



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

INSTITUTO DE ECOLOGIA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR DE PUNTO FINAL PARA LA
DETECCIÓN DE VIRUS DE HEPATITIS A EN AGUA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROSA SOLANO ORTIZ

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARISA MAZARI HIRIART
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INST. DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

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 ECOLOGIA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR DE PUNTO FINAL PARA LA
DETECCIÓN DE VIRUS DE HEPATITIS A EN AGUA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROSA SOLANO ORTIZ

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARISA MAZARI HIRIART
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INST. DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

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 Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 13 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 **SOLANO ORTIZ ROSA** con número de cuenta **302031180** con la tesis titulada: **"Estandarización de la técnica de RT-PCR de punto final para la detección de virus de hepatitis A en agua"** bajo la dirección de la **DRA. MARISA MAZARI HIRIART**:

Presidente:	DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ
Vocal:	DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
Secretario:	DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Suplente:	DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
Suplente	DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 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 UNAM** por la oportunidad dada para seguir con mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado, sin el cual no hubiese logrado realizar.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart, mil gracias Marisa por siempre confiar en tus alumnos. Por el apoyo y las oportunidades que nos das al hacernos partícipes de los proyectos que hay en el laboratorio. Gracias por confiar en que era capaz de lograr estandarizar la técnica para poder detectar este virus que se nos había negado en la tesis de licenciatura.

A la Dra. Ana Espinosa García, la culpable de que me haya encaprichado con este virus. Esta tesis va con dedicatoria especial para ti, porque aunque no estuviste en mi comité, siempre me apoyaste, ayudaste a resolver mis dudas y a acomodar mis ideas locas en la cabeza. Qué bueno es conocer a doctoras como tú.

A la Dra. Yolanda López Vidal, que cada tutorial me hizo sufrir, pero de los cuales siempre salí con un nuevo aprendizaje. Gracias, porque sé que su intención siempre fue que yo mejorara como alumna, que fuera más crítica y capaz de resolver los problemas con los que día a día uno se enfrenta en el laboratorio.

Al Dr. Alejandro García Carranca, mil gracias por los comentarios y observaciones. Gracias por haberme ayudado a resolver el problema de la clonación de mi fragmento, al darme la oportunidad de ir a su laboratorio.

A los miembros del Comité de examen, la Dra. Luisa Falcón, Dra. Rosa Elena Sarmiento y el Dr. Salvador Fonseca, por el tiempo dedicado en las correcciones de mi tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Torres, Doc ochorrocintas mil gracias. En su laboratorio no sólo adquirí conocimiento científico, también encontré a un gran amigo. Ya ve, porque no se dedica a cosas ambientalosas, chance y hasta me cambiaba a su Lab.

Al Dr. José Luis González Montoya, gracias por la ayuda proporcionada para la clonación, también por la paciencia que me tuviste en lo que te agarraba la onda de que me hablabas. Y aunque te trate muy poco, se nota que eres un muy buen científico y una muy buena persona.

Al laboratorio de gastroenterología, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Gracias al laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del INCan.

Gracias a Erika Rodríguez, secretaria del posgrado en el Instituto de Ecología por siempre ayudar a resolver mis problemas en todo el papeleo. Aún y cuando es tu trabajo, gracias por tu amabilidad.

Por supuesto, que muchas gracias a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Ciencias de la Sostenibilidad (antes Ecología Química). Por los buenos ratos y las amenas y largas jornadas de trabajo.

DEDICATORIA

A mi querida y hermosa familia.

Abuelos, gracias por sus enseñanzas y consejos. Por siempre estar ahí cuando los necesito, por seguir siendo mis mentores, los adoro.

Mamá, tu ejemplo es el que me inspira a ser una mujer luchadora y aguerrida. Te quiero mucho.

Mis queridos hermanos los quiero mucho. Martín por siempre te deberé lo que soy ahora, jamás te podré pagar todo el apoyo.

A la nueva y hermosa familia de la que formo parte. Alan gracias por tu apoyo incondicional, por siempre alentarme a seguir luchando por lo que me gusta. Sofí mi niña hermosa, este trabajo también es tuyo, cuantas veces no me acompañaste en mis desvelos, ustedes son mi inspiración para seguir en la lucha.

A mis tíos, en especial a Rafael, gracias por el apoyo que nos das a toda la familia sin esperar nada a cambio.

A mis amigos Carlos, Elenae, Adriana, Ana, Felipe, Gaby, Ale, Valeria, Aurora, Toñito, la vida sí que me ha dado a los mejores.

Elenae gracias, porque aún en tu mundo de estrés me ayudaste con mis abstract.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
Reuso de agua y vulnerabilidad humana a virus entéricos	5
Generalidades de los virus entéricos	6
Métodos para la concentración y detección de virus	9
Generalidades del Virus de Hepatitis A	16
Clasificación y organización del genoma	16
Replicación y traducción	18
Genotipos	20
Epidemiología	21
Diagnóstico	24
Prevención	25
2. ANTECEDENTES	26
Epidemiología del VHA en México y América Latina	26
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
MÉTODO	31
Extracción de RNA y RT-PCR	31
Condiciones de la PCR	31
Clonación molecular y secuenciación del control positivo	33
Límite de detección	34
Control externo	34
Potenciadores o adyuvantes	34
Análisis del virus de hepatitis A en muestras de agua	35
RESULTADOS	35
Obtención del fragmento del VHA por RT-PCR	35
Clonación del fragmento del VHA	35
Control externo y detección del virus de hepatitis A en agua	38
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	51

ANEXOS	60
---------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de mortalidad de virus entéricos humanos registrada en países desarrollados	7
Tabla 2. Virus entéricos encontrados con mayor frecuencia en muestras de agua.	9
Tabla 3 Ventajas y desventajas de las técnicas más usadas para la detección de virus en muestras de agua.....	10
Tabla 4. Métodos usados para la detección de virus entéricos en muestras ambientales	13
Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de cultivos celulares o PCR para la detección de virus en muestras de agua.....	15
Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para el virus de hepatitis A y enterovirus.....	32
Tabla 7. Amplificación positiva en las muestras de Xochimilco inoculadas con VOP ($n=3$).	41
Tabla 8. Efecto del DMSO adicionado a diferentes concentraciones a las muestras de agua residual de los canales de Xochimilco inoculadas con VOP.....	43
Tabla 9. Muestras positivas para la detección del virus de hepatitis A en los diferentes sitios.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del VHA. Se muestran los productos de la traducción y las regiones más usadas para diagnóstico .	18
Figura 2. Distribución geográfica de los genotipos de VHA..	21
Figura 3. Seroprevalencia de anticuerpos anti-VHA en las áreas correspondientes a los cuatro modelos de incidencia.	22
Figura 4 Evolución de la infección producida por el VHA.	24
Figura 5 Mapa del Vector pTZ57R/T (Thermo Scientific).	33
Figura 6. Amplificación del fragmento VP1/2A obtenida por PCR..	36
Figura 7. PCR de colonia para la amplificación de las clonas con inserto; A1, A2 y A3...	36
Figura 8 Región amplificada a partir de clonas con inserto..	37
Figura 9. Amplificación de la clona a las concentraciones (1) 1ng/μL, (2) 0.1ng/μL y (3) 0.01 ng/μL..	38
Figura 10 Amplificación de VOP inoculado en muestras de Xochimilco..	39
Figura 11. Detección de VOP inoculado en muestras de agua de Xochimilco al usar BSA, DMSO y diluciones..	40
Figura 12. Efecto del DMSO a diferentes concentraciones en la detección de VOP inoculado en muestras de Xochimilco.....	42
Figura 14. Detección de VHA en muestras de agua de la Planta de Tratamiento del Cerro del Agua (PTECA), Ciudad Universitaria.....	45

RESUMEN

Anualmente se reportan 1.5 millones de casos de hepatitis A a nivel mundial. En México, de acuerdo con lo reportado por la Secretaría de Salud, el número de casos acumulados para julio de 2015, fue de 5055. El virus de hepatitis A (VHA) es la cuarta causa de enfermedad transmitida por alimentos. La infección generalmente es adquirida por vía fecal-oral y por consumo de agua o alimentos contaminados con heces de individuos infectados.

La mayor parte de la información que se tiene sobre este virus en México es a nivel seroepidemiológico. Los trabajos en los que se reporta la presencia de VHA en matrices ambientales son escasos. Por lo anterior, es importante desarrollar protocolos que permitan una detección rápida y oportuna del virus, para conocer los serotipos que estén circulando en el ambiente y contribuir así al control de brotes epidemiológicos.

En el presente trabajo se estandarizó el protocolo para la detección de la región de empalme que codifica para la proteína VP1/2A del genoma viral del VHA, la cual fue clonada en el plásmido de expresión pTZ57R/T. Es importante destacar que ésta es una región variable dentro del genoma, por lo que es ampliamente usada para la identificación de los genotipos virales. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada de punto final, se usó para la amplificación del fragmento en muestras de agua.

El protocolo desarrollado fue probado con muestras de agua provenientes de tres localidades: río Magdalena, Ciudad Universitaria y agua de reúso para riego agrícola del Valle del Mezquital. En los ensayos para detectar la región que codifica VP1/2A del genoma de VHA, los resultados mostraron que el 12.9 % fue positivo en muestras del río Magdalena, en muestras Ciudad Universitaria no se detectaron positivas y 14.2% para el Valle del Mezquital. Se llevaron a cabo ensayos paralelamente para descartar falsos positivos por una posible inhibición. En el río Magdalena se detectó el control externo en un 51.5% de las muestras de agua, en un 100% en las muestras de Ciudad Universitaria y un 9.1% en las muestras del Valle del Mezquital. Para mejorar la reacción reversa de la PCR se utilizaron dos adyuvantes: Dimetilsulfóxido (DMSO) y Albumina de Suero Bovino (BSA). Los resultados obtenidos mostraron que el protocolo en el que se utilizó DMSO fue más eficiente que en el que se usó BSA, ya que favoreció la amplificación del control externo y la región de interés en las muestras de Ciudad Universitaria y del Valle de Mezquital.

Como resultado de esta investigación, se generó una metodología útil para la identificación de VHA en una matriz ambiental, al clonar la región VP1/2A para emplearla como control positivo. Es importante señalar que la presencia de inhibidores de la PCR en muestras ambientales es un problema común, dada la cantidad de sustancias presentes en forma suspendida o disuelta (materia orgánica, iones, organismos). El segmento generado puede ser usado como control externo durante la amplificación, para corroborar que no existe ningún problema con las condiciones de la PCR en conjunto con el uso de adyuvantes para disminuir las inhibiciones.

ABSTRACT

Worldwide 1.5 millions of hepatitis A cases are reported every year. In Mexico according to the Health Authorities, accumulated to July of 2015 these were 5055. The hepatitis A virus (HAV) is the fourth cause of transmitted disease by food. The infection is generally acquired by fecal-oral route and consumption of contaminated water or food with feces of infected individuals.

Most of the information regarding this virus in Mexico is at seroepidemiology level. Studies of HAV occurrence in environmental matrices are scarce. Therefore it is important to develop protocols that allow detection of the virus, in order to determine environmental circulating serotypes and may contribute to outbreaks control.

We standardized the protocol to detect splice region encoding the VP1/2A HAV viral protein genome, cloned in the expression plasmid pTZ57R/T. It is important to point out this is one variable region within the genome, so it is widely used to identify viral genotypes. The Polymerase Chain Reaction (PCR) nested endpoint was used to amplify that genome fragment in water samples.

The developed protocol was tested with water from three locations: the Magdalena river, the University City and recycled water used for irrigation from the Mezquital Valley. Assays were performed to detect the code region VP1/2A from HAV genome, the results show that 12.9% was positive for Magdalena river samples, no positive samples were detected in the University City and 14.2% for the Mezquital Valley. Tests to discard false positives by a possible inhibition were also performed. The external control was amplified in 51.5% of Magdalena river water samples, in 100% of University City sample and 95.1% of Mezquital Valley water. In order to improve RT-PCR, two adjuvants were used: Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and Bovine Serum Albumin (BSA). The results showed that use of DMSO was more efficient than BSA, because DMSO improved the amplification of the external control and the region of interest from the University City and Mezquital Valley samples.

As a result of the present research, a useful methodology for the detection of HAV was generated useful for the HAV identification in environmental matrices when cloning the VP1/2A region as a positive control. It is worth noting, that PCR inhibition in environmental samples is a common problem, because of the presence of suspended or dissolved substances

(organic matter, ions and organisms). The generated segment can be used as an external control during the amplification, to corroborate that there is no exist any problem with PCR conditions with the use of adyuvantes to reduce inhibitions.

1. INTRODUCCIÓN

Reuso de agua y vulnerabilidad humana a virus entéricos

El agua es un recurso indispensable para el desarrollo económico y el bienestar social humano. Dada la escasez del recurso a nivel mundial, se ha optado por su reuso. Dentro de las principales áreas en donde se da este reuso están el urbano, que incluye irrigación de parques públicos, campos de atletismo, áreas residenciales y campos de golf; el industrial y el agrícola en la irrigación de cultivo. Sin embargo, existe un riesgo asociado a esta práctica, al presentarse problemas de salud pública por las enfermedades infecciosas adquiridas por el consumo de agua o de alimentos contaminados, además de problemas ambientales al existir una modificación en los ecosistemas acuáticos y el suelo. Ya que muchas veces las aguas residuales domésticas se vierten de manera directa en los cuerpos de agua superficiales o son utilizadas para el riego de cultivos sin haber recibido un tratamiento.

Dado que la agricultura es el principal sector consumidor de recursos hídricos, el empleo de aguas residuales (tratada o crudas) para la irrigación de cultivos representa múltiples beneficios económicos, al no tener ningún costo. Además otros beneficios asociados al mejoramiento de la fertilidad de los suelos agrícolas por el aporte de materia orgánica, macronutrientes (N y P) y oligoelementos, como Na y K, permitiendo reducir, y en algunos casos eliminar el uso de fertilizantes químicos (Silva *et al.*, 2008.). Aunque se tiene un riesgo potencial si no se considera aspectos de calidad microbiológica, y si los alimentos que fueron cultivados con esta agua serán consumidos crudos (Cifuentes, 1998; Pachepsky *et al.*, 2011).

Estos riesgos se presentan con mayor frecuencia en países en desarrollo, ya que muchas veces no se cuentan con normas que establezcan los límites máximos permisibles de microorganismos o compuestos químicos que pueden estar presentes en el agua y que pueden representar un riesgo a la salud pública.

Con la necesidad de reusar el agua, se requiere asegurar la protección a la salud pública y del medio ambiente. Ya que aunque las medidas sanitarias adoptadas para el tratamiento y la

disposición de aguas residuales, constituyen de los principales logros en materia de prevención de enfermedades relacionadas con la calidad del agua, en países en vías de desarrollo, las enfermedades infecciosas transmitidas por esta ruta tienen tasas de morbilidad y mortalidad altas en comparación con países desarrollados, debido a la vulnerabilidad que tienen sus poblaciones a partir de una mayor exposición a los patógenos (Karyna *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2011).

Generalidades de los virus entéricos

La incidencia de enfermedades dentro de una población está fuertemente relacionada con el acceso a sistemas de agua de consumo humano segura e indicadores socioeconómicos. Los agentes causantes de dichas infecciones pueden ser, entre otros, virus, bacterias y protozoarios presentes en las heces o la orina de individuos enfermos, los cuales son evacuados y transportados a los sistemas de agua; el impacto que esto tiene en salud pública se asocia a fallas en el control de calidad del agua usada para el consumo, riego, agricultura, procesamiento de alimentos o para uso recreativo (Bonfill-Mas *et al.* 2013).

Los microorganismos presentes en el agua pueden ser parte de los sistemas mismos o tratarse de patógenos liberados por usuarios que pueden constituir un riesgo para la salud de la población expuesta a través del contacto y/o del consumo directo. Dentro de los patógenos que pueden estar presentes, los virus entéricos llaman la atención debido a la gran cantidad de partículas virales que un individuo infectado puede producir y evacuar (cerca de 10^6 a 10^{10} virus infecciosos por gramo de heces), y las bajas dosis infectivas con las que se puede producir la enfermedad (Sair *et al.*, 2002).

Los virus entéricos humanos se replican en células del tracto gastrointestinal y se transmiten por vía fecal-oral, por el contacto persona-persona, zoonosis o por el consumo de agua y alimentos contaminados, siendo estos últimos el principal vehículo para pasar de un hospedero a otro (Espigares, 2006; Abbaszadegan *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2008; Kiulia *et al.*, 2010).

