
	* * * * *	560	* * * * *	570	* * * * *	580				
551	c g t g t t t t c c	t t t t a t t t t a	t t g t g g c t g c				V01150.1			
551	.	.	.	.	.	.	EF456706.1			
551	.	.	.	.	.	.	EU794960.1			
551	.	.	.	.	.	a	FJ859059.1			
551	.	.	.	.	.	.	AF405688.1			
551	.	.	.	.	a	.	KJ170485.1			
551	.	.	.	.	.	.	KJ170510.1			
551	.	.	.	.	.	.	KJ170526.1			
551	.	.	.	.	.	g	KJ170532.1			
551	.	.	.	.	.	.	R8			
551	c g t	g	.	.	.	.	R9			
551	a	t	c a	a t	c	.	R10			
551	.	g	.	.	.	.	R15			
551	.	.	.	.	.	.	R16			
551	.	.	.	.	.	.	R17			
	* * * * *	590	* * * * *	600	* * * * *	610	* * * * *	620	* * * * *	626
581	t t a t g g t g a c	a a t c a c a g a t	t g t t a t c a t a a a	g c g a a t t g	g a t t g g					V01150.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	EF456706.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	EU794960.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	FJ859059.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AF405688.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	KJ170485.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	KJ170510.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	KJ170526.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	KJ170532.1
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R8
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R9
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R10
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R15
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R16
581	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R17

Figura 10a. Alineación de secuencias de nucleótidos de la región no codificante de los poliovirus tipo I.

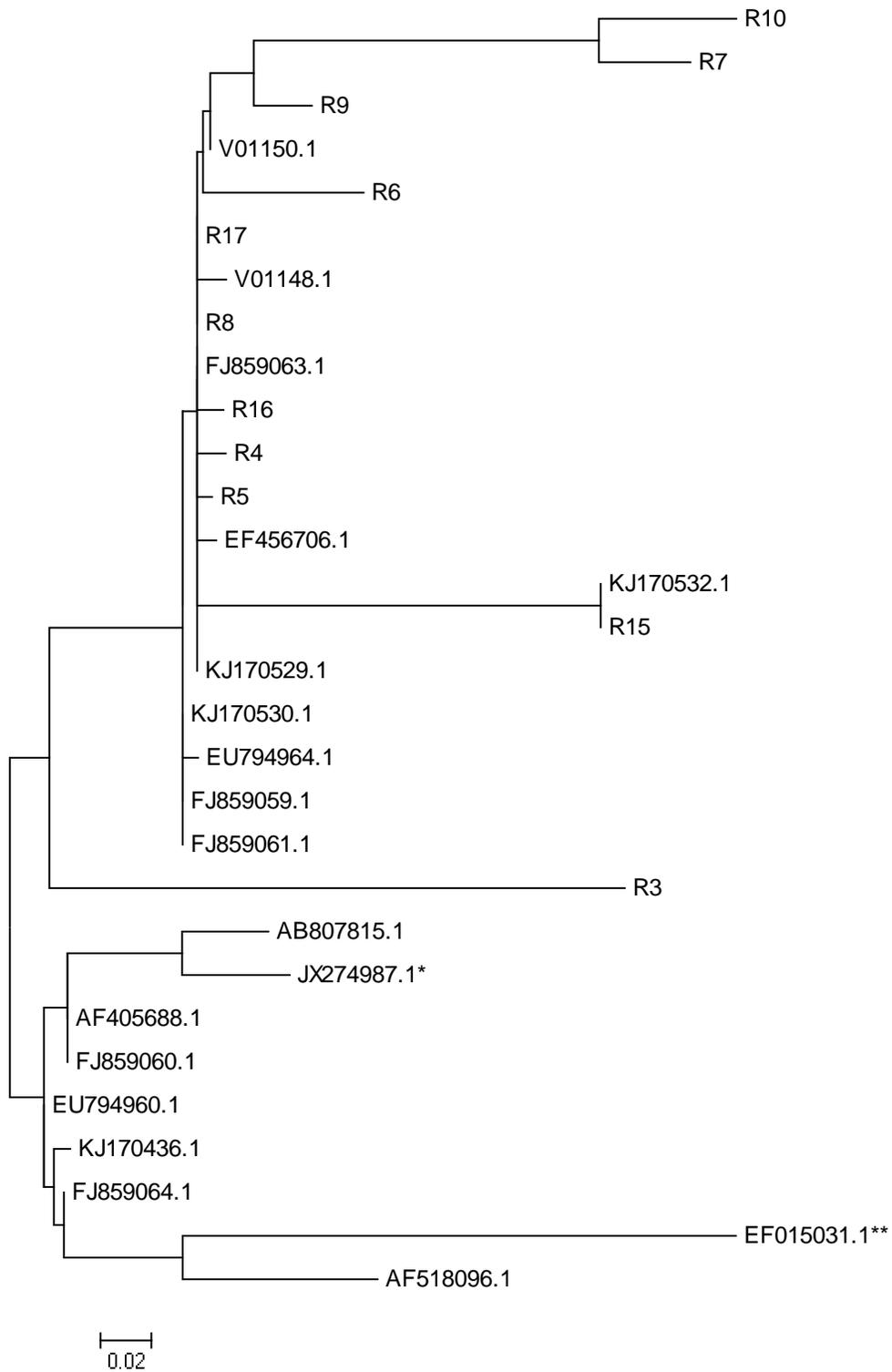


Figura 10b. Árbol filogenético construido entre las secuencias obtenidas de poliovirus tipo I presente en las muestras de agua y lechugas.

## 6. Discusión

### Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos y la presencia de virus no estuvieron asociados a alguna de las dos parcelas en particular, a pesar de que en Tlilac se registró mayor conductividad que en Huerta. Esta diferencia no se reflejó en el número de muestras positivas, incluso en la parcela Huerta el número de muestras positivas fue mayor (una muestra de agua y seis muestras de lechugas), mientras que en Tlilac en tres muestras de agua hubo detecciones y sólo una muestra de lechugas fue positiva.

Los resultados de las gráficas combinadas mostraron que la presencia de virus en Huerta ocurrió entre los 17.4 y 17.6°C, mientras que en Tlilac el intervalo de temperatura en el que se detectaron virus fue de 15.5 a 17°C, lo anterior demuestra que las temperaturas bajas favorecen la presencia de virus. La detección viral se dio en condiciones neutras e incluso básicas como ocurrió en la Huerta en un pH de 8. El intervalo de conductividad en la Huerta en el que hubo detecciones de poliovirus fue de 1260 a 1944  $\mu\text{S}/\text{cm}$  mientras que en Tlilac fue de 2054 a 2150  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , valores de conductividad reportados para el agua residual, tanto tratada como no tratada (Horward *et al.*, 2014). En ambas parcelas la turbidez estuvo entre 7 y 35 NTU (Ver anexo).

Dos de los parámetros más comunes que influyen en la inactivación de los virus, la temperatura y la radiación ultravioleta indicaron que la presencia viral se dio a temperaturas menores a 18 °C, posiblemente debido a la conservación de la cápside y los ácidos nucleicos de los virus detectados. En cuanto a la radiación ultravioleta, las dosis necesarias para la inactivación de poliovirus tipo I reportadas en la literatura se compararon con los datos del SIMAT, únicamente se consideró la información para poliovirus debido a que fue el único agente detectado en las muestras de agua y de lechugas. Con base en la Tabla 2, un intervalo de 4 a 31  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  es necesario para su inactivación. En el primer y quinto muestreo únicamente las dosis máximas de UV-A cayeron en el intervalo de 4 a 31  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  y fue justo en el primer muestreo en donde la detección viral fue negativa, por lo que la ausencia de poliovirus podría explicarse por una

inactivación atribuida a luz ultravioleta. El promedio de la dosis durante cada muestreo fue menor a  $4 \text{ mJ/cm}^2$  por lo que la presencia de los virus no resultó afectada.

### **Indicadores de contaminación fecal**

En ninguna de las dos parcelas evaluadas se cumple la NOM-001-SEMARNAT-1996 cuando se compararon los conteos de coliformes fecales en el agua de Huerta y Tililac. A nivel internacional, existen estándares más estrictos como es el caso de California en donde se ha establecido en agua de riego un parámetro de 2 bacterias coliformes/100 mL (Blumenthal *et al.*, 2000) y sus efluentes generados requieren de tratamientos avanzados para lograr obtener efluentes libres de virus (Gerba y Choi, 2006).