Este tipo de virus comúnmente causan infecciones silenciosas o agudas con un periodo de incubación corto, y estas infecciones se agrupan en tres tipos principales: gastroenteritis,

hepatitis transmitidas entéricamente y enfermedades que afectan a otras partes del cuerpo como ojos (conjuntivitis), sistema respiratorio y sistema nervioso central (poliomelitis, meningitis y encefalitis). El desarrollo y gravedad de una infección viral dependerá del tipo de virus que la ocasione y las características del individuo afectado (edad, estado de salud, predisposición genética y sistema inmune, entre otros.) (Toranzos *et al.*, 2007; Bonfill-Mas *et al.* 2013).

Como se muestra en la Tabla 1, en países desarrollados se conoce la tasa de mortalidad según el tipo viral que ocasione la enfermedad, siendo poliovirus 1 y hepatitis A los que presentan una tasa de mortalidad mayor comparada con otros virus entéricos.

Tabla 1. Tasa de mortalidad de virus entéricos humanos registrada en países desarrollados (Bosch 1998).

Virus	Tasa de mortalidad (%)
Poliovirus 1	0.90
Coxsacheivirus A	0.12-.050
Coxsachieivirus B	0.59-0.94
Echovirus	0.27-0.29
Hepatitis A	0.60
Rotavirus	0.01-0.12
Norovirus	0.0001
Adenovirus	0.01

Los virus entéricos con mayor incidencia en la población son enterovirus, norovirus, rotavirus, adenovirus humano, hepatitis A y hepatitis E, la cual varía según el área geográfica y/o el periodo de año (Fongaro *et al.*, 2013; Bosch *et al.*, 2008). En la tabla 2 se muestran ejemplos de los tipos virales comúnmente encontrados en agua.

La presencia y persistencia de estos agentes en el agua está en función de la ocurrencia en la población, si se encuentran libres o unidos a sólidos y a las condiciones ambientales (Skraber *et al.*, 2004; Payment y Locas, 2011). Tales como lluvias, temperatura, tamaño de poro y contenido de carbono orgánico en el suelo, pH, concentraciones de cationes, fuerza iónica y características específicas del virus (tamaño de cápside y punto isoeléctrico), por lo cual

pueden ser movidos distancias considerables e infiltrarse en el suelo y eventualmente llegar a un acuífero (Borchardt *et al.*, 2003). Existe evidencia que sugiere que la adsorción de los virus a partículas de materia y sedimentos les confiere protección contra inactivación por UV. La salinidad y el pH modifican la interacción de los virus y la materia (Seymour y Appleton, 2001), lo cual tiene efectos sobre la permanencia de los virones infecciosos en el ambiente.

Los virus entéricos son virus desnudos lo que confiere resistencia a las condiciones ambientales. Ya que su transmisión no depende sólo de la interacción con un hospedero, sino también de la interacción con el ambiente fuera del hospedero. Esta característica es fundamental en su transmisión, al conferirles la capacidad de mantenerse infecciosos durante grandes periodos y ser resistentes a tratamientos comúnmente aplicados a alimentos y/o agua (Nasser y Oman, 1999; Butot *et al.*, 2009; Bonfill-Mas *et al.* 2013). Por ejemplo, virus como el VHA, rotavirus humano, poliovirus y adenovirus humano son estables a temperaturas que van de los 4 ° C a los 20° C. Los enterovirus pueden tolerar pH entre 2 y 14 y adenovirus humano se reporta como uno de los más resistentes a la luz UV (Nasser y Oman, 1999; Maier *et al.*, 2009; Fongaro *et al.*, 2013).

Tabla 2. Virus entéricos encontrados con mayor frecuencia en muestras de agua (Bosh *et al.*, 2008).

Género	Genoma	Nombre común	Enfermedad que ocasiona
<i>Enterovirus</i>	ssRNA	Poliovirus	Parálisis, meningitis y fiebre.
		Coxsackie A y B	Herpangina, meningitis, fiebre, enfermedades respiratorias, enfermedad de “la mano, el pie y la boca”, miocarditis, anomalías y ataques al corazón, pleurodinia, diabetes.
		Echovirus	Meningitis, fiebre, enfermedades respiratorias, ataques, gastroenteritis.
<i>Hepatovirus</i>	ssRNA	Virus de hepatitis A	Hepatitis
<i>Reovirus</i>	dsRNA segmentado	Reovirus humano	Se desconoce
<i>Rotavirus</i>	dsRNA segmentado	Rotavirus humano	Gastroenteritis
<i>Norovirus</i>	ssRNA	Norovirus	Gastroenteritis
<i>Sapovirus</i>	ssRNA	Sapovirus	Gastroenteritis
<i>Hepevirus</i>	ssRNA	Virus de hepatitis E	Hepatitis
<i>Mamastrovirus</i>	ssRNA	Astrovirus humano	Gastroenteritis
	<i>Coronavirus</i>	ssRNA	Coronavirus humano
<i>Ortimixovirus</i>	ssRNA segmentado	Virus de influenza	Influenza, enfermedades respiratorias
<i>Parvovirus</i>	ssDNA	Parvovirus humano	Gastroenteritis
<i>Mastadenovirus</i>	dsDNA	Adenovirus humano	Gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis.
<i>Poliomavirus</i>	dsDNA	Poliomavirus	Leucoencefalopatía multifocal progresiva, enfermedades del tracto urinario.

Métodos para la concentración y detección de virus

La presencia de virus entéricos humanos en ambientes acuáticos se empezó a monitorear desde 1940 (Fong y Lipp, 2005).

Dada la baja cantidad de virus entéricos presentes en muestras ambientales, se ha desarrollado una variedad de métodos que permiten concentrarlos considerando sus características morfológicas y fisicoquímicas. Entre los métodos descritos están la captura

inmunomagnética, floculación orgánica, precipitación con Polietilenglicol (PEG), filtración a través de membranas cargadas positiva o negativamente, ultracentrifugación y ultrafiltración (Kovac *et al.*, 2009; Espigares-García, 2006; Brassard *et al.*, 2005). En la tabla 3 se describen las ventajas y desventajas de algunas técnicas empleadas para la concentración de virus.

Tabla 3 Ventajas y desventajas de las técnicas más usadas para la detección de virus en muestras de agua (Bosh *et al.*, 2008).

Método	Principio	Ventajas	Desventajas
Métodos de Adsorción-elución	Carga iónica		
Filtros con carga negativa		Buena recuperación	Se necesitan muestras pretratadas
Filtros con carga positiva		Buena recuperación	Costosa
Polvo de vidrio		Económica y buena recuperación	Equipo frágil
Lana de vidrio		Buena recuperación	Las diferencias dependen de su fabricación
Métodos de precipitación	Precipitación química		
Floculación orgánica		Eficiente para muestras sucias o para concentración secundaria	El extracto de carne es inhibidor de la enzima de RT-PCR
Sulfato de amonio		Eficiente para muestras sucias o para concentración secundaria	Alta citotoxicidad
Polietilenglicol		Eficiente para muestras sucias o para concentración secundaria	Inhibidor de la enzima del RT-PCR. Hay variabilidad entre ensayos
Ultracentrifugación	Sedimentación física	Eficiente para concentración secundaria	Costoso
Liofilización	Secado por congelación	Eficiente para muestras sucias o para concentración secundaria	Costoso, requiere de mucho tiempo
Ultrafiltración	Separación por tamaño de partículas	Buena recuperación en muestras limpias	Costoso, requiere de mucho tiempo
Perlas magnéticas	Inmunofinidad	Buena recuperación para volúmenes pequeños	Requiere ensayos específicos para cada virus. Costoso y hay pocos datos disponibles

Para la detección y cuantificación de los virus, el cultivo celular fue uno de los principales métodos elegidos, dada la sensibilidad de la técnica y por ser la mejor manera de demostrar la infectividad de los virus presentes en una muestra (Soule *et al.*, 2000).

Los tipos de ensayos que se pueden realizar para el recuento de partículas infectivas por cultivo celular son dosis infecciosa 50 (TCID₅₀), ensayos en placa y ensayos de inmunofluorescencia (IFAs). Entre las líneas celulares más usadas están BGM, HEp-2, HeLa y VERO (Espigares-García, 2006; Calgua *et al.*, 2011). Sin embargo, existe la limitante para los tipos virales para los que no es posible lograr la infección o que ésta no es visible al no formarse placas (calvas) o focos.

Sin embargo, el uso de cultivos celulares presenta desventajas, ya que ciertos tipos virales no pueden ser cultivados *in vitro*, por ejemplo, los norovirus, al no contar con una línea celular susceptible (Rzezutka y Cook, 2004). Hay virus que no producen un efecto citopático claro (CPE) o tiene un crecimiento lento como el virus de hepatitis A. Cada virus o grupo de virus requieren de líneas celulares específicas, los ensayos son laboriosos y tardados ya que requiere días o semanas de incubación para tener resultados y hay muestras que pueden contener materia tóxica para las células (Soule *et al.*, 2000; Calgua *et al.*, 2011; Fong y Lipp, 2005).

Otra técnica es donde se acoplan la infección de células con la PCR (ICC-PCR). Esta técnica permite la detección de virus con replicación lenta o que no producen efecto citopático. Pero existe la posibilidad de tener falsos positivos al detectar DNA de virus inactivos inoculados en el cultivo.

Para descartar estos falsos positivos, lo que se propone es detectar el mRNA viral en los cultivos celulares, los cuales serán el resultado de partículas virales infecciosas o hacer ensayos enzimáticos que pueden ayudar a conocer la integridad de la cápside mediante el uso de enzimas (DNasa o RNasa), así el material genético que no esté protegido por una cápside es degradado eliminando la interferencia en las amplificaciones (Calgua *et al.*, 2011; Fongaro *et al.*, 2013). Las desventajas de la técnica son los costos y que se requiere de personal capacitado.

Además del cultivo celular, los ensayos de amplificación de los ácidos nucleicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o la Transcripción Reversa -Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), son otras técnicas usadas para la detección y cuantificación de virus entéricos (Abbaszadegan *et al.*, 1999).

Entre las variantes de estas técnicas están la PCR punto final monoplex o múltiple. En la PCR monoplex sólo se podrá detectar un genotipo viral, mientras que en la PCR múltiple se hace una detección simultánea de diferentes grupos virales al usar varios pares de iniciadores (primers) para amplificar más de una secuencia en una sola reacción, con lo que se ahorra tiempo y reactivos, sin embargo, puede resultar complicado encontrar las condiciones óptimas de amplificación simultánea (Gilbride *et al.*, 2006).

Con la PCR semi-anidada o anidada se realizan dos ciclos de amplificación con distintos pares de iniciadores o primers en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de DNA más grande, que contiene el segmento blanco. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde para una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica. Otra variante es la PCR en tiempo real (qPCR), técnica con la que es posible determinar la cantidad de genomas virales presentes en una muestra (Gilbride *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009). Con este ensayo no se requiere de un análisis posterior, ya que el producto que se genera en cada ciclo es cuantificado a la par de la corrida de amplificación, ya sea mediante el uso de SYBR Green (unión no específica a la doble cadena de DNA) o de sondas internas fluorescentes (hibridación específica). Esta técnica es una excelente herramienta en la virología ambiental y ha sido exitosa para determinar las concentraciones de los genomas virales de adenovirus humanos, enterovirus y del VHA (Silva, 2013; Albina-Giménez, *et al.*, 2009; Jothikumar *et al.*, 2005) en el ambiente (Tabla 4).

Tabla 4. Métodos usados para la detección de virus entéricos en muestras ambientales (Fong y Lipp 2005).

Método	Ventajas	Desventajas
Cultivo celular	Se puede determinar infectividad; proporciona datos cuantitativos.	Mucho tiempo para el procesamiento (días o semanas); relativamente más caras que la PCR convencional; no todos los virus pueden crecer en cultivos celulares.
PCR (RT-PCR)	Rápido; aumenta la sensibilidad y especificidad comparado con los cultivos celulares.	Solo presencia o ausencia (no es cuantitativo); los inhibidores presentes en muestras ambientales pueden interferir con la amplificación de la PCR; la infectividad no puede ser determinada.
PCR anidada (semi anidada)	Se incrementa la sensibilidad comparada con la PCR convencional; puede reemplazar en paso de confirmación de la PCR como la hibridación.	Riesgo potencial de arrastrar los contaminantes al transferir los productos de PCR
PCR múltiple	Varios tipos, grupos o especies de virus pueden ser detectado en una sola reacción; se ahorra tiempo y costos.	Difícil de lograr una sensibilidad igual para todos las especies, grupos o tipos de virus buscados; a veces se producen amplificaciones no específicas en muestras ambientales.
Qpcr	Genera datos cuantitativos; no se requiere la confirmación de los productos de PCR (se ahorra tiempo); se puede hacer en un sistema cerrado, lo que reduce el riesgo de contaminación comparado con la PCR anidada.	Equipos muy costosos; a veces es menos sensible que las PCR convencional o la PCR anidada
ICC-PCR	Mejora la detección de patógenos virales infecciosos comparado con los cultivos celulares convencionales; detecta virus que no producen efecto citopático en las células; genera resultados en la mitad de tiempo requerido para los cultivos celulares convencionales.	Menor tiempo y eficiencia y más costosa que la detección con PCR directa; es posible la detección de DNA de virus inactivos inoculados en el cultivo celular

Es común que las muestras ambientales contengan sustancias inhibitoras (orgánicas e inorgánicas) de la acción de la polimerasa, esto puede ser más grave cuando es necesario concentrar las muestras ambientales, ya que también pueden ser concentrados los inhibidores afectando el resultado final (Soule *et al.*, 2000).

Buscando resolver algunos de los problemas se han desarrollado una gran variedad de técnicas. Para la remoción de sustancias inhibitoras algunos de los protocolos requieren de múltiples pasos que involucran el uso de reactivos como tiocianato de guanidina (GTC),

Polietilenglicol (PEG), fenol-cloroformo y columnas de sephadex, etc. (Sair *et al.*, .2002; Shay *et al.*, 2003).

De las sustancias ampliamente usadas se encuentran el BSA y el DMSO. El BSA es una proteína que incrementa la eficiencia de la PCR, ya que actúa como una proteína captadora de iones y otros inhibidores de la taq polimerasa como la melanina o los proteinasas (Espinosa, 2007). Mientras que el DMSO, dependiendo del tipo de muestras, se puede usar a concentraciones que van de 2 al 10%, este compuesto reduce la estructura secundaria del ADN y es útil sobre todo para amplificar regiones con gran cantidad de GCs, disminuye amplificaciones no específicas, mejora el alineamiento de los oligos (Espinosa, 2007; Wilson, 1997).

Otro problema puede ser el no contar con un control positivo adecuado. Entre las soluciones está la propuesta por Donia y colaboradores (2005), en cuyo estudio propone el uso de un “Armored” de EV (secuencia específica de RNA y proteínas virales de la cápside, ensambladas en una pseudopartícula viral), como estándar en el protocolo de extracción, amplificación y detección en los ensayos de diagnóstico (Donia *et al.*, 2005). Otra de las propuestas plantea el uso de transcritos de RNA producidos en plásmidos como controles positivos para la detección de norovirus (Lee *et al.*, 2011).

Además del uso de un control positivo (externo), se recomienda incorporar un control interno de amplificación, la cual es una secuencia de DNA que no es el blanco, pero que está presente en la misma muestra dentro del tubo, y se amplifica de forma simultánea con la secuencia del DNA blanco. Incorporar este control ayuda a descartar que un resultado negativo (no hay banda visible en el gel), no se deba a un mal funcionamiento del termociclador, a una mezcla incorrecta de reactivos en la PCR o a una baja actividad de la polimerasa por la presencia de sustancias inhibitoras (Hoofar *et al.*, 2004).

Mientras que en la cuantificación de RNA viral en muestras clínicas el uso de controles internos basados en la detección de genes de expresión constitutiva (que se encuentren en las células) es la primera opción, en las muestras ambientales no existen, por lo que la opción es

usar controles externos. Los mejores candidatos son RNA encapsulados de animales o bacteriófagos o “armored” del colífago MS2 (Bosh *et al.*, 2008).

Las ventajas que presenta el uso de la PCR comparado con otras técnicas como el cultivo celular (Tabla 5) son su alta sensibilidad, su poder para detectar virus que están presentes en bajo número en la muestras, virus que sean difíciles de replicar en cultivos celulares o que se replican sin producir un efecto citopático. Los ensayos son más rápidos, al poder obtener resultados dentro de las primeras 24 horas, comparado con los días o semanas de incubación requeridas en un cultivo celular, se tiene mayor especificidad al poder diferenciar entre ordenes, tipos o genotipos virales, se pueden realizar ensayos cuantitativos o cualitativos (presencia-ausencia), y tienen menor costo (Fong y Lipp 2005; Donia *et al.*, 2005; Abbaszadegan *et al.*, 1999).

Tabla 5. Ventajas y desventajas del uso de cultivos celulares o PCR para la detección de virus en muestras de agua (Rodríguez *et al.*, 2009).

Método	Ventajas	Desventajas	Comentarios
Cultivo celular	Media directa de infectividad; grandes volúmenes de agua (usualmente 1 y 7 ml/frascos usando matraces de 25 y 225 cm ² respectivamente.	El tiempo que se requiere para la detección (varía entre los virus usualmente entre 4 y 30 días). La toxicidad de los componentes del ambiente (falsos positivos). No se puede detectar virus no cultivables o los que tienen crecimiento lento (sin efecto citopático). Se puede requerir múltiples líneas celulares.	La detección se observa por el efecto citopático. La susceptibilidad entre diferentes tipos de virus varía entre las líneas celulares.
PCR directo (RT-PCR)	Específico y sensible; puede usarse para los virus que no se pueden cultivar o que no generan efecto citopático; se requiere menos tiempo para la detección, entre 2-4 horas.	No se determina infectividad. Es afectada por componentes inhibidores encontrados en el ambiente (falsos negativos). Se usan volúmenes pequeños de muestra (usualmente entre 10 y 100 µl).	La detección se basa en la amplificación específica de regiones blanco en el genoma viral. En virus de RNA, una transcripción reversa se necesita antes de la amplificación por PCR. La sensibilidad se basa en el número de partículas por volumen de reacción.

Pero con las técnicas que moleculares se detectan partículas tanto infecciosas como no infecciosas, por lo que para confirmar el riesgo potencial se requieren ensayos de infectividad (Calgua *et al.*, 2011). Si no se tiene cuidado, se pueden obtener falsos positivos por posible contaminación de las muestras (Toze, 1999; Rodríguez *et al.*, 2009).

Generalidades del Virus de Hepatitis A

A pesar de que existen casi cerca de 100 diferentes tipos de virus humanos entéricos, son norovirus y el virus de hepatitis A (VHA), los principales causantes de gastroenteritis aguda y hepatitis A respectivamente, asociadas al consumo de alimentos contaminados, sobre todo en países desarrollados (Kovac *et al.*, 2009; Butot *et al.*, 2009).

Las razones de la frecuencia de VHA son su estabilidad a temperatura ambiente, la resistencia que tiene este virus a pH ácido y a detergentes, y su capacidad para pasar a través del estómago y salir del hospedero por el tracto biliar y ser eliminado en grandes concentraciones en las heces (Martin y Lemon, 2006).

El VHA es el causante de la mayoría de las hepatitis agudas en el mundo (cerca del 50%). La infección generalmente es adquirida por la ruta fecal-oral, por contacto persona-persona o por consumo de agua o alimentos contaminados con heces (Jacobsen y Koopman, 2004; Hussain *et al.*, 2011; Cuthbert, 2001; Bosh *et al.*, 2008).

Anualmente se reportan casi 1.5 millones de casos en el mundo, de los cuales entre el 10 y 15% se presentan en turistas, lo cual representa una carga desde el punto de vista médico y económico (Kulkarni *et al.*, 2009; Burgess *et al.*, 2010; Lugoboni *et al.*, 2012). De acuerdo a lo reportado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el virus de hepatitis A es la cuarta causa de enfermedad transmitida por alimentos (Sair *et al.*, 2002).

Clasificación y organización del genoma

Hepatitis A es un término propuesto por Krugman y colaboradores (1967). Para 1973, se identifica por primera vez al virus en heces de personas infectadas (Cristina y Costa-Mattioli, 2007). Es un virus de ssRNA (+) (Hussain *et al.*, 2011), no envuelto de 27-32 nm de diámetro,

de simetría icosaédrica (Nainan *et al.*, 2006). Es el virus tipo del género *Hepatovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Es el único miembro de los hepatovirus debido al procesamiento de la poliproteína viral, la morfogénesis del virón y las interacciones del virus con las células hospederas (Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

Por la baja diversidad antigénica de las cepas del VHA, asociado al alto grado de conservación de los aminoácidos de las proteínas de la cápside, sólo existe un serotipo, por lo que se adquiere inmunidad de por vida después de la infección (Pina *et al.*, 2001; Hollinger y Emerson, 2001).

El genoma del VHA es de aproximadamente 7,500 nucleótidos de longitud, con un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína de cerca de 2225 aminoácidos, dividido en tres regiones; en la región P1 se localizan las proteínas de cápside, mientras que las regiones P2 y P3 están las proteínas no estructurales.

Este ORF es precedido por la región 5' no codificante (5'NCR), la cual representa aproximadamente el 10% del genoma total, esta región se encuentra unida covalentemente a una proteína virus-específica (VPg) en la que se encuentra el origen de replicación y el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), lo que permite la traducción por un mecanismo independiente de cap (Kanda *et al.*, 2010). Es importante mencionar que este IRES es único entre los picornavirus y constituye el prototipo del tipo IRES III.

El genoma termina en una región mucho más corta, la 3'NCR que contiene un extremo poly A (Pintó *et al.*, 2007; Nainan *et al.*, 2006).

Las regiones más usadas para determinar genotipos son la C terminal de la región VP3, el amino (N) terminal de la región VP1, los 168 pares de bases de la región de unión entre VP1/P2A, los 390 pares de bases de la región VP1-P2B y la región completa de VP1 (Nainan *et al.*, 2006) (Figura 1). Se sabe que de estas regiones, la región del amino terminal de la VP1 es más variable que la región VP1/2A y que la región VP3 es relativamente conservada, comparada con las otras dos (Pina *et al.*, 2001; Costa-Mattioli *et al.*, 2002).

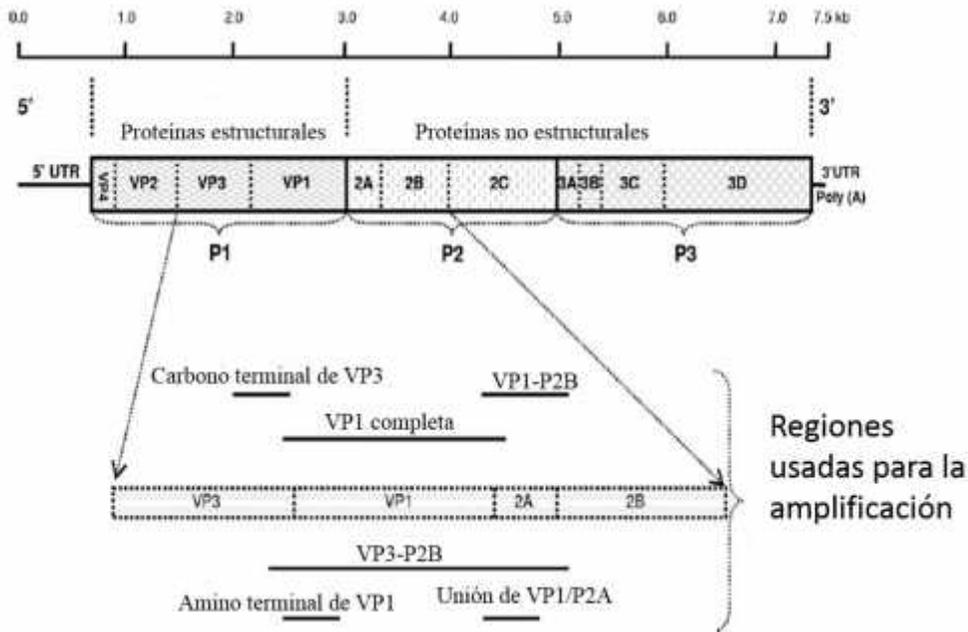


Figura 1. Genoma del VHA. Se muestran los productos de la traducción y las regiones más usadas para diagnóstico (Nainan *et al.*, 2006).

Replicación y traducción

Una vez liberado el RNA genómico al citoplasma, después de la descapsidación de la partícula viral, el RNA es usado como plantilla para la replicación. Dicho proceso se da en dirección opuesta a la traducción (Gauss-Müller y Kusov, 2002).

La síntesis del RNA ocurre en las membranas del retículo endoplásmico celular, donde se ensambla un complejo macromolecular de replicación que contiene las proteínas virales no estructurales que abarcan el segmento 2B-3D^{pro} de la poliproteína. (Martin y Lemon, 2006; Cristina y Costa-Mattioli, 2007). Siendo 3C^{pro} y 3D^{pro} los mayores constituyentes del complejo (Gauss-Müller y Kusov, 2002).

Al igual que con poliovirus, es muy probable que en la transcripción del RNA, la proteína-cebador, tanto para la replicación del RNA intermedio de sentido negativo, como para las moléculas de RNA positivos sea VPg (Martin y Lemon, 2006; Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

En el ensamble de las partículas virales, se cree que los segmentos de la poliproteína involucrados son, el extremo amino terminal de la cuarta proteína (probable) de la cápside, VP4 (también conocida como 1A), y el segmento que está inmediatamente después de las proteínas de la cápside (2A), y que representa la extensión del carboxilo terminal de VP1. Lo que sí se sabe es que el segmento VP1-2A es una estructura intermedia importante en la morfogénesis del virón (Martin y Lemon, 2006).

Durante la traducción se codifica una poliproteína, la cual se procesa en 11 proteínas a través de una cascada de eventos proteolíticos (Pintó *et al.*, 2007), dicho procesamiento se lleva a cabo en gran parte por la proteasa viral 3C^{pro}. Es importante mencionar que el procesamiento proteolítico de la poliproteína ocurre de forma simultánea con la traducción (Martin y Lemon, 2006; Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

El primer evento de corte ocurre en la unión de 2A/2B mediado por la proteasa 3C^{pro}. El resultado es el precursor estructural P2-2A, que después es cortado por la proteasa para generar dos proteínas precursoras de cápside: VP0 (VP4-VP2) y VP1-2A (también conocida como pX), así como la proteína de cápside VP3 (Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

De las 11 proteínas resultantes, VP1, VP2, VP3 y VP4 (**región P1**), son proteínas estructurales y forman la cápside del virus (Figura 1).

De estas cuatro, la proteína VP1 es la más externa y junto con la VP3 son los sitios donde se encuentran los inmunodominios (Gharbi-Khelifi *et al.*, 2007; Tahk *et al.*, 2012), mientras que VP4 se necesita para el ensamble de la cápside, pero no se ha detectado en viriones maduros (Nainan *et al.*, 2006; Silberstein *et al.*, 200) (Figura 1).

Las siete proteínas restantes son no estructurales, divididas en dos regiones y están involucradas en el proceso de replicación del virus: las proteínas son 2A, 2B y 2C (**región P2**), y 3A, 3B, 3C y 3D (**región P3**) (Silberstein *et al.*, 2009; Belalov *et al.*, 2011). Aunque a la proteína 2A se le asocia con las proteínas estructurales y sirve como una señal para el ensamble de los pentámeros. Mientras que las proteínas que si son requeridas para la replicación son: 2B, 2C, 3A y 3B (esta última también conocida como VPg, la cual está unida covalentemente a la región final 5' y probablemente sirve como un oligo para la síntesis del RNA), 3C^{pro} (una cisteína proteinasa responsable de los procesos de corte post-traduccionales

dentro de la proteína) y 3D^{pro} (RNA polimerasa dependiente de RNA) (Kanda *et al.*, 2010; Gauss-Müller y Kusov, 2002).

Genotipos

Inicialmente se habían definido siete genotipos del virus de hepatitis A, basados en la secuencia de 168 nucleótidos de la región VP1/2A, pero después con la secuenciación de 900 nucleótidos de la región VP1, junto con el estudio de Costa-Mattioli y colaboradores (2002), se hace una reclasificación a seis genotipos, de los cuales el I, II y III infectan al humano y IV, V y VI infecta a simios. Más tarde, Lu y colaboradores (2004) confirman que el genotipo II y VII eran dos sub-genotipos del genotipo II al encontrar la relación con la cepa CF53/Berne del genotipo II (Cristina y Costa-Mattioli, 2007; Nainan *et al.*, 2006; Desbois *et al.*, 2010; Villar *et al.*, 2006).

Los genotipos más prevalentes en el mundo y que infectan al humano son el I y III. Pero es el genotipo I el de mayor frecuencia (con una presencia de más del 80% de las cepas detectadas), el cual está dividido en dos subgenotipos: el IA y IB. (Villar *et al.*, 2006), siendo el genotipo IA el que se asocia más con las infecciones (Costafreda *et al.*, 2006; Jothikumar *et al.*, 2005; Pina *et al.*, 2001).

A nivel mundial, el subgenotipo IA del VHA se encuentra con mayor frecuencia en la población de América del Norte, China, Japón y Tailandia, mientras que el genotipo IB se encuentra en Europa, África Oriente Medio, Australia y Japón (De Paula *et al.*, 2002). Aunque se tiene reportes de la cocirculación de múltiples genotipos en algunas regiones del mundo. (Cristina y Costa-Mattioli, 2007; Nainan *et al.*, 2006; Desbois *et al.*, 2010; Belalov *et al.*, 2011) (Figura 2).



Figura 2. Distribución geográfica de los genotipos de VHA. Los genotipos aislados de humanos se muestran en color negro, los aislados de simios en color rojo. Las cepas PA21 (genotipo IIIA), se aislaron del mono lechuza panameño y se muestran en verde (Cristina y Costa-Mattioli, 2007).

Epidemiología

Las mejoras en las condiciones sanitarias y socioeconómicas han cambiado los patrones de distribución y epidemiología del virus del VHA, causando una disminución de la infección en algunos países, sin embargo se ha incrementado la vulnerabilidad de adolescentes y adultos (Jacobsen y Wiersma, 2010). En la actualidad, la población más afectada por dicha infección son jóvenes y adultos, en los que la enfermedad se manifiesta con mayor gravedad en relación con lo que sucede en niños, quienes presentan infecciones asintomáticas (Toyoda *et al.*, 2009).

Como consecuencia de estos cambios, los países desarrollados (con una baja incidencia), al importar alimentos de áreas con una alta prevalencia del virus o viajar a estos países tienen un incremento en los casos de hepatitis A sintomáticos y fulminantes, ya que las poblaciones son más susceptibles (Hendrickx *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2007; Parasidis *et al.*, 2013). Dado que la incidencia de la infección varía considerablemente entre y dentro de los países, se han descrito cuatro patrones epidemiológicos (Figura 3).

1. Endemicidad alta, donde casi todas las personas han tenido contacto con el VHA en la infancia. La transmisión es de persona a persona y los brotes son poco comunes.
2. Endemicidad intermedia, donde la edad pico de presentación es en adolescentes, pero también afecta a adultos jóvenes. La transmisión es de persona a persona o por comida y agua contaminada, con brotes comunes.
3. De baja endemicidad, aquí la edad de presentación más común es en el adulto joven y los brotes son frecuentes.
4. Áreas de muy baja endemicidad, donde el adulto es quien presenta la enfermedad con mayor frecuencia, la infección se adquiere durante viajes a zonas de mayor prevalencia y los brotes son escasos (García-Juárez *et al.*, 2008).

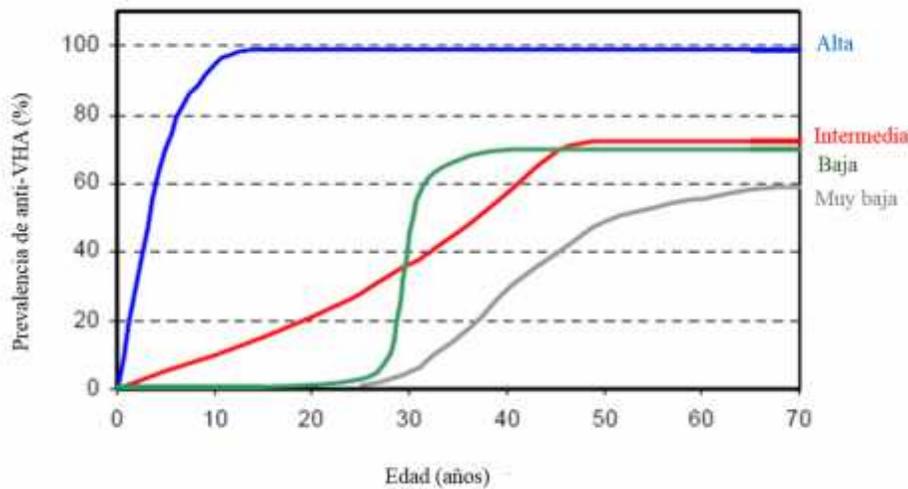


Figura 3. Seroprevalencia de anticuerpos anti-VHA en las áreas correspondientes a los cuatro modelos de incidencia (Pina, 2001).

Patogenicidad

La hepatitis A generalmente es una infección aguda del hígado y auto limitante. La gravedad clínica de la infección varía de asintomática a fulminante, no se tiene un tratamiento específico y la edad es el factor que más influye en el curso clínico de la infección, siendo sintomática en solo el 4-16% de los niños comparado con el 75-95 % de los adultos

(Campagna *et al.*, 2012). Tiene una tasa de mortalidad de 0.3-0.6% alcanzando el 1.8% entre los adultos mayores de 50 años (Fiore, 2004).