A falta de legislación mexicana para los enterococos fecales los resultados se compararon con la directriz utilizada en la Columbia Británica (Warrinton, 1981), un criterio en donde se establecen 20 enterococos fecales/100 mL como límite máximo para el agua de riego de cultivos que se consumen crudos, en ese sentido el agua utilizada para el riego en ambas parcelas no cumplió este parámetro

La presencia de los colifagos al ser considerados modelos de virus entéricos indicaron la posible presencia en las muestras, situación que fue corroborada con la detección de poliovirus tipo I. La presencia de colifagos no se comparó con algún criterio nacional, incluso, el estado de Carolina del Norte de Estados Unidos es una de las pocas instituciones que ha sugerido a los colifagos como indicador microbiológico del agua de reúso, proponiendo un límite de 5 UFP/100 mL (Stiegel *et al.*, 2013). Al ser un criterio más estricto, el agua analizada no cumplió con lo establecido. Otros estados como Arizona incluyen también el monitoreo de los virus en efluentes utilizados para el riego de productos que se consumen crudos en donde se acepta hasta 1 UFP/40 L (Rose *et al.*, 1989).

La presencia de coliformes, enterococos y colifagos en lechugas no se pudo comparar con algún criterio debido a que no han sido desarrollados aún, sin embargo, se considera, que los niveles de microorganismos una vez que tengan contacto con los vegetales no deben de

exceder los límites establecidos para el agua utilizada para el riego (Fewtrell y Bartram, 2001).

### **Detección viral por ICC/RT-PCR**

La determinación positiva de la infectividad sugirió la presencia de algún agente capaz de infectar la línea celular MA104. Las pruebas moleculares fueron negativas para rotavirus, hepatitis E y PRRS. En el caso particular de rotavirus, se obtuvo un límite de detección para la técnica de 0.1 TCID<sub>50</sub> /mL, lo que sugiere que los resultados negativos no se pueden asociar a fallas técnicas, de hecho, todos los controles negativos y positivos funcionaron correctamente. Otros factores como los dos tipos de extracciones llevadas a cabo y la purificación de ácidos nucleicos tampoco tuvieron efectos en la ausencia de rotavirus, debido a que incluso muestras que no fueron purificadas resultaron positivas a enterovirus. Es posible que los enterovirus encontrados en las muestras presentaron mayor resistencia a las condiciones ambientales que los rotavirus, se ha sugerido que en el estudio con muestras de agua es más fácil aislar enterovirus (Mara y Horan, 2003).

Los resultados de la secuenciación sugieren la presencia de poliovirus tipo I en las muestras de agua y lechugas, al comparar el porcentaje de similitud de las muestras con el control positivo, el cual fue la Vacuna Antipoliomielítica Oral se presentaron valores de similitud por arriba del 90% , en la mayoría de las 11 muestras positivas a ICC/RT-PCR. Por lo anterior se infirió que poliovirus vacunal está circulando todo el año en el medio, durante los cinco muestreos incluidos en dos temporadas: lluvias y secas hubo detección del genoma de poliovirus, situación que se explica debido a la inmunización constante establecida en el esquema de vacunación. Como norma internacional el esquema básico de consiste en tres dosis, con intervalo de dos meses entre cada una, iniciándose a los dos meses de vida. En México se administran dosis adicionales en las Semanas Nacionales de Salud en niños menores de cinco años. El análisis de las secuencias (alineamiento y filogenia) sugiere que los virus detectados corresponden a cepas vacunales correspondientes al serotipo 1. En la Tabla 13 se muestran las fechas en que se llevaron a cabo las Semanas Nacionales de Vacunación en los años 2013 y 2014 con la finalidad de relacionar la presencia de los EV detectados con los programas de inmunización, el resultado de esta comparación sugiere

que poliovirus vacunal circula durante todo el año en el agua residual debido a las excreciones de niños vacunados continuamente, ya que el resultado de las campañas masivas de inmunización es que en corto tiempo se acumula un alta concentración de virus en el ambiente y por tanto las cepas que circulan son principalmente vacunales con la probabilidad de ser detectadas, sin embargo, un estudio en Colombia, en donde no existen campañas masivas de vacunación encontró la circulación de cepas vacunales en aguas residuales (González *et al.*, 2006).