Aunque se desconoce la dosis infecciosa del VHA, la oficina de Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA-USA), estima que son entre 10 a 100 partículas virales (Pintó *et al.*, 2008), y al contener cada gramo de heces cerca de 10^9 viriones infecciosos, esta suele ser la fuente primaria de infección (Kovac *et al.*, 2009).

Después de la ingesta, los viriones llegan a los hepatocitos del hígado a través de la sangre, en los cuales las partículas virales se replican, ensamblan y son secretadas a la canícula biliar, de donde pasaran al ducto biliar e intestino delgado y serán excretados en la bilis y heces de las personas infectadas (Carter, 2005).

Transcurrido el periodo de incubación de 28 días, que puede variar entre 15 a 50 días, los pacientes desarrollan síntomas gastrointestinales. Estos síntomas pueden ser fiebre, malestar, náusea, vómito, dolor abdominal, orina oscura e ictericia. Síntomas menos comunes son dolor muscular, comezón, diarrea, dolor de articulaciones y erupciones cutáneas. No se tienen datos clínicos de enfermedad crónica del hígado o infecciones persistentes después de una hepatitis A aguda (Franco *et al.*, 2012; Lanford *et al.*, 2011).

La viremia y el pico de excreción ocurren dentro de la primera y segunda semana después de la exposición al VHA y persiste en el periodo de la elevación de las enzimas del hígado y disminuye al aparecer la ictericia. Comparado con los adultos, los niños e infantes pueden arrojar VHA por un largo periodo, varios meses después del inicio de la manifestación clínica (Nainan *et al.*, 2006; Tahk *et al.*, 2012).

La respuesta inmune se da al inicio de los síntomas. Los anticuerpos inmunoglobulina M (IgM), son detectados al inicio de la manifestación clínica (entre la semana tres a la siete después de la infección), alcanzan un pico máximo a los 15 días y disminuyen entre 3 a 6 meses después. Los anticuerpos inmunoglobulina G (IgG), aparecen después de los IgM y persisten por años después de la infección, confiriendo inmunidad de por vida. Los

anticuerpos IgA también se producen durante la infección por un tiempo limitado (Cuthbert, 2001; Pina, 2001; Valdespino *et al.*, 2007) (Figura 4).

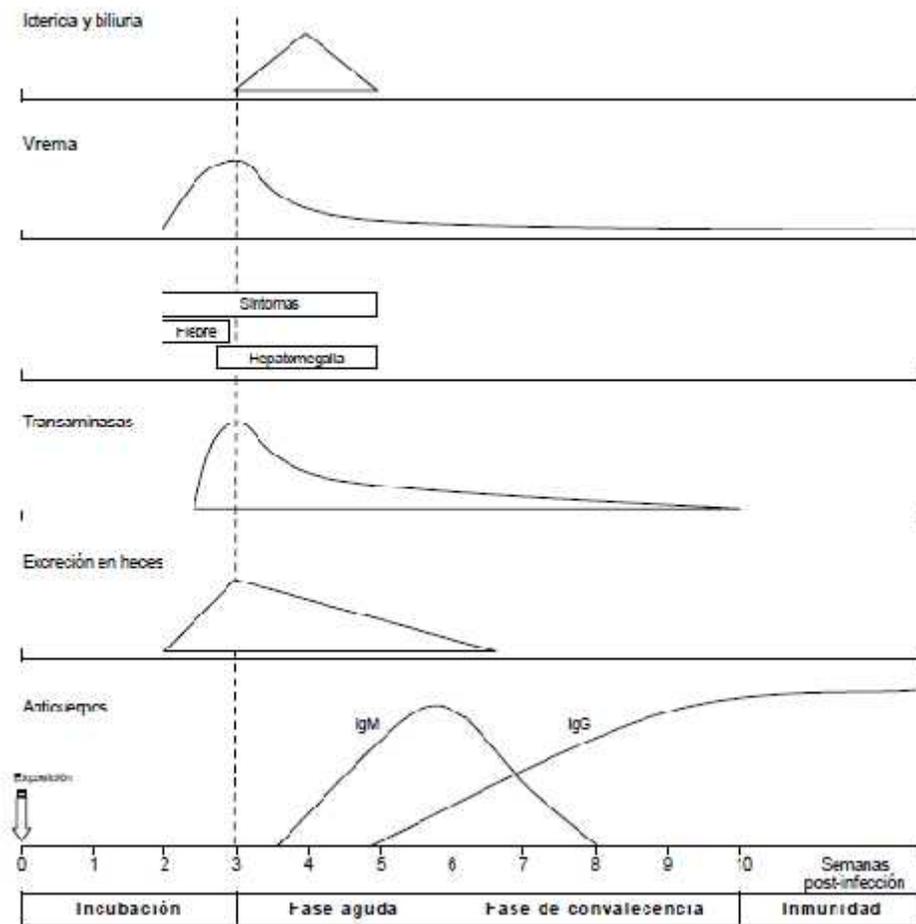


Figura 4 Evolución de la infección producida por el VHA (Pina, 2001).

Diagnóstico

Las pruebas serológicas son los métodos estándares en la búsqueda de una infección por VHA. Estas pruebas son necesarias para diferenciar la hepatitis A de otras hepatitis virales, ya que los síntomas son similares.

El marcador serológico primario de una infección aguda de hepatitis A es la IgM, y se detecta entre tres y cuatro días antes del inicio de los síntomas y disminuye ocho semanas después de la recuperación, y su presencia ayuda a diferenciar entre una infección reciente o antigua. En la actualidad, la sensibilidad y especificidad de las pruebas disponibles comercialmente para detección de IgM de hepatitis A es mayor al 95% (Fiore, 2004).

Además del suero, los antígenos han sido detectados en heces, cultivos celulares y muestras ambientales usando radioinmunoensayos e inmunoensayos enzimáticos (Nainan *et al.*, 2006). También se utilizan pruebas de laboratorio para conocer la función del hígado. Las enzimas que se detectan son la elevación de la bilirrubina total, de la fosfatasa alcalina, aspartato Aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) (Franco *et al.*, 2012).

Otra molécula que se puede detectar durante la etapa infecciosa es el RNA viral. Este puede estar presente en muestras de sueros, y su detección es una herramienta importante para individuos asintomáticos. La viremia puede detectarse antes del incremento en la concentración de ALT, y el RNA puede ser detectado aun después de que se normalizan los niveles de ALT y los síntomas se hayan resuelto.

Amado y colaboradores (2008), propone la detección de RNA en saliva, por lo difícil que es obtener muestras de sangre de niños, al ser una técnica menos invasiva (Amado *et al.*, 2008; Tahk *et al.*, 2012).

Prevención

A principios de 1990, en los Estados Unidos, se otorga una licencia y se produce una vacuna segura y muy efectiva para la prevención de hepatitis A, preparada con virus aislados de Australia o Costa Rica (Cristina y Costa-Mattioli, 2007). En la actualidad, existen cuatro vacunas de VHA inactivos. Una sola dosis provee de una excelente protección por lo menos de dos años en jóvenes y se requiere de una segunda dosis para una protección mayor (Jeong y Lee, 2010).

Otro método de prevención son las inmunoglobulinas; preparaciones estériles de anticuerpos concentrados (inmunoglobulinas), hechos de plasma de humanos, que dan protección a corto plazo (1-2 meses). Son usadas por personas que planean viajar a lugares donde la infección tiene alta prevalencia y requieren una protección inmediata o que tienen contraindicaciones de ser vacunadas. Las inmunoglobulinas se recomiendan a turistas menores de dos años para los que la aplicación de la vacuna no está permitida (Fiore, 2004).

Los programas de vacunación han ayudado a reducir la incidencia de VHA en niños, cambiando los patrones epidemiológicos (Barrientos-Gutiérrez *et al.*, 2011). Ejemplo del éxito de estos programas se da en Estados Unidos, en donde el aumento en el uso de la vacuna desde hace diez años favoreció la disminución en la incidencia de hepatitis A; con sólo 4488 casos agudos reportados durante el 2005, a diferencia de los 30,000 reportados en 1995 (Tallon *et al.*, 2008), o Israel y Argentina en donde el número de hospitalizaciones disminuyeron (Hendrickx *et al.*, 2008).

2. ANTECEDENTES

Epidemiología del VHA en México y América Latina

América Latina era considerada un área con una alta seroprevalencia de hepatitis A, con personas que se infectaban desde niños (Poovorawan *et al.*, 2002). Pero en estudios recientes se muestra que la incidencia ha disminuido y en países como Argentina, Bolivia, Brasil, Venezuela, Chile y Uruguay se pasó de una seroprevalencia alta a intermedia (Franco *et al.*, 2012), aunque el consumo de agua y alimentos contaminados continúa siendo la vía principal de exposición al virus de hepatitis A (Tanaka, 2000).

En México, se han realizados estudios serológicos del VHA desde 1973 (Panduro *et al.*, 2011). Entre estos estudios están el de Kumate y colaboradores (1973), donde reportan que la presencia de anticuerpos contra VHA era de 75 y 84% en el grupo de preescolares y escolares, respectivamente. En 1982, Ruiz-Gómez y colaboradores informan que la presencia de anticuerpos en niños menores de cinco años fue de 45%. Mientras que Bustamante y

colaboradores en una encuesta realizada en el estado de Chiapas en 1986, describieron la presencia de anticuerpo de 97.2% en preescolares. Para 1999, Tapia y colaboradores detectaron prevalencia del 40.5% en preescolares residentes de áreas urbanas (Tapia-Conyer *et al.*, 1999; Valdespino *et al.*, 2007).

En otro estudio realizado en el 2000 en seis países de Latinoamérica, en el cual incluyeron a México, los resultados muestran que en nuestro país cerca del 70% de niños entre 6-10 años y un 90% de los niños entre 11 y 15 años ya han estado en contacto con el virus (Tanaka, 2000).

De los reportes de seroprevalencia de anti-VHA más recientes está el de Lazcano-Ponce y colaboradores (2013), donde se identifica que la vulnerabilidad de la población está en función de la edad, la región del país donde se habite y el nivel socioeconómico.

En dicho estudio muestran que la seropositividad incrementa con la edad. En los estados del sur del país el antecedente de infección es cinco veces mayor que en la Ciudad de México y residir en localidades rurales también se vincula con una mayor prevalencia de anticuerpos contra VHA (Lazcano-Ponce *et al.*, 2013).

Los cambios en las condiciones socioeconómicas en México han impactado en los patrones epidemiológicos de transmisión del virus, donde es posible identificar alta seroprevalencia en entidades federativas del sur del país, en estratos socioeconómicos bajos con deficiencias sanitarias (agua, drenaje). Una seroprevalencia de anti-VHA moderada en entidades federativas del centro y norte del país. También vinculado con variables socioeconómicas y sanitarias. Y la baja prevalencia se empieza a observar en la Ciudad de México y los estratos socioeconómicos altos. Además, de la disminución de la frecuencia de infección en preescolares y su desplazamiento al grupo de escolares y adolescentes (Valdespino *et al.*, 2007; Tanaka, 2000). Los niños son especialmente vulnerables a la infección y la población adulta a desarrollar la enfermedad y con frecuencia tener complicaciones (Panduro *et al.*, 2011).

Como se puede notar, la mayoría de los estudios realizados en nuestro país con respecto a las infecciones por hepatitis A se realizan a nivel serológico. Son pocos los estudios que reporten la presencia de este virus en el ambiente, en matrices como agua y alimentos.

Entre los trabajos reportados sobre la detección del VHA en una matriz ambiental, en México sólo se ha publicado el de Hernández y colaboradores (2009) en el cual se menciona por primera vez la presencia del genotipo IB en agua estuarina y el de Félix y colaboradores (2010) en agua recreativa del estado de Sinaloa.

La detección del VHA en este tipo de matrices implica un reto metodológico debido a los tipos de muestras (agua, vegetales y otros alimentos), a la necesidad de contar con controles positivos, a la dificultad de cultivarlos y a la necesidad de hacer detecciones cualitativas y/o cuantitativas (Martínez-Martínez *et al.*, 2011; Solano-Ortiz, 2011).

Para el caso específico del VHA, es un virus difícil de adaptar en sistemas de cultivo celular. El método resulta largo, laborioso y costoso, además de que no se produce un efecto citopático. Una alternativa viable son los métodos moleculares como PCR en combinación con métodos de clonación. Esta alternativa metodológica permite por un lado contar con una herramienta sensible, específica, rápida, cuantitativa y por otro con un control positivo que puede obtenerse directamente en el laboratorio. La clonación de un segmento del genoma del virus para la estandarización de la PCR y su posterior detección en matrices ambientales, hacen factible la realización de estudios epidemiológicos para conocer la distribución de los genotipos virales del VHA.

Aunque en México las infecciones ocasionadas por el VHA pueden ser benignas, sobre todo si la infección se da en niños, ya que ellos no tendrán una manifestación clínica; se debe realizar el monitoreo de los virus presentes en agua o alimentos por el riesgo de infección de la población vulnerable; sobre todo si los alimentos que se consumen crudos como lo son las hortalizas y son regados con agua residual tratada. Esto puede tener incluso implicaciones en salud, además de económicas al tratarse de productos de exportación, ya que se han reportado de brotes de hepatitis A asociados a alimentos (cebollas cambray y fresas) exportados de

México. Tal es el caso de un brote de hepatitis A ocurrido en 2003 en Estados Unidos, a causa de cebollas cambray importadas de México (Fiore, 2004; Carter, 2005). Y ante una salud poblacional y económica más globalizada, la hepatitis A puede tener repercusiones económicas en el turismo y la exportación de alimentos (Valdespino *et al.*, 2007), por lo que es necesario contar con protocolos que permitan una detección rápida y oportuna.

Además de que ninguna de las normas mexicanas vigentes relacionadas con agua considera como obligatoria la detección de virus como indicadores de contaminación fecal, aun y cuando los datos epidemiológicos reportan más de 4,000,000 casos anuales de infecciones gastrointestinales debidas a virus y a causas desconocidas, sin que, se especifique el agente causal de la enfermedad. En este sentido se pretende con esta investigación sentar las bases para proponer al virus de hepatitis A como indicador viral de calidad de agua. Una característica deseable en dicho indicador es que se transmite por la vía fecal-oral y puede detectarse tanto en la matriz ambiental como en los individuos infectados.

Con métodos como la PCR, no solo se puede hacer una detección cualitativa del VHA, sino también se podría hacer una cuantificación de las partículas virales, abriendo la posibilidad de realizar análisis más profundos, como evaluar el riesgo que implica la presencia de este virus en agua y alimentos.

Objetivo general

Implementar un método para la detección del VHA en matrices ambientales.

Objetivos particulares

Sintetizar controles positivos para el análisis de VHA en matices ambientales a partir de la clonación de un fragmento del genoma en el plásmido pTZ57R/T.

Estandarización de la técnica de PCR para la detección de VHA en agua.

Aplicación de los controles positivos y protocolo de PCR de punto final desarrollado para la detección de virus de la hepatitis A en agua residual y residual tratada.

MÉTODO

Extracción de RNA y RT-PCR

Para la extracción del RNA se usaron 140 μ l de muestras de agua obteniendo un concentrado final de 60 μ L de RNA usando el kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Según las instrucciones del fabricante, a la muestra se le adicionó primero el buffer AVL+carrier, después etanol. Esta mezcla (muestra + buffers) se vertió en una columna y centrifugo. Posteriormente se le agregó el buffer AW1 y el AW2, y se centrifugo en cada paso, para así finalmente, obtener los ácidos nucleicos en el buffer AVE (proporcionado en el kit). El control usado para la extracción fue el *HAV RNA Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Techniques* de NIBSC (código NIBSC 01/488), para Enterovirus se usó como control positivo la vacuna contra poliomielitis (VOP- BIRMEX).

Para la reacción de transcripción reversa (RT) se utilizó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) usando el oligonucleótido HAV 2 Rv a una concentración de 2 μ M (Tabla 6) y siguiendo las instrucciones del kit.

Condiciones de la PCR

Para amplificar el virus de hepatitis A (VHA), se realizó una PCR anidada usando dos juegos de oligonucleótidos; HAV1-HAV2 y HAV3-HAV4, que amplifican la región VP1/2A reportados por Pina y colaboradores (2001) (Tabla 6). El tamaño de banda del fragmento mayor es de 532 pb y el del fragmento menor es de 436 pb.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L con una mezcla de 2.5 μ L de buffer ThermoPol 10X, 0.5 μ L de dNTPs 10mM, 0.5 μ L de cada oligonucleótido 10mM, 3 μ L de cDNA, 18 μ L de agua y 1.25U de la enzima Taq DNA polimerasa (BioLabs). Las condiciones de corrida fueron 3 min., a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 min., 42°C por 1 min., 72°C por 1 min., con una extensión final de 5 min., a 72 °C.

La PCR para la amplificación de enterovirus se realizó usando los oligonucleótidos que amplifican la región 5' NCR reportados por Le Guyader y colaboradores (1994) (Tabla 6). El tamaño de banda del fragmento fue de 196 pb.

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25µL con una mezcla de 2.5µl de buffer ThermoPol 10X, 0.5µL de dNTPs 10mM, 0.5µL de cada oligonucleótido 25pM, 3µL de cDNA, 18µL de agua y 1.25U de la enzima Taq DNA polimerasa (BioLabs) Las condiciones de corrida fueron 1 min., a 94°C, seguidos de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 25 s, con una extensión final de 7 min., a 72°C.

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.8% (GIBCO BRL, Life Techbiologies, Inc. Grand Island, NY) teñidos con bromuro de etidio para su visualización, en un transiluminador.

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para el virus de hepatitis A y enterovirus.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')*	Tamaño del producto (pb)
Hepatitis A		
PCR 1		
HAV 1 Fw	TGCAAATTAYAAAYCAYTCTGATGA	532
HAV 2 Rv	TTTCTGTCCATTTYTCATCATTC	
PCR 2		
HAV 3 Fw	TTYAGTTGYTAYTTGTCTGT	436
HAV 4 Rv	TCAAGAGTCCACACACTTC	
Enterovirus		
Ev Fw	TCCGGCCCCTGAATGCGG	196
Ev Rv	CACCGGATGGCCAATCCAAT	

*Y= C o T

Clonación molecular y secuenciación del control positivo

Para la clonación, el fragmento de la región VP1/2A del VHA obtenida a partir del PCR anidado se insertó en el vector pTZ57R/T (InsTAclone PCR cloning kit, Thermo Scientific) (Figura 5), mediante una reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa. Después se realizó la transformación de las bacterias competentes e incubaron con agitación durante una hora y media a 37 °C en medio Luria Bertani (LB) con antibiótico. Transcurrido este tiempo, se plaquearon en cajas Petri con medio LB-sólido a 37 °C toda la noche.

Una vez obtenidas las clonas, fueron seleccionadas cuatro para ser propagadas en las células competentes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) en el medio Luria Bertani (LB, Difco) con ampicilina. A la par, se realizó una PCR de colonia para corroborar que las clonas seleccionadas tuvieran el plásmido con el inserto (Figura 7). Por último, el plásmido fue purificado con el kit QIAprep (QIAGEN).

Posteriormente, las clonas, se secuenciaron usando los oligonucleótidos incluidos en el kit y que amplifican la región del Sitio de Clonación Múltiple. Los productos secuenciados fueron comparados con la base del Gen Bank del NCBI (Anexo).

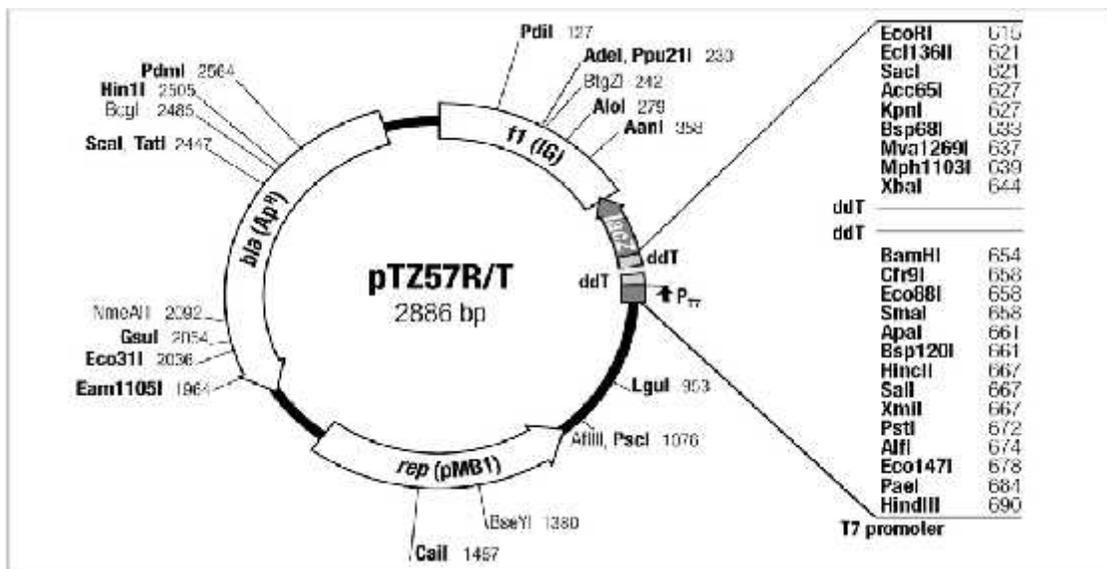


Figura 5 Mapa del Vector pTZ57R/T (Thermo Scientific). Se muestra el sitio del replicón (rep (pMB1)), sitio de clonación múltiple (MCS), gen para selección de colonias recombinantes (lac Z) y gen que confiere resistencia a ampicilina (bla (Ap^R)).

Límite de detección

Para conocer el límite de detección de la técnica se hicieron diluciones seriadas de DNA de la clona A1 a las siguientes concentraciones: 1ng/ μ L, 0.1ng/ μ L, 0.01 ng/ μ L y 1pg/ μ L y se visualizaron en un gel de agarosa al 1.8%.

Control externo

Como parte del análisis de las muestras ambientales, se usó a la clona y la vacuna contra la poliomielitis (VOP tipo Sabin) como control externo en la PCR, esta último en un sólo ensayo porque no fue posible contar con más vacuna debido a la restricciones de venta.

En el ensayo donde se usó la clona como control externo se mezcló 3 μ L (1ng/ μ L) de plásmido con 3 μ L del extracto de RNA de cada una de las muestras, esto se usó para la reacción de PCR.

Al usar la vacuna contra la poliomielitis el ensayo consistió en inocular 100 μ L de VOP (1×10^4 partículas virales por μ L) en un volumen de 1.5mL en cada una de las muestras de agua, de la cual se realizó la extracción.

Potenciadores o adyuvantes

Además del control externo, en un principio, se hicieron ensayos usando Albumina de Suero Bovino (BSA 25X), Dimetilsulfóxido (DMSO 5%) y diluciones (1:10,1:20 y 1:100) en sólo tres muestras de Xochimilco que habían sido inoculadas con VOP, con el objetivo de encontrar cuál de estos tres procedimientos era el más efectivo para minimizar las inhibiciones presentes al momento de realizar las amplificaciones por PCRs.

Posteriormente, en el análisis de las demás muestras de agua, sólo se usó DMSO como potenciador, por lo que para encontrar la concentración con mejor efecto, se construyó una curva de concentración que iba de 2.5 a 10% de DMSO. Para realizar la curva se usaron un total de 8 muestras de Xochimilco inoculadas con VOP.

Análisis del virus de hepatitis A en muestras de agua

Se analizaron trece muestras de agua residual tratada de la Planta de Tratamiento Cerro del Agua de Ciudad Universitaria de 2012 y 2013 (PUMAGUA), 31 muestras de agua del río Magdalena, D. F., de 2012 y 2013, y 21 muestras de agua residual tratada del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Tanto la extracción del RNA como la RT-PCR de cada muestra se realizaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente.

Como parte del análisis de las muestras de cada uno de los sitios, se realizaron dos ensayos por separado. El primero consistió en mezclar 3 μ L de plásmido (1ng/ μ L) usado como control positivo y 3 μ L del extracto de RNA para realizar la amplificación, y de esta forma usar al plásmido como control externo. El segundo ensayo fue para detectar al VHA en cada una de las muestras de agua. En ambos procesos, se le adicionó DMSO a una concentración final de 5%.

RESULTADOS

Obtención del fragmento del VHA por RT-PCR

Se obtuvo un producto de 436 pb de la región VP1/2A a partir del control NIBCS y de heces, usando dos enzimas (Pfu y Thermo Pol) (Figura 6). El producto de PCR que se utilizó para la clonación fue el que se obtuvo a partir del control de NIBCS y usando la enzima Thermo Pol, esto último porque esta enzima deja extremos de adeninas, condición necesaria en el proceso de ligación al usar el vector pTZ57R/T.

Clonación del fragmento del VHA

Con la PCR de colonia que se realizó se corroboró que sólo tres de las clonas (A1, A2 y A3) seleccionadas para ser propagadas en medio líquido tenían el plásmido con el inserto. El producto obtenido a partir de los oligonucleótidos proporcionados por el kit fue de 588 pb considerando el tamaño del inserto y el del plásmido (Figura 7).

El producto fue secuenciado para asegurar que el amplicón pertenecía al VHA. Estas secuencias se analizaron con el BLAST en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por su siglas en inglés) y se encontró un 100% de identidad con el VHA (ver anexo II). Según datos del proveedor, el VHA usado como control pertenece a la cepa HM175.

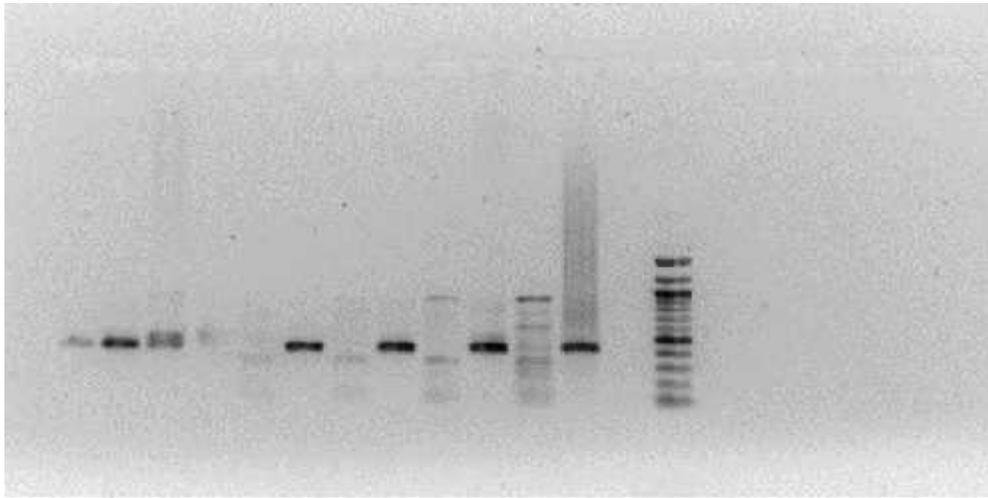


Figura 6. Amplificación del fragmento VP1/2A obtenida por PCR. Las muestras 1, 2, 3 y 4 son del control de **NIBCS** y con la **enzima Thermo pol**. Las muestras 5, 6, 7 y 8 son del control de heces y la 9, 10, 11 y 12 son del control de NIBCS y con la enzima Pfu; c- es el control negativo. El marcador molecular usado fue 100 pb. Tamaño de banda de 436 pb.

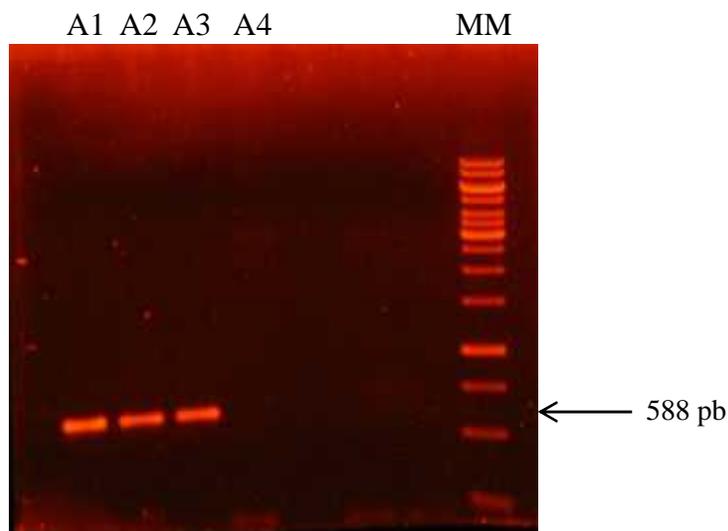


Figura 7. PCR de colonia para la amplificación de las clonas con inserto; A1, A2 y A3. El marcador molecular usado fue de 1 Kb. Tamaño de banda de la clona con inserto es de 588 pb.

Una vez purificada el plásmido con el inserto VP1/2A del VHA, se realizó una PCR con los oligonucleótidos que amplifican la región pequeña, obteniendo un producto de 436 pb (Figura 8).

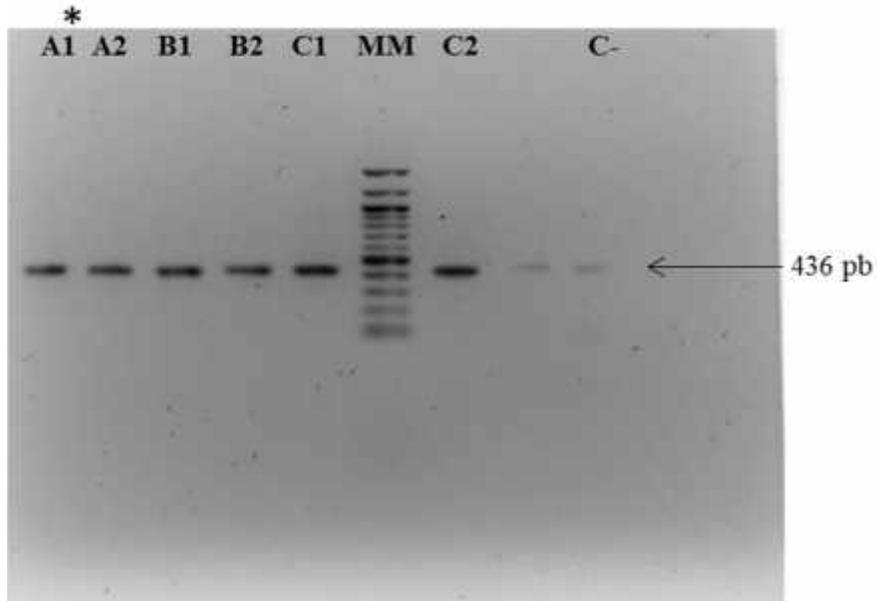


Figura 8 Región amplificada a partir de clonas con inserto. La concentración de A1, B1 y C1 fue de 1ng/μL; A2, B2 y C2 0.1ng/μL. Marcador molecular de 100 pb.

De las diluciones que se hicieron para conocer el límite de detección, se observa que es hasta 0.01 ng/μL donde aún se puede ver una banda bien definida (Figura 9), la cual equivale a 27.9×10^5 genomas por microlitro.

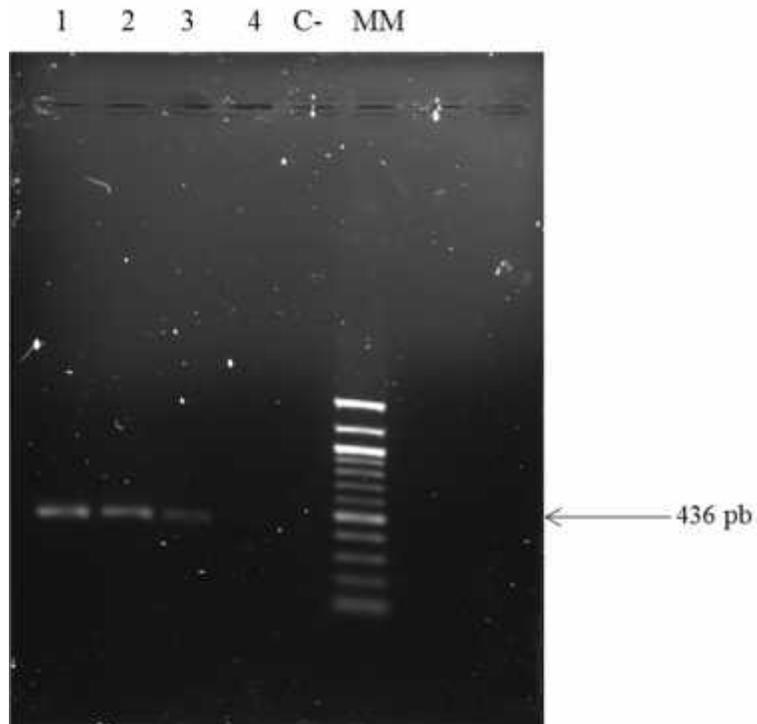


Figura 9. Amplificación de la clona a las concentraciones (1) 1ng/μL, (2) 0.1ng/μL y (3) 0.01 ng/μL. Marcador molecular usado fue de 1 Kb. Tamaño de banda 436 pb.