### **Riesgo a la salud pública**

La detección de microorganismos en el agua residual está asociada al establecimiento de criterios enfocados a la protección de la salud pública, en México la implementación de la evaluación de riesgo es un tema incipiente, los estudios realizados se han llevado a cabo fuera del país. En una primera aproximación realizada en Jerusalén por Shuval *et al.*, 1997, se desarrolló un QMRA para estimar el riesgo enfocado a las verduras que se consumen crudas y que son regadas con agua residual, Shuval y colaboradores estimaron que por cada 1000 bacterias en 100 g de lechugas se encuentra 1 virus entérico, en este caso la probabilidad de riesgo se encuentra entre  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  lo que equivale a 1 caso/1,000,000 personas/año y 1 caso/10,000,000 de personas/año respectivamente, lo que está dentro del límite establecido por la USEPA (1 caso/10,000 personas/año). En Ghana, en el estudio de Seidu *et al.*, 2008 también se desarrolló un QMRA asociado con el reúso del agua residual utilizando a rotavirus como modelo, el riesgo estimado de una infección por rotavirus para los consumidores de lechugas regadas con agua residual fue de  $10^{-3}$ , se propone que este dato no debe de considerarse para todos los virus entéricos a diferencia del estudio de Shuval *et al.*, 1997 en donde sus resultados son considerados para los virus entéricos en general. Si consideramos el estudio de Shuval *et al.*, (1997) y que además en la mayoría de los muestreos se detectaron más de 1000 bacterias en las lechugas entonces el criterio de la USEPA no se cumpliría, sin embargo el riesgo se compensa debido a que los agentes detectados fueron vacunales, lo que implica una inmunización constante de los consumidores de las hortalizas evaluadas, esto se respalda con reportes de la OMS para América Latina en donde se sugiere que el riesgo de adquirir poliomiélitis por cepas vacunales no afecta a la erradicación global del padecimiento (Andrus *et al.*, 1995).

## 7. Conclusiones

Con el registro de los parámetros fisicoquímicos se demostró el papel regulador del ambiente ante los agentes infecciosos, resaltó el efecto de la luz ultravioleta sobre la presencia de los virus entéricos, pues dosis de  $4 \text{ mJ/cm}^2$  son capaces de inactivarlos.

Se presentó contaminación fecal representada por la presencia de coliformes fecales, enterococos fecales y colifagos en agua de riego y en lechugas en Huerta y Tlilac, dos parcelas de San Gregorio Atlapulco.

Los indicadores de contaminación fecal en las muestras de agua rebasaron criterios considerados riesgosos para la salud humana.

La falta de criterios de microorganismos indicadores sobre alimentos que se consumen crudos no permitió la comparación de los conteos de bacterias y colifagos sobre las lechugas con algún criterio.

Las lechugas no fueron inocuas por presentar algún elemento capaz de infectar la línea celular MA104.

No se detectó por RT-PCR la presencia de rotavirus, hepatitis E ni PRRS en las matrices ambientales. Poliovirus tipo I fue el agente detectado en el agua y en las lechugas colectadas.

Se confirmó que las cepas vacunales de poliovirus están circulando todo el año en el medio y se sugiere que el riesgo de la inmunización constante no altera la erradicación global de la poliomielitis.

## 8. Recomendaciones

Los coliformes fecales son las únicas bacterias indicadoras del agua residual destinada para el riego, se sugiere incluir en su monitoreo la determinación de otros grupos como se realizó en este estudio, tal es la necesidad de complementar la información microbiológica que los criterios a nivel internacional cada vez son más estrictos y las 1000 UFC/100 mL es un valor que está comenzando a ser cuestionado.

Se recomienda incluir en el monitoreo factores como la medición de la luz ultravioleta pues su efecto germicida modifica la presencia de patógenos en el ambiente.

A pesar de que no hubo detección de rotavirus en ninguna de las dos matrices ambientales, se recomienda continuar con su evaluación debido a que se trata de un virus con importancia en la salud pública, algunas estimaciones de riesgo se basan en el uso de rotavirus como modelo y su uso como patógeno indicador de contaminación fecal se ha sugerido. Rotavirus y enterovirus son los virus que se han utilizado principalmente bajo este fin por diferentes propiedades como su resistencia a las condiciones ambientales, su persistencia por largos periodos en cuerpos de agua y su asociación con infecciones en poblaciones humanas.