Control externo y detección del virus de hepatitis A en agua

Las primeras diez muestras de agua residual tratada que se analizaron para la detección de VHA fueron de los canales de Xochimilco y en ninguna hubo amplificación. Al inocular como control externo la misma clona usada como control positivo, se encontró que en sólo dos muestras hubo amplificación del plásmido inoculado. El resultado que se obtuvo al inocular polio vacunal (VOP) fue similar al obtenido al inocular el plásmido, sólo en dos muestras se dio la amplificación (Figura 10).

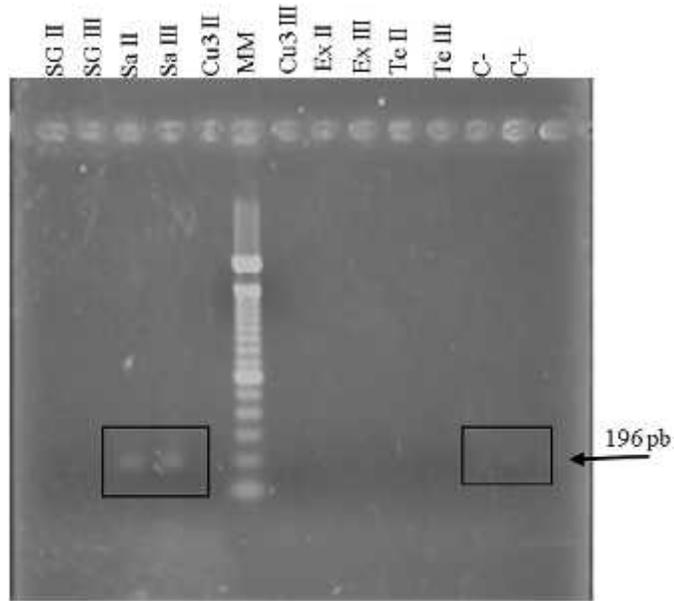
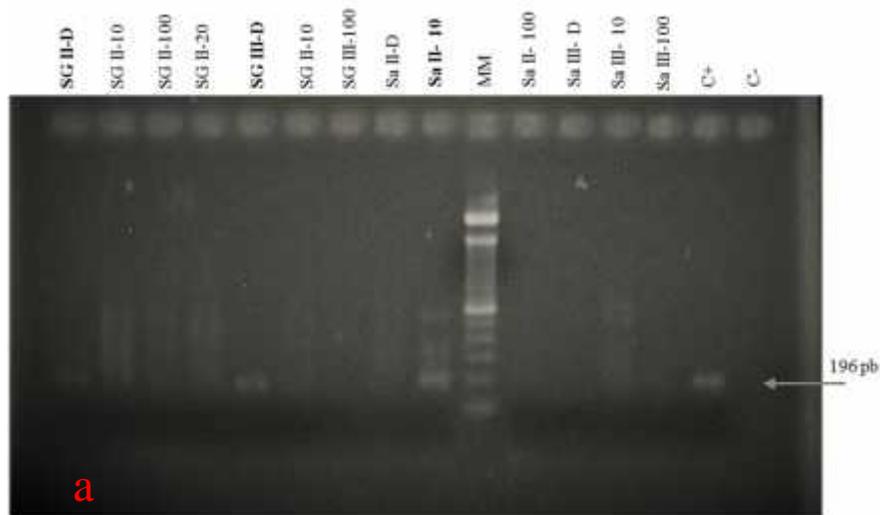


Figura 10 Amplificación de VOP inoculado en muestras de Xochimilco. El marcado molecular de 100 pb. Tamaño de banda de 196 pb.

Para tratar de disminuir la inhibición en las muestras de Xochimilco, se usaron adyuvantes (BSA y DMSO) y diluciones del extracto de cada muestra, encontrando que es con el BSA con el que se logran cuatro amplificaciones, sin encontrar diferencia al usar juntos BSA-DMSO, así como también no se observa un efecto positivo al usar las muestras diluidas (Figura 11) (Tabla 7).



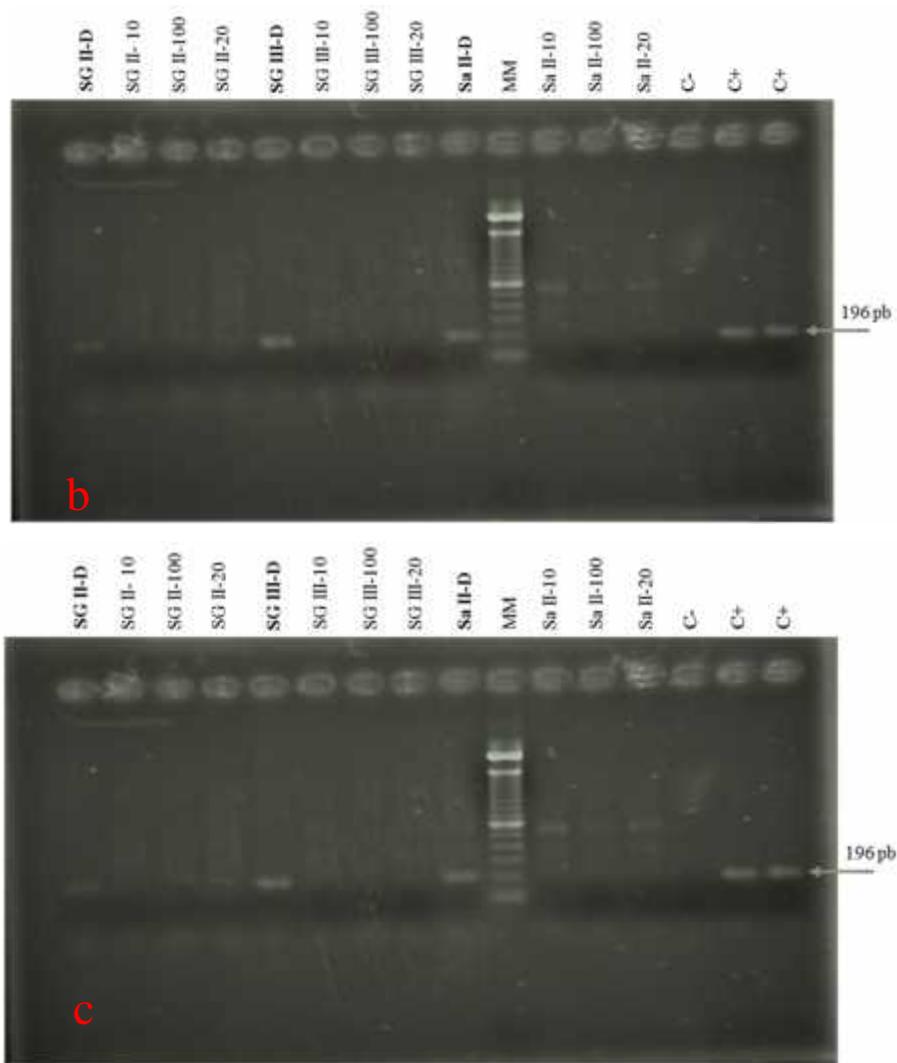


Figura 11. Detección de VOP inoculado en muestras de agua de Xochimilco al usar BSA, DMSO y diluciones. Figura a) se tienen las muestras a las que se les agregó BSA 25X; figura b) las muestras a las que se les agregó DMSO 5% y figura c) el uso conjunto de BSA-DMSO. Las diluciones fueron 1:10, 1: 100, 1: 20 y Directo. Marcador molecular usado fue de 100 pb. Tamaño de fragmento de 196 pb.

Tabla 7. Amplificación positiva en las muestras de Xochimilco inoculadas con VOP ($n=3$).

Muestra	BSA 25X	DMSO 5%	BSA 25X-DMSO 5%
Directa	3/3	2/3	3/3
1:10	1/3	1/3	0/3
1:100	0/3	0/3	0/3
1:20	0/3	0/3	0/3

Los resultados de la curva de DMSO muestran que los mejores resultados son al usar DMSO al 5%, al tener un mayor número de muestras positivas (Figura 12) (Tabla 8).

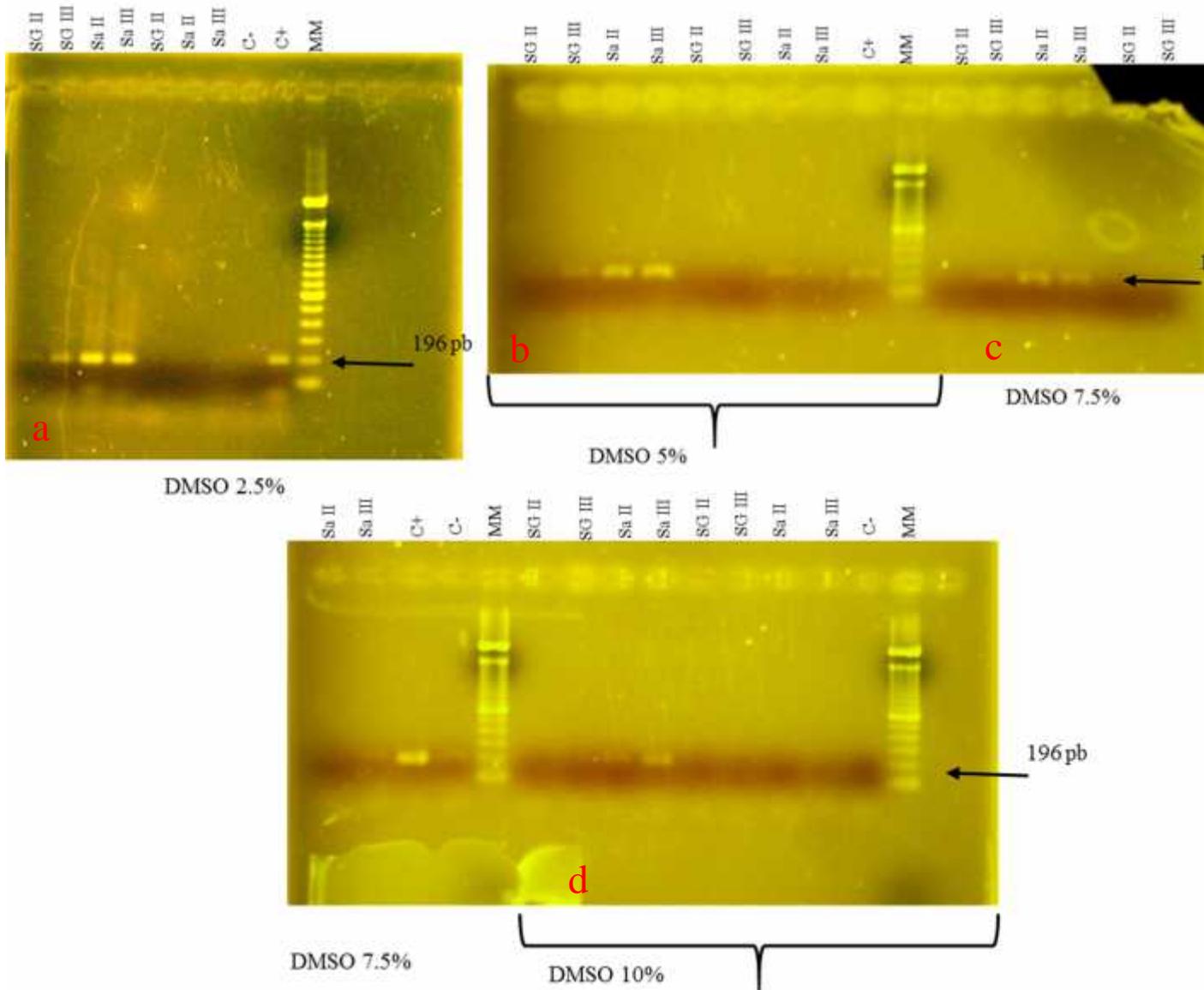


Figura 12. Efecto del DMSO a diferentes concentraciones en la detección de VOP inoculado en muestras de Xochimilco. a) Concentración de 2.5 %; b) concentración de 5%, c) 7.5% y d) 10%. Marcador molecular usado fue de 100 pb. Tamaño de banda de 196 pb.

Tabla 8. Efecto del DMSO adicionado a diferentes concentraciones a las muestras de agua residual de los canales de Xochimilco inoculadas con VOP.

Concentración de DMSO	2.5%	5%	7.5%	10%
Muestras positivas ($n=8$)	4/8	6/8	3/8	2/8

Aun y cuando es con el BSA con el que se logra una “mejor” amplificación, se decidió usara al DMSO al 5% con el adyuvante para el análisis de las muestras de agua restantes.

Como se muestra en la tabla 9, en el río Magdalena sólo se logró la detección del control externo en un 51.5%, aún y cuando se agregó DMSO (Figura 13 A). Mientras que para las muestras de los sitios de Ciudad Universitaria (Figura 14 A) y Valle del Mezquital (Figura 15 A), se detectó el plásmido en un 100% y 95.1% respectivamente.

La detección de VHA en el río Magdalena fue positiva para el 12.9% de las muestras (Figura 13 B), mientras que para el Valle del Mezquital fue de un 14.2% (No se muestran gel).

Tabla 9. Muestras positivas para la detección del virus de hepatitis A en los diferentes sitios.

Muestras	N	Control endógeno	VHA
PUMAGUA, UNAM	13	13 (100%)	<1
Río Magdalena, D.F.	31	16 (51.5%)	4 (12.9%)
Valle del Mezquital, Hidalgo	21	20 (95.1%)	3 (14.2%)

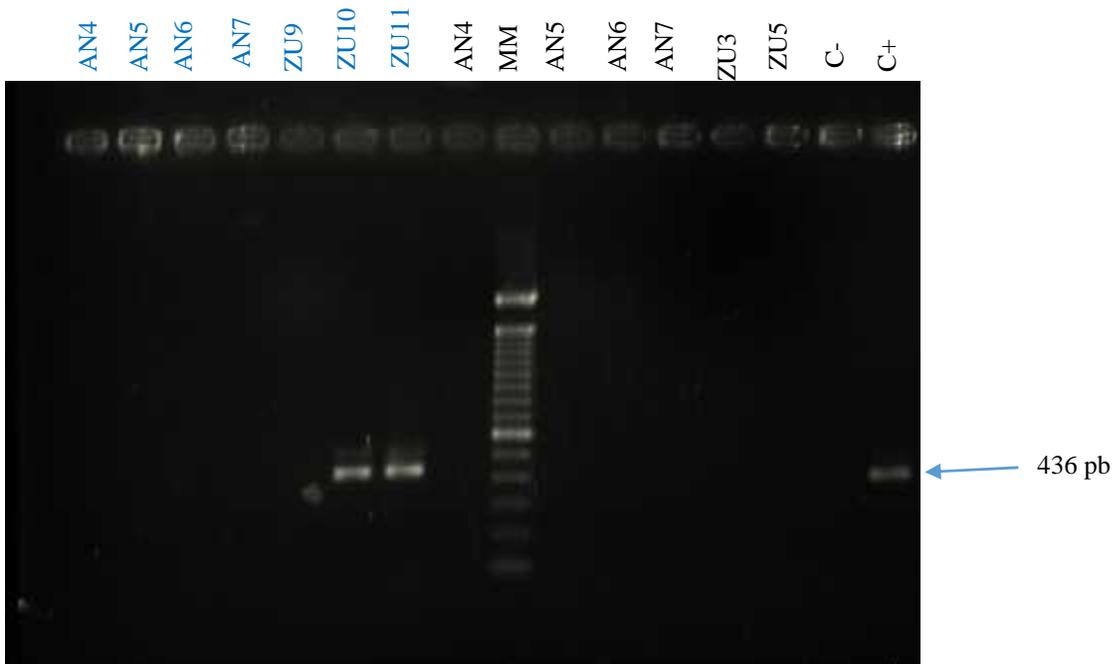
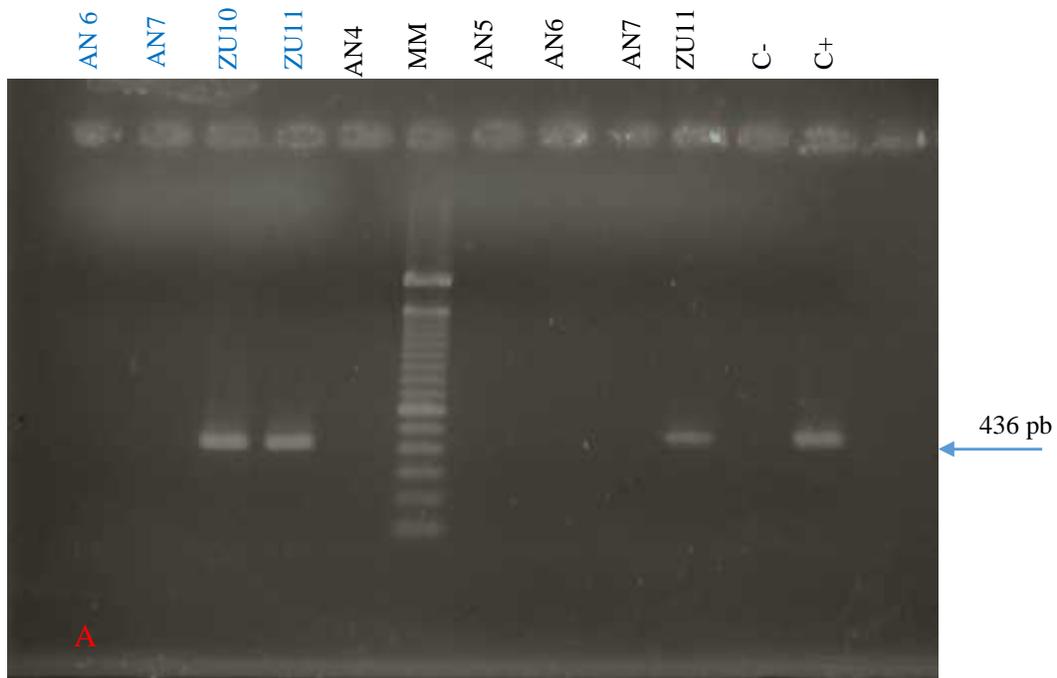


Figura 13. Detección de VHA en muestras de agua del río Magdalena de las temporadas lluvias y secas. Las muestras que dieron positivo para el plásmido inoculado (A). En la figura B están las detecciones de VHA. El marcador molecular usado fue de 100 pb. Tamaño de banda de 436 pb.