Finalmente, para corroborar la presencia de cepas vacunales se recomienda realizar una RT-PCR para poliovirus, con el uso de primers específicos para los serotipos I, II y III.

## Bibliografía

- Agbalika F, Hartemann, Hartemann P, Foliguet JM. 1984. Trypsin-treated Ma-104: A sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 47(2): 378-380.
- Aguilar A, Espinosa AC, Perichi CC. 2006. El manejo del agua. Tema central en Xochimilco. En: *Xochimilco: Un Proceso de gestión participativa. UNESCO-Xochimilco. Gobierno del Distrito Federal. México* 183-190.
- Aguilar IA, Zambrano L, Valiente LE, Ramos-Bueno Arturo. 2013. Enhancing the potential value of environmental services in urban wetlands: An agro-ecosystem approach. *Cities* 418-443.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21a ed. Centennial Edition. Washington D.C. 9-63.
- American Type Culture Collection (ATCC)  
[https://www.atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines/Animal/Monkey/CRL-2378.1.aspx#generalinformation](https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Animal/Monkey/CRL-2378.1.aspx#generalinformation). Consultado el 12 de abril de 2015.
- Andrus JK, Strebel PM, de Quadros CA, Olivé JM. 1995. Risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Latin America, 1989-91. *Bulletin of the World Health Organization* 73(1): 33-40.
- Arcos-Pulido MP, Ávila de Navia SL, Estupiñán TSM, Gómez PAC. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova* 3(4): 69-79.
- Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. 2001. Indicators of Microbial Water Quality. World Health Organization. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health* 289-316.
- Badawy AS, Gerba CP, Kelley LM. 1985. Survival of rotavirus SA-11 on vegetables. *Food Microbiology* 2: 199-205.
- Balderrama CA, Gortáres P. 2011. El Procedimiento de la evaluación cuantitativa de riesgos en la predicción de peligros biológicos. *Ide@s CONCYTEG* 6(71): 519-525.

- Barquero MS, Jiménez CLM, Chacón, Jiménez BK, Araya AR. 2012. Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología* 19(3): 335-340.
- Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. 2001. Survival of hepatitis A virus on modified atmosphere-packaged (MAP) lettuce. *Food Microbiology* 18: 95-102.
- Birmex.2015. <http://www.birmex.gob.mx/nuestros-productos>. . Consultado el 23 de junio de 2015.
- BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Blumenthal U, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Mara D. 2000. A Review of policy and standards for wastewater reuse in agriculture: A Latin American perspective. *Report summary of WELL Task No. 68 (Part 2)*: 1-74.
- Bosch A, Pintó RM, Abad FX. En: Goyal SM. 2006. *Viruses in Foods*. Springer. New York, USA. pp. 151-187.
- Bunge V. El estado de saneamiento en las Cuencas de México. En: Cotler HA. 2010. *Las cuencas hidrográficas de México. Diagnóstico y priorización*. México, D.F. pp. 92-95.
- Burns E. 2009. Repensar la cuenca. La gestión de ciclos del agua en el Valle de México. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp. 37-48.
- Casas N, Suñén E. 2002. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiological Research* 157: 169-175.
- Ceballos BS, Soares NE, Moraes MR, Catao RM, König A. 2003. Microbiological aspects of an urban river used for unrestricted irrigation in the semiarid region of north-east Brazil. *Water Science and Technology* 47: 51-57.
- Cifuentes E, Blumenthal U, Ruiz G, Bennett S, Quigley M, Peasey A. 1993. Problemas de salud asociados al riego agrícola con agua residual en México. *Salud Pública de México* 35(6): 614-619.
- Cifuentes E. 1998. The epidemiology of enteric infections in agricultural communities exposed to wastewater irrigation: Perspectives for risk control. *International Journal of Environmental Health Research* 8(3): 203-213.

- Coll Morales J. 1993. Técnicas de diagnóstico en virología. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. pp. 137.
- Croci L, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Toti L. 2002. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 73(1): 29-34.
- Crossley P. L. 2004. Sub-irrigation in Wetland Agriculture. *Agriculture and Human Values* 21(2-3): 191–205.
- De Abin MF, Spronk G, Wagner M, Fitzsimmons M, Abrahante JE, Murtaugh MP. 2009. Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages. *Canadian Journal of Veterinary Research* 73(3): 200-204.
- De la Rosa Benitez J. 2006. La contaminación del lago Xochimilco por aguas negras y su influencia en la agricultura local. Tesina de Licenciatura. Facultad de Filosofía y Letras, UNAM. México, D.F. 71 p.
- Desselberger U. 2014. Rotaviruses. *Virus Research* 190: 75-96.
- Dirección General de Epidemiología (DGE). 2014. En Línea. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/completo/sem44.pdf>. Consultado el 23 de noviembre de 2014.
- DOF. 1997. NOM-001-SEMARNAT-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. DOF 6 de enero de 1997.
- Endley S, Johnson E, and Pillai SD. 2003. A simple method to screen cilantro and parsley for fecal indicator viruses. *Journal of Food Protection* 66: 1506-1509.
- Espigares-García M. 2006. Virus en aguas de consumo. *Higiene y Sanidad Ambiental* 6: 173-189.
- Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42(10-11): 2618-2628.
- Esteves-Jaramillo A, López-Collada R. 2012. Hacia la erradicación de la poliomielitis: logros y retos en México. *Salud Pública México* 54(5): 537-543.

- Ferguson AS, Layton AC, Mailloux BJ, Culligan PJ, Williams DE, Smartt AE, Sayler GS, Feighery J, McKay LD, Knappett PS, Alexandrova E, Arbit T, Emch M, Escamilla V, Ahmed KM, Alam MJ, Streatfield PK, Yunus M, van Geen A. 2012. Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Science of the Total Environment* 431: 314-322
- Fewtrell L, Bartram J. 2001. World Health Organization (WHO). *Guidelines, Standards and Health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. IWA Publishing. Londres, Reino Unido. 431 p.
- Fong TT, Lipp EK. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2): 357-371.
- Fumian TM, Leite JP, Marin VA, Miagostovich MP. 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *Journal of Virological Methods* 155: 39-43.
- Gerba CP, Choi CY. En: Goyal SM. 2006. *Viruses in Foods*. Springer. New York, USA. pp. 257-262.
- González MM, Sarmiento L, Castaño JC, Giraldo AM, Salazar A, Muñoz NJ. 2006. Detecting poliovirus in wastewater from Armenia, Colombia. *Revista de Salud Pública* 8: 13-23.
- Goyal SM. 2006. *Viruses in Foods*. Springer. New York, USA. pp. 101-119.
- Greening EG. En: Goyal SM. 2006. *Viruses in Foods*. Springer. New York, USA. pp. 5-35.
- Health Canada. 2011. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document - Enteric Viruses*. Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. Catalogue No H129-6/2011E.
- Hirneisen KA, Kniel KE. 2013. Inactivation of internalized and surface contaminated enteric viruses in green onions. *International Journal of Food Microbiology* 166(2): 201-206.

- Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L. 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research* 37(19): 4703-10.
- Howard I, Espigares E, Lardelli P, Martín JL, Espigares M. 2004. Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environmental Toxicology* 19(3): 241-249.
- <http://www.who.int/uv/faq/whatisuv/en/index2.html>. Consultado el 05/04/2015.
- Huang JA, Nagesha HS, Snodgrass DR, Holmes IH. 1992. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 85-92.
- Hussain I, Raschid-Sally L, Hanjra MA, Marikar F, van Der Hoek W. 2002. Wastewater use in agriculture: Review of impacts and methodological issues in valuing impacts. Colombo, Sri Lanka: *International Water Management Institute Working Paper* 37: 1-68.
- Hyypiä T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. 1997. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *The Journal of General Virology* 78: 1-11.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. En Línea. Disponible en: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Consultado el 8 de febrero de 2015.
- ISO 10705-1. 1995. Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.
- Jiménez JJ, Rojas-Rabiela T, Del Amo S, Gómez-Pompa A. 1995. Conclusiones y recomendaciones del Taller. En: Rojas-Rabiela T. *Presente, pasado y futuro de las chinampas*. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco, A.C. México D.F. 19-43.
- Juárez-Figueroa LA, Silva-Sánchez J, Uribe-Salas FJ, Cifuentes-García E. 2003. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, Mexico City. *Salud Pública México* 45(5): 389-395.