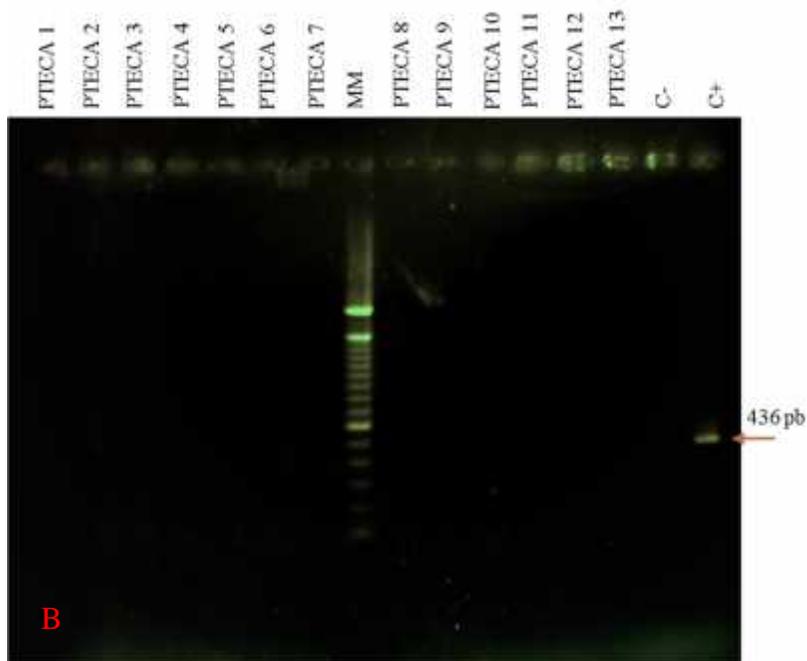
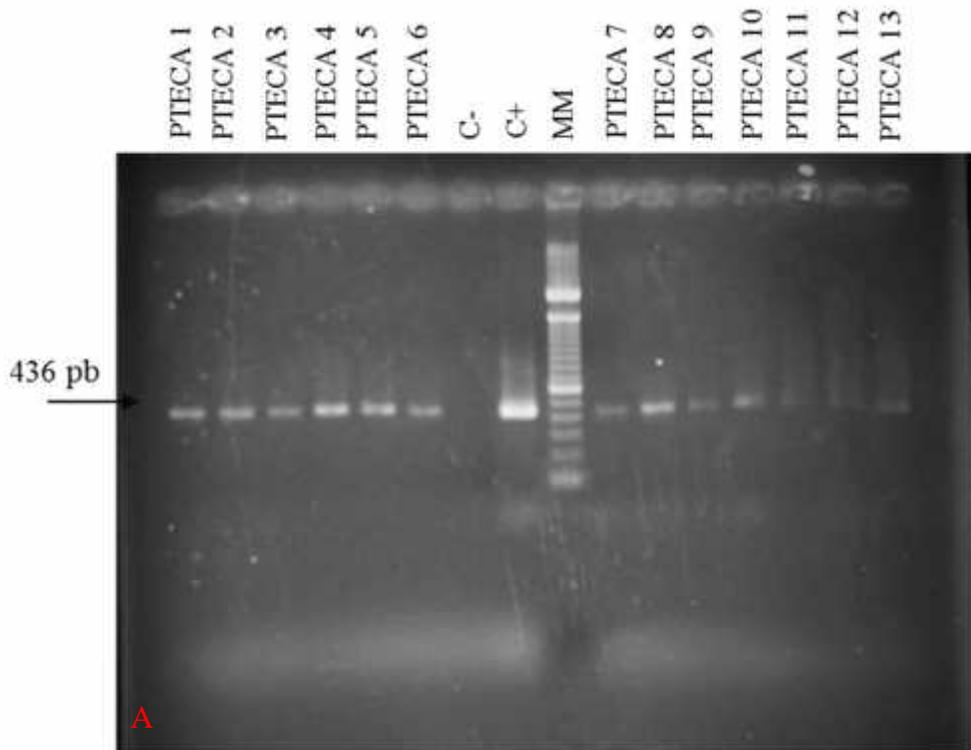


Figura 134. Detección de VHA en muestras de agua de la Planta de Tratamiento del Cerro del Agua (PTECA), Ciudad Universitaria. Se presentan las muestras positivas para el plásmido inoculado (A) y en los resultados de la PCR para la detección del VHA (B). El marcador molecular usado fue de 100 pb. Tamaño de banda de 436 pb.

DISCUSIÓN

El uso de técnicas de biología molecular ha propiciado avances en muchas áreas científicas. La PCR, usada como herramienta, permite la detección oportuna de agentes infecciosos que representan un potencial riesgo para la salud humana. Pero esta, es una técnica en la cual se deben tener varias consideraciones al momento de usarla, para que los resultados que se obtengan sean confiables.

Uno de los problemas que se presentan con frecuencia, es la elección de un control positivo, y más cuando se trabaja con virus difíciles de aislar o que representen un peligro biológico propagarlos, por lo que el uso de moléculas de ácido nucleico sintético como controles positivos para su detección y cuantificación ha sido aplicado exitosamente para algunos virus (Martínez-Martínez *et al.*, 2011).

En el caso particular, el virus de la Hepatitis A es difícil propagar, ya que para lograr estandarizar la técnica de cultivo de las células que se infectarán se requieren hasta tres semanas, y una vez que se han inoculado con VHA no se logra un claro efecto citopático (Nainan *et al.*, 2006; Bofill-Mas *et al.*, 2013). En México, a pesar de ser un virus con una alta prevalencia en la población, es complicado poder obtener muestras clínicas positivas.

La estrategia seguida en esta investigación fue amplificar un segmento del genoma del VHA por PCR y posteriormente clonarlo, y de esta forma obtener un control positivo. El material utilizado como control para obtener el segmento para la clonación es un Estándar Internacional usado para Ensayos Tecnológicos de Amplificación de ácidos nucleicos para hepatitis A propuesto por la Organización Mundial de la Salud (Saldanha *et al.*, 2005). El segmento que se amplificó se obtuvo del Instituto Nacional de Control y Estándares Biológicos, UK (NIBSC, por sus siglas en inglés). Este a pesar de ser un excelente control, es costoso lo cual va en contra de la idea de contar con un método de detección de VHA en muestras ambientales que sea factible de utilizar. La clonación del segmento VP1/2A del genoma del VHA ofrece una alternativa metodológica para contar con un control positivo.

El producto de PCR que se usó para la clonación fue el amplificado por la enzima Thermo pol, ya que aunque la enzima Pfu es una enzima con una alta fidelidad, esta no deja extremos de adeninas, mientras que la enzima Thermo pol sí. Dichos extremos de adeninas son necesarios para hacer la reacción de ligación entre el segmento a clonar y el plásmido.

Lo que se deberá es seguir trabajando en obtener límites de detección más bajos, ya que aunque la PCR de punto final tiene menor sensibilidad que la de tiempo real, sí se tiene reportes en los que se ha logrado detectar desde 100 partículas/ml, inclusive menos.

Para la detección del VHA en muestras ambientales fue necesario un control externo para la PCR, por las inhibiciones, ya que trabajar con muestras ambientales representa un gran reto por la cantidad de sustancias presentes (materia orgánica, metales pesados, bacterias, etc.). Y si no se usa un control externo, se corre el riesgo de que una muestra que resulte negativa (sin banda), se podría deber a una posible inhibición, ya sea por mal funcionamiento del termociclador, por una mezcla incorrecta de la PCR, por la presencia de sustancias químicas o a una actividad deficiente de la DNA polimerasa (Hoofar *et al.*, 2004).

El control externo que se eligió al principio fue la vacuna contra polio (VOP), la cual contiene polio 1, 2 y 3, y es de las más utilizadas como control positivo para amplificar enterovirus (EV) (polivirus, echovirus, coxsakievirus y enterovirus). Y al igual que hepatitis A, es miembro de la familia *Picornaviridae*, presentan regiones del genoma muy conservadas, como la región 5'NCR usada en este ensayo, razón por lo cual se consideró factible su uso para validar el ensayo del VHA durante el proceso de extracción y amplificación del ácido nucleico (Costafreda *et al.*, 2006). Además, se cuentan con reportes donde se documenta el uso de otros virus como controles internos o externos en los procesos de extracción y amplificación de hepatitis A, casos como el que reporta Di Pasquale *et al* (2010) donde usan Calicivirus felino (FCV) o Costafreda y colaboradores (2006) a Mengovirus (cepa vMC₀), como control interno de amplificación. Desafortunadamente ya no se pudo seguir trabajando con la vacuna como control externo, porque hay restricciones en su venta.

En las muestras de Xochimilco en las que se les inoculó VOP no hubo amplificación, posiblemente por la presencia de materia orgánica (ácidos húmicos o fúlvicos) y metales pesados que pudieran estar interfiriendo con la actividad de la polimerasa. Haciendo una revisión bibliográfica, encontramos que existen compuestos químicos (potenciadores,

adyuvantes o facilitadores) que disminuyen los efectos de las sustancias inhibidoras, ya sea aumentando la especificidad y rendimiento de la PCR, permitiendo la amplificación de secuencias de DNA ricas en GC y/o incrementa la fidelidad de la síntesis de DNA (Abu y Radstrom, 2000). Por lo que se utilizó a BSA y DMSO como adyuvantes.

Las diluciones realizadas no produjeron ningún efecto en las amplificaciones, por lo que se decidió no seguir con estas, por los posibles efectos negativos, porque al diluir no solo se diluye a la (s) sustancia (s) inhibidora (s), sino también a la molécula blanco. En los ensayos donde se usó BSA-DMSO juntos, no se encontró ninguna diferencia con respecto a si se usaban por separados, y de igual forma y en base a estos resultados, solo se continuo trabajando con el DMSO como adyuvante. Esto porque en los ensayos muestra la misma eficiencia que el BSA.

Buscando tener la concentración óptima del DMSO, se hizo una curva de concentración, encontrando que al 5% se da la amplificación de una banda bien definida, mientras al 10% el efecto es inhibitorio. Nuestro resultado concuerda con la literatura, en la cual se reporta que es al 5% la concentración óptima y que al 10% se presenta una inhibición en la actividad de la taq en un 50 % (Espinosa, 2007).

En las muestras de agua del río Magdalena sólo se logró la detección del control externo en un 51.5% agregando DMSO. La inhibición presente en las muestras podría deberse a presencia de material genético de poblaciones microbianas, a la cantidad de materia orgánica disuelta o a la presencia de sales de Calcio y Magnesio (Jujnovsky *et al.*, 2010), debido a que estos componentes pueden tener un efecto directo sobre la enzima polimerasa. En las muestras de Ciudad Universitaria y Valle del Mezquital, se detectó el plásmido en un 100% y 95.1% respectivamente. En estas muestras encontramos que adicionar DMSO tuvo un efecto positivo.

Es importante mencionar que el tipo de tratamiento que se le dé a una muestra, dependerá de las características de está. Y que existen técnicas como las columnas de sefadex, ultracentrifugación de gradiente de cloruro de cesio, tratamientos con resinas de intercambio

iónico o la precipitación con Polietilenglicol (Toze, 1999; Fong y Lipp, 2005), que junto con los adyuvantes mejoran la remoción y disminución de los efectos de los inhibidores en la amplificación, por lo que se debe considerar el uso de ambos.

Y que adyuvantes como el N,N,N-trimetilglicina (betaina), la formamida, el glicerol, los detergentes no iónicos, la albúmina de suero bovino, el polietilenglicol y el cloruro de tetraamilonio (Frackman *et al.*, 1998), se deben considerar, para futuras investigaciones, tomando en cuenta el tipo de muestras al momento de la elección, así como la concentración a la cual este tiene un mejor efecto, que se verá reflejado en el rendimiento y especificidad de la PCR.

El número de muestras ambientales positivas para el VHA fue bajo, esto puede deberse a 1) que el virus no esté presente en la población, por lo tanto no se encontrará en el agua o 2) que el límite de detección de la técnica es alto y no es posible detectarlo si este se encuentra a baja concentración. Aunque factores como volumen de muestra concentrado, la eficiencia en la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de componentes inhibidores en la reacción y la formación de productos en la PCR afectarán el límite de detección (Savichtcheva y Okabe, 2006).

CONCLUSIONES

- Se logró la obtención de controles positivos para la detección del virus de hepatitis A por RT-PCR a través de la clonación, la cual resultó ser una técnica rápida y económica, comparado con la opción de comprar el control del VHA.
- Incluir un control externo durante la amplificación nos permitió descartar falsos negativos debido a posibles inhibiciones. Por lo que se recomienda incluir un control endógeno o externo desde la extracción, para poder descartar que los resultados negativos no se deban problemas en este paso.
- El uso del DMSO para disminuir las inhibiciones presentes en algunas muestras resultó una buena estrategia, al tener un efecto positivo en las muestras de Ciudad

Universitaria y Valle del Mezquital, al ser las muestras donde el control externo se pudo detectar casi al 100%. Sin embargo, se recomienda utilizar un tratamiento adicional para lograr una mejor remoción de inhibidores.

- Es necesario dirigir los esfuerzos para aumentar la sensibilidad y especificidad de ésta técnica, con la finalidad de eliminar los contaminantes que interfieran en ésta y disminuir los costos en la detección del VHA.
- Se logró generar una herramienta que permitirá la detección rápida y oportuna del VHA, con la cual se podrá evaluar la ocurrencia del virus en muestras ambientales, ayudando a evitar brotes o epidemias.

REFERENCIAS

- Abbaszadegan M., Stewart P. y LeChevallier M. 1999. A strategy for detection of virus in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2): 444-449.
- Abu Al-Spoud W., y Radstrom P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. *Journal of Clinical Microbiology* 38(12): 4463-4470.
- Albinana-Giménez N., Miagostovich P. M., Calgua B., Huguet M. J., Matia L y Girones R. 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water treatment plants. *Water Research* 30;1-9.
- Amado A. L., Villar M. L., De Paula S. V., y Gaspar C. A. M. 2008. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *Journal of Virological Methods* 148:74-80.
- Barrientos-Gutiérrez T., Brizuela-Alcántara D., y Chávez-Tapia N. C. 2011. Hepatitis A virus infection in high-risk subjects. *Annals of Hepatology* 10 (4): 578-579.
- Belalov S. I., Isaeva V. O., y Lukashev N. A. 2011. Recombination in hepatitis A virus: evidence for reproductive isolation of genotypes. *Journal of General Virology* 92: 860-872.
- Borchardt A. M., Bertz D. P., Spencer K. S., y Battigelli A. D. 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household Wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2):1172-1180.
- Bosch A. 1998. Human enteric viruses in the water environmental: a minireview. *International Microbiology* 1:191-196.
- Bosch A., Guix S., Sano D. y Pintó M. R. 2008. New tools for the study and direct surveillance of virul pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology* 19:295-301.
- Brassard J., Seyer K., Houde A., Simard C., y Trottier Y. L. 2005. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR. *Journal of Virology Methods* 123:163-169.
- Burgess A. M., McIntyre B.P., Hellard M., Ruff A. T., Lefevre I. y Bock L. H. 2010. Antibody persistence six years after two doses of combined hepatitis A and B vaccine. *Vaccine* 28: 2222-2226.