- Kurdziel AS, Wilkinson N, Langton S, Cook N. 2001. Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *Journal of Food Protection* 64(5):706-709.
- Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60(10): 3665-71.
- López A, Guerrero M, Hernández C, Aguilar A. 2006. Rehabilitación de la Zona Chinampera. En: Xochimilco: Un Proceso de gestión participativa. UNESCO-Xochimilco. Gobierno del Distrito Federal. Ciudad de México. México 183–229.
- Mara D, Horan N. 2003. *Handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press, London, 819 pp.
- Masclaux FG, Hotz P, Friedli D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Research* 47(14): 5101-5109.
- McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR, Lukasik JO. 2006. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and environmental microbiology* 72(12): 7567-7574.
- Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. 2014. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 6: 45-59.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005 y 2010. En Línea. Disponible en: <http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/> y en: <http://www.who.int/uv/faq/whatisuv/en/index2.html>. Consultado el 23 de noviembre de 2014 y del 15 de febrero de 2015 al 30 de marzo de 2015.
- Pachepsky Y, Shelton DR, McLain JE, Patel J, Mandrell RE. 2011. Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: A review. En: *Advances in Agronomy* Elsevier Inc. Delaware, USA. pp. 73-138.
- Payment P, Trudel M, Alain R, Arella M, Belloncik S, Berthuaume L, Fafard A, Fossiez F, Hamelin C, Houde M, Jouvienne P, Lecamte J, Lussier C, Simard C, Talbot P,

Verbeek JA. 1993. *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp.32.

- Pillai SD. En: Goyal SM. 2006. *Viruses in Foods*. Springer. New York, USA. pp. 205-222.
- Rodríguez-Frias F, Jardi R, Buti M. 2012. Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30(10): 624-634.
- Rojas M, Ayala BC, López S. 2008. Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA. *Mensaje Bioquímico* 32: 149-162.
- Rose JB, De Leon R, Gerba CP. 1989. *Giardia* and Virus monitoring of sewage effluent in the state of Arizona. *Water Science & Technology* 21(3): 43-47.
- Rzezutka A, Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews* 28(4): 441-53.
- Saavedra MC, Tovar C, Betancourt WQ. 2012. Virus entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. *Interciencia* 37(4): 260-265.
- Secretaría de Salud. 2006.  
<http://www.salud.gob.mx/unidades/conava/vacun/faqantipol.htm>. y  
<http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/descargas/vacunas/ManualVacunacion2008-2009.pdf> Consultadas el 16 de febrero de 2015.
- Seidu R, Heistad A, Amoah P, Drechsel P, Jenssen PD, Stenström TA, Silva J, Torres P. 2008. Quantification of the health risk associated with wastewater reuse in Accra, Ghana: a contribution toward local guidelines. *Journal of Water and Health* 6(4): 461-471.
- Shuval H, Lampert Y, Fattal B. 1997. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Science and Technology* 35(11-12): 15-20.
- Smit J, Nars J. 1992. Urban agriculture for sustainable cities: using wastes and idle land and water bodies as resources. *Environment and Urbanization* 4(2): 141-152.

- Stiegel PD, Mann, M., & Dalton, M. 2013. Alternate Indicator Organisms for Reclaimed Water in North Carolina. *Proceedings of the Water Environment Federation* 2013(2), 107-114.
- Svraaka S, Duizer E, Vennema H, De Bruin E, Veer B, Dorresteyn B, Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology* 45(5): 1389-1394.
- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* 54: 81-127.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- van den Berg H, Lodder W, van der Poel W, Vennema H, de Roda Husman AM. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in microbiology* 156(4):532-540.
- van Lieverloo JH, Blokker EJ, Medema G. 2007. Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations. *Journal of Water and Health* 5: 131-49.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad X, Pintó RM, Bosch A. 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3919-3923.
- Ward BK, Irving LG. 1987. Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. *Water Research* 21: 57-63.
- Warrinton, 1981. Water Quality Criteria for Microbiological Indicators Overview Report. <http://www.env.gov.bc.ca/wq/BCguidelines/microbiology/microbiology.html>. Consultado el 4 de diciembre de 2014.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J. 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology* 91(6): 945-962.
- Yates MV. Classical indicators in the 21st century--far and beyond the coliform. *Water Environment Research* 79(3): 279-86.

## Anexo

Asociación de los parámetros fisicoquímicos con la presencia de enterovirus (EV). Se muestran los muestreos correspondientes a cada parcela, Huerta y Tililac, representadas en barras azules y barras anaranjadas respectivamente. Los puntos naranjas representan cada uno de los parámetros medidos.

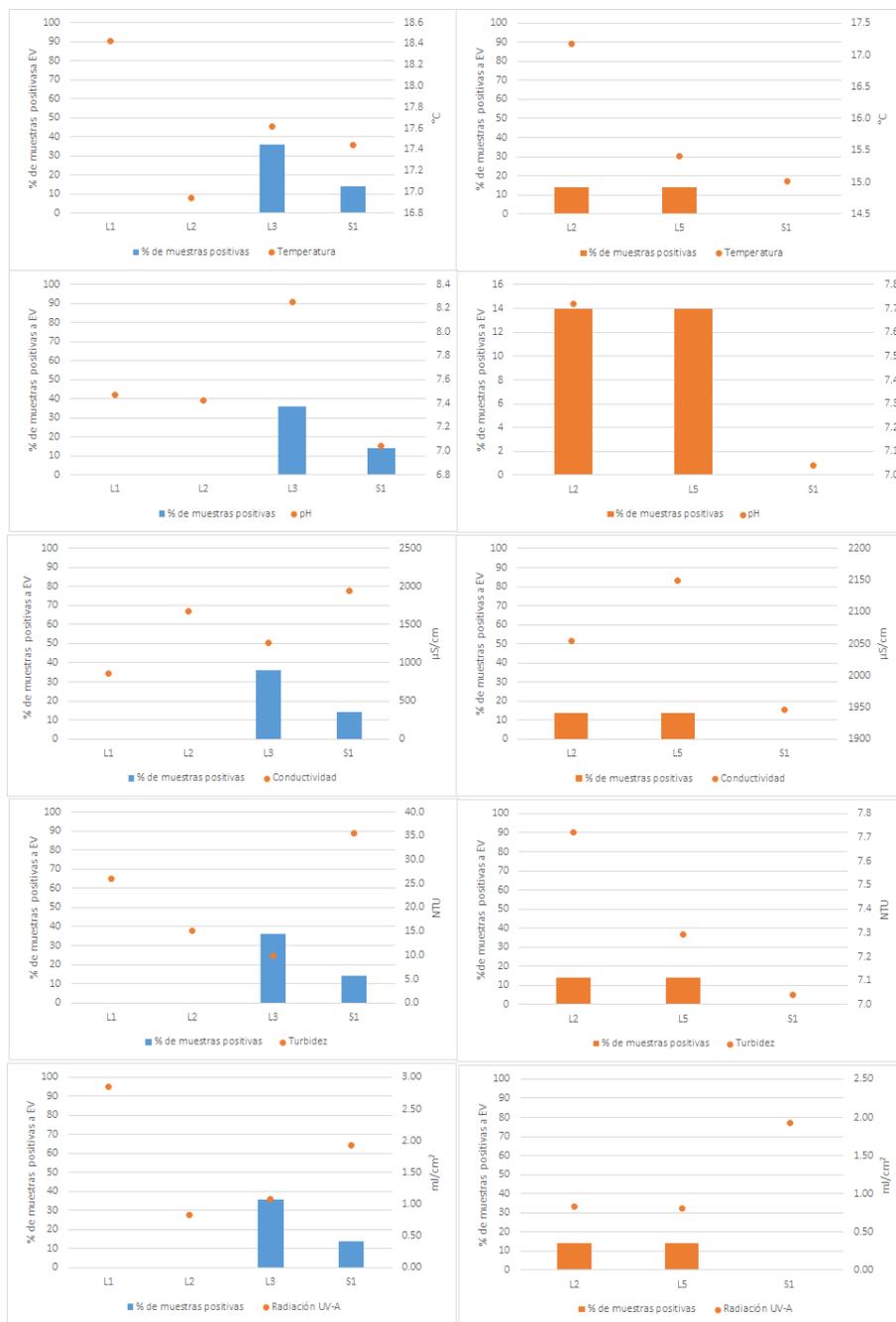


Figura 11. Parámetros fisicoquímicos asociados al porcentaje de muestras positivas a enterovirus por la técnica de ICC/RT-PCR.