- Butot S., Putallaz T., Amoroso R., y Sánchez G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and Environmental Microbiology* 75(12):4155-4161.
- Calgua B., Monte B. C. R., Bofill-Mas S., Rodriguez-Manzano J., y Girones R. 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and Jc polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods* 171: 1-7.
- Campagna M., Siddu A., Meloni A., Basciu C., Ferrai L., Pettinau E., Cardia C., Masia G., y Coppola R. C. 2012. Changing pattern of hepatitis A virus epidemiology in an area of high endemicity. *Hepatitis Monthly* 12(6): 382-385.
- Carter J. M. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98:1354-1380.
- 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* 8:203-213.
- Costafreda M. I., Bosch A., Pintó R. M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a Real-Time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3846-3855.
- Costa-Mattioli M., Cristina J., Romero H., Perez-Bercof R., Casane D., Colina R., Garcia L., Vega I., Glikman G., Romanowsky V., Castello A., Nicand E., Gassin N. M., Billaudel S., y Ferré V. 2002. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification base on the complete VP1 protein. *Journal of Virology* 76(18):9516-9525.
- Cristina J., y Costa-Mattioli M. 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Research* 127: 151-157.
- Cuthbert A.J. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clinical Microbiology Reviews* 14(1):38-58.
- De Paula S. V., Baptista L. M., Lampe E., Niel C., y Gaspar M.C. A. 2002. Characterization of Hepatitis A Virus isolates from subgenotypes IA y IB in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* 66:22-27.

- Desbois D., Couturier E., Mackiewicz V., Graube A., Letort M. J., Dussaix E., y Roque-Alonso A. M. 2010. Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9):3306-3315.
- Di Pasquale S., Paniconi M., De Medici D., Suffredini E. y Croci L. 2010. Duplex real time PCR for detection of hepatitis A virus in shellfish using feline calicivirus as a process control. *Journal of Virological Methods* 163: 96-100.
- Donia D., Divizia M., y Pana A. 2005. Use of armored RNA as a standart to construct a calibration curve for real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 125: 157-163.
- Espigares-García M. 2006. Virus en aguas de consumo. *Higiene y Sanidad Ambiental* 6: 173-189.
- Espinosa A. L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L. E., Souza V., y Aguirre X (compiladores). Ecología molecular. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Félix J.L., Fernández Y.C., Velarde-Félix J.S., Torres B.V., Cháidez C. 2010. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis A virus and Norovirus in marine recreational waters of Mexico. *Journal of Water and Health* 8(2): 269-278.
- Fiore E. A. 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases* 38:705-715.
- Fong T.T. y Lipp K.E. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potencial water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2): 357-371.
- Fongaro G. A do Nascimento M., Rigotto C., Ritterbusch G., D´A da Silva A., Esteves A. P., y Barardi M. R. C. 2013. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Journal* 10:1-9.
- Frackman S., Kobs G., Simpson D., y Storts D. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega Notes* 65: 27-30.
- Franco E., Meleleo C., Serino L., Sorbara D., y Zaratti L. 2012. Hepatitis A: epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* 4(3):68-73.

- García-Juárez I., Solórzano S. F., Álvarez-y-Muñoz M. T., y Vázquez-Rosales J. G. 2008. ¿Existe transición en el patrón endémico de las hepatitis A en la población infantil mexicana? *Revista de Investigación Clínica* 60(4):292-296.
- Gauss-Müller V. y Kusov Y. Y. 2002. Replication of a hepatitis A virus replicon detected by genetic recombination *in vivo*. *Journal of General Virology* 83:2183-2192.
- Gharbi-Khelifi H., Sdiri K., Harrath R., Fki L., Hakim H., y Berthomé M. 2007. Genetic analysis of HAV strains in Tunisia reveals two new antigenic variants. *Virus Genes* 35:155-159.
- Gilbride K. A., Lee D. Y., y Beaudette L. A. 2006. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods* 66: 1-20.
- Hendrickx G., Van H. K., Vorsters A., Wiersma S., Shapiro C., Andrus K. J., Roper M. A., Shouval D., War W., y Van D. P. 2008. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. *Journal of Viral Hepatitis* 15(1):1-15.
- Hernández-Morgan J., León-Felix J., Peraza-Garay F., Gil-Salas B. G. y Chaidez C. 2009. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration RT-PCR integrated methods. *Journal of Applied Microbiology* 106 (6):1579-1590.
- Hoofar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., y Fach P. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5): 1863-1868.
- Hussain Z., Husain A. S., Almajhdi N. F., y Kar P. 2011. Immunological and molecular epidemiological characteristics of acute and fulminant viral hepatitis A. *Virology Journal* 8(254):1-10.
- Jacobsen H. K. y Wiersma T. S. 2010. Hepatitis A virus: seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28:6653-6657.
- Jacobsen K.H. y Koopman S.J. 2004. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. *Epidemiologic Infection* 132:1005-1022.
- Jeong S.H., y Lee H. S. 2010. Hepatitis A: clinical manifestations and management. *Intervirology* 53:15-19.

- Jothikumar N., Cromeans T. L., Sobsey M. D., y Robertson B. H. 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 3359-3363.
- Jothikumar N., Cromeans T. L., Sobsey M. D., y Robertson B. H. 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6); 3359-3363.
- Jujnovsky J., Almeida-Leñero L., Bojorge-García M., Monges L. M., Cantoral-Uriza E., y Mazari-Hiriart M. 2010. Hydrologic ecosystem services: water quality and quantity in the Magdalena River, Mexico, City. *Hidrobiológica* 20(2): 113-126.
- Kanda T., Gauss-Müller V., Cordes S., Tamura R., Okitsu K., Shuang W., Nakamoto S., Fujiwara K., Imazeki F., y Yokosuka O. 2010. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *Journal of Virology* 84:618-623.
- Karyna R., Nilsson C., Wei Lim Y., Ruan Y. y Breitbart M. 2009. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental Microbiology* 11(11): 2806-2820.
- Kiulia M. N., Netshiweta R., Page A. N., Van Zyl B. W., Kiraithe M. M., Nyachio M. A., Mwenda M. J., y Taylor B. M. 2010. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *Journal of Applied Microbiology* 109(3):818-828.
- Kovac K., Gutiérrez-Aguirre I., Banjac M., Peterka M., Poljsak-Prijatelj M., Ravnikar M., Zimsek m.J., Cherlotte S. A., y Raspor P. 2009. A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods* 162: 272-275.
- Kulkarni A. M., Walimbe M. A., Cherian S. y Arankalle A. V. 2009. Full length genomes of genotype IIIA hepatitis A virus strains (1995-2008) from India and estimates of the evolutionary rates and ages. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1287-1294.
- Lanford E.R., Feng Z., Chavez D., Guerra B., Brasky M. K., Zhou Y., Yamane D., Perelson S.A., Walker M. C., y Lemon M. S. 2011. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferón response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (27): 11223-11228.

- Lazcano-Ponce E., Conde-González C., Rojas R., De Antonio R., Romano-Mazzotti L., Cervantes Y., y Ortega-Barria E. 2013. Seroprevalence of hepatitis A virus in a cross-sectional study in México implications for hepatitis A vaccination. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 9(2):375-381.
- Le Guyader F., Dubois E., Menard D., Pommepay M. 1994. Detection of hepatitis A, rotavirus and in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Applied Environmental Microbiology* 60: 3571-3665.
- Lee G. S., Lee H. S., Park W. S., Suh I. C., Jheong H. W., Oh S., y Paik Y. S. 2011. Standardized positive controls for detection of norovirus by reverse transcription PCR. *Virology Journal* 8:1-8.
- León-Félix J., Cháidez-Fernandez Y., Velarde-Félix J. S., Valdez T. B., y Cháidez C. 2010. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis A virus and norovirus in marine recreational water of Mexico. *Journal of Water and Health* 8(2):269-278.
- Lugoboni F., Pajusco B., Albiero A., y Quaglio G. 2012. Hepatitis A virus among drug users and the role of vaccination: a review. *Frontiers in Psychiatry* 2(79):1-7.
- Martin A. y Lemon M. S. 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43(2):s164-s170.
- Martínez-Martínez M., Díez-Valcarce M., Hernández M. y Rodríguez-Lázaro D. 2011. Desing and application of nucleic acid standards for quantitative detection of enteric viruses by real-time PCR. *Food and Environmental Virology* 3: 92-98.
- Nainan V O., Xia G., Vaughan G., y Margolis S. H. 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1):63-79.
- Pachepsky Y., Sheltn R. D., McLain E. T. J., Patel J. y Mandrell E. R. 2011. Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113:73-138.
- Panduro A., Escobedo-Meléndez G., Fierro N. A., Ruiz-Madrigal B., Zepeda-Carrillo E. A., y Roman S. 2011. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Pública Mexicana* 53(1): 37-45.
- Parasidis T. A., Konstantinidis T. G., y Alexandropoulou I. G. 2013. Environmental monitoring of enteric viruses in wastewater. *Virology and Micology* 2(1) e106. doi:10.4172/2161-0517.1000e106.

- Payment P., y Locas A. 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49(1): 4-11.
- Pina S. 2001a. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Barcelona, España 280 p.
- Pina S., Buti M. Jardí R., Clemente-Casares P., Jofre J., y Girones R. 2001b. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environmental and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology* 82:2955-2963.
- Pintó M. R., Aragonés L., Costafreda M. I., Ribes E., y Bosch A. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Research* 127: 158-163.
- Pintó M. R., Costafreda M. I., y Bosch A. 2008. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7450-7355.
- Poovorawan Y., Chatchatee P., y Chongsrisawat. V. 2002. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis A global perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17:155-166.
- Prado T., Silva M. D, Guilayn C. W., Rose L. T., Gaspar C. A. M. y Miagostovich P.M. 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research* 45: 1287-1297.
- Rodríguez A.R., Pepper L. I., y Gerba P. C. 2009. Application of PCR-Based methods to assess the infectivity of enteric virus in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75(2): 297-307.
- Rzezutka A., y Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews* 28:441-453
- Sair I. A., D'Souza H. D., y Jaykus A. L. 2002a. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1(2):73-89.
- Sair I. A., D'Souza H.D., Moe L. C., y Jaykus L.A. 2002b. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 100: 57-69.
- Saldanha J., Heath A., Lelie N., Pisani G., y Yu MY. 2005. Collaborative study group. A World Health Organization international standard for hepatitis A virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis* 89: 52-58.

- Sánchez G., Bosch A., y Pintó M. R. 2007. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology* 45(1):1-5.
- Savichtcheva O., y Okabe S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40: 2463-2476.
- Semana 28 del Boletín Epidemiológico, 2015. Consultado en <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem28.pdf>
- Seymour J. I., y Appleton H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* 91:759-773.
- Shay F. G., Martinson C. B., Moyer N. M. W., y Dahling R. D. 2003. A multiplex reverse transcription- PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6): 3158-3164.
- Silberstein E., Konduru K., y Kaplan G. G. 2009. The interaction of hepatitis A virus (HAV) with soluble forms of its cellular receptor I (HAVCRI) share the physiological requirements of infectivity in cell culture. *Virology Journal* 6(175):1-8.
- Silva J., Torres P. y Madera C. 2008. Reuso de aguas residuales domésticas en la agricultura. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26(2):347-359.
- Silva M. M. A. 2013. Uso de indicadores virales para la evaluación de la calidad de agua potable y de reuso en Ciudad Universitaria. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, 80 pp.
- Skraber S., Gassilloud B., y Gantzer C. 2004. Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3644-3649.
- Solano-Ortiz R. 2011. Avances metodológicos para la detección del virus de la hepatitis A y bacteriófagos en agua. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, 68 pp.
- Soule H., Genoulaz O., Gratacap-Cavallier B., Chevallier P., Jing-Xing L., y Seigneurin J. M. 2000. Ultrafiltration and reverse transcription polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research* 34(3); 1063-1067.

- Tahk H., Bum L. K., Hwa L. M., Joo S.D., Sung C. D., y Choi C. 2012. Development of reverse transcriptase polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hepatitis A virus in vegetables. *Food Control* 23:210-214.
- Tallon A. L., Love C. D., Moore S. Z., y Sobsey D. M. 2008. Recovery and sequence analysis of hepatitis A virus from springwater implicated in an outbreak of acute viral hepatitis. *Applied and Environmental Microbiology* 74(19):6158-6160.
- Tanaka J. 2000. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18:57-60.
- Tapia-Conyer R., Santos J. I., Cavalcanti A. M., Urdaneta E., Rivera L., Manterola A., Potin M., Ruttiman R., y Tanaka K. J. 1999. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61(5):825-829.
- Toranzos A.G., McFeters A.G., Borrego J.J., y Savill. M. 2007. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters, 249-260. *En: Hurst J.C., Garland L.J., Mills L.A., Crawford L.R., Lipson A.D. y Stetzenbach D.L. Manual of Environmental Microbiology, ASM Press Washinton D. C.*
- Toyoda H., Kumada T., Kiriyama S., Sone Y., Tanikawa M., Hisanaga Y., Kanamori A., Lin C-L y Liu H-L. 2009. Clinical and molecular characteristics of hepatitis A virus infections during the years 1992-2003 in Ogaki, a centrally locales city of Japan. *Journal of Clinical Virology* 44:145-148.
- Toze S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. 33(17): 3545-3556.
- Valdespino J. L., Ruiz-Gómez J., Olaiz-Fernández G., Arias-Toledo E., Conde-González C. J., Palma O., Sepúlveda J. 2007. Seroepidemiología de la hepatitis A en México, sensor de inequidad social e indicador de políticas de vacunación. *Salud Pública Mexicana* 49(3):377-385.
- Villar L. M., Morais L. M., Aloise R., Melo M. M. M., Calado I A., Lampe E., y Gaspar A. M. C. 2006. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research* 39: 873-881.
- Wilson G. I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3741-3751.

ANEXOS

Anexo I. Tabla con las claves de las muestras analizadas.

Nombre del sitio	Clave
RÍO MAGDALENA	
Segundo Dinamo	AN4
Primer Dinamo	AN6
Antes de la planta potabilizadora	AN7
Después de la planta potabilizadora	AN5
Terminal de autobuses Benito Juárez	ZU1
Río Magdalena antes de confluencia con el río Eslava	ZU3
Confluencia del río Magdalena y Eslava	ZU5
Hospital Angeles	ZU9
Presa anzaldo	ZU10
Viveros de Coyoacán	ZU11
XOCHIMILCO	
San Gregorio	SG
Santísima	Sa
Cuemanco	Cu
Chinampa Experimental	Ex
Tezhuilo	Te
VALLE DEL MEZQUITAL	
Salida Hopital A	Sal Hosp A
Salida Hospital B	Sal Hosp B

Planta de Bombeo Churubusco Lago	IPBCHL
Licuadora	Licu
Endo entrada	End ent
Endo salida	End sal
Salto Tlamaco	Salto Tlamaco
Cerro Colorado	Ccol
Piezometro	Piez I
Pozo Toño	Pozo Toño
Pozo la Virgen	Virgen
Pozo la Noria	Noria
CIUDAD UNIVERSITARIA	
Planta de Tratamiento Entrada, Cerro del Agua	PTECA

Anexo II. Se compararon las secuencias de cada clona en la base de datos del GenBank y se muestra imagen de la pantalla con el resultado.

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments: 5,000,000 - 500,000 - 50,000 - 5,000 - 500 - 50 - 5 - 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus strain 76, complete genome	797	797	100%	0.0	99%	D06461.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus (rd type) RNA, complete genome	797	797	100%	0.0	100%	M14767.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 216, complete genome	797	797	100%	0.0	100%	K019321.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus polyprotein/polyprotein gene, complete cds	705	705	100%	0.0	95%	A230888.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 119A, complete genome	705	705	100%	0.0	95%	M16632.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 181, complete genome	700	700	100%	0.0	100%	K0702216.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 80A polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	K112620.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 80-25A polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	K112621.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1021A polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	95%	K0724021.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1022A polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	95%	K0724020.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1030A polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	K0724019.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1036 polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	K1126218.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1037 polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	K1126217.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus strain 1001, complete genome	700	700	100%	0.0	95%	K0569916.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus polyprotein RNA, complete cds	700	700	100%	0.0	95%	M16809.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus polyprotein RNA, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	M16617.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hepatitis A virus polyprotein RNA, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	A130000.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus 271 gene for polyprotein partial cds strain 418-104-8-2015	717	717	64%	0.0	95%	K1271321.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus genome subunit 911-20 strain isolated from 18/09/09	717	717	64%	0.0	95%	A825862.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1100-24 polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	95%	A1754049.1
<input type="checkbox"/> Hepatitis A virus isolate 1101104 polyprotein gene, complete cds	700	700	100%	0.0	100%	A1706817.1