



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

**MANUAL PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS EN
AGUA. FASE PRE-ANALÍTICA: TOMA,
TRANSPORTE, ALMACENAJE Y
CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS**

T E S I S

PARA OBTENER TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

AMANDA SOFÍA TOVAR HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA ANA CECILIA ESPINOSA
GARCÍA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO.
MARZO, 2022



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.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas más extraordinarias que conozco, mi familia.

A mis padres, Leonardo y Miriam, mi ejemplo a seguir. Gracias papá por acompañarme cada mañana y en cada paso que doy, por esas pequeñas pláticas y tus sabios consejos. Gracias mamá por siempre recibirme con un beso y comida rica, por siempre estar ahí cuando te necesito, por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia se puede llegar muy lejos.

A mi amada hermana Tania, mi mejor amiga, gracias por tu apoyo en todo momento, porque, aunque físicamente estés lejos siempre te siento cerca, te agradezco por ayudarme y enseñarme tanto a lo largo de los años. A Paul, por compartir conmigo tu forma de pensar y ayudarme a crecer profesional y personalmente. A mi pequeña Mae por hacer feliz mi corazón con tan solo una sonrisa.

A Braulio, el amor de mi vida, por ser mi compañero de estudio y aventuras, por siempre escucharme e impulsarme a cumplir mis sueños. Gracias por acompañarme en este camino.

Gracias por su amor y apoyo incondicional, por siempre confiar en mi y darme aliento cuando lo necesité, gracias por recordarme que todo aquello que implica un esfuerzo tiene su recompensa. Gracias por motivarme a ser una mejor persona cada día, porque la persona que soy es, en gran parte, gracias a ustedes.

Los amo con todo mi ser, gracias por tanto.

Amanda Tovar.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud absoluta a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa. Lugar que me forjó como profesional y como persona.

Agradezco enormemente el apoyo recibido por parte de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI), quien me otorgó una beca de Licenciatura por la participación en el proyecto “La etiqueta Chinampera como promotora del fortalecimiento económico, alimenticio y la restauración integral de la zona lacustre de Xochimilco a través del modelo Chinampa-Refugio”. No. de proyecto: SECTEI/258/2019. Responsable técnico: Luis Zambrano González. Gracias por permitirme participar en este gran proyecto y por todo lo aprendido.

A mi querida tutora, la Dra. Ana Cecilia, quien presencié el nacimiento de mi amor hacia el estudio del agua, y me brindó su apoyo y consejo en cada paso de este proceso siempre acompañado de una sonrisa. Mi infinito aprecio hacia usted.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, el Dr. Agustín de Jesús Quiroz Flores, el Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos y a la M. en C. Jazmín Aguilar Medina, quienes, a pesar de tener una vida ocupada, se dieron el tiempo de leer y darme sus comentarios para hacer posible la realización de este trabajo. Gracias por compartir su experiencia y conocimientos conmigo, lo aprecio mucho en verdad.

Y a todos aquellos quienes me brindaron su apoyo para la realización de esta tesis, les agradezco de todo corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>MARCO TEÓRICO</i>	<i>3</i>
Antecedentes	3
Características de los virus	8
Virus transmitidos por agua	10
Salud Pública	20
Impacto ambiental	21
Normatividad	21
Bioseguridad	23
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	<i>26</i>
<i>OBJETIVOS</i>	<i>28</i>
<i>DESARROLLO</i>	<i>29</i>
Previo al muestreo	30
Esterilización	35
Toma de muestras	37
Transporte	46
Almacenaje	48
Concentración de muestras	50
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>60</i>
<i>ANEXO 1. TABLA DE CONSULTA RÁPIDA</i>	<i>62</i>
<i>ANEXO 2. APLICACIÓN DEL MANUAL</i>	<i>63</i>
<i>REFERENCIAS</i>	<i>83</i>

INTRODUCCIÓN

El agua es un elemento esencial para los ecosistemas naturales y el desarrollo de las sociedades (Espinosa-García et al., 2004). Brinda numerosos beneficios como la regulación del clima en el planeta, el mantenimiento de la homeostasis en los seres vivos, se utiliza como fuente de energía, es indispensable para la producción de alimentos, por mencionar solo algunos. Sin embargo, también puede actuar como matriz transportadora de microorganismos como bacterias y virus que pueden ser patógenos para humanos y así afectar la salud de las poblaciones que hacen uso del recurso (Martos, 2015).

Dentro de los virus que son transportados por agua, los virus entéricos (VE) son el grupo de virus más importante debido a que son causantes de brotes de gastroenteritis, hepatitis infecciosa, meningitis y conjuntivitis, entre otras enfermedades (Saavedra et al., 2012). Entre los VE comúnmente asociados con enfermedad en humanos y capaces de persistir en el ambiente se encuentran los adenovirus, astrovirus, calicivirus, enterovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E y rotavirus (Espinosa-García et al., 2004). Estos virus infectan las células del tracto gastrointestinal de su hospedero humano y allí se replican, posteriormente son excretadas junto con las heces de individuos infectados llegando al drenaje o al ambiente. El manejo que se le dé a las aguas residuales puede favorecer la contaminación de agua superficial o subterránea que eventualmente sea destinada al consumo humano o a diferentes actividades que implican el riesgo de ingerir agentes infecciosos contenidos en ella (Peláez et al., 2016). Así mismo, se ha demostrado la contaminación en aguas superficiales de ríos y lagos por virus entéricos debido a descargas de aguas residuales sobre los mismos afectando la calidad de vida de diversos organismos vivos (Bofill-Mas et al., 2005).

El análisis de VE en ambientes acuáticos sirve para varios propósitos, entre ellos investigar la incidencia y comportamiento de virus en aguas, determinar la presencia de virus y el riesgo de infección y el monitoreo rutinario para determinar la calidad del agua (Grabow, 2007). La detección de estos agentes está relacionada, a su vez, con dos procesos. El proceso de toma de muestra y el proceso analítico. Ambos procesos son esenciales, y en conjunto proporcionan resultados fiables que ayudarán a la toma de decisiones por parte de los organismos competentes, por lo que es indispensable que las muestras se obtengan de forma correcta, esto se refiere a garantizar que la muestra mantiene condiciones muy similares a las del agua del sitio de muestreo. Para ello, el proceso pre-analítico debe incluir no sólo el proceso de toma de muestra, sino aspectos tales como el diseño y empleo de registro de datos, aspectos relacionados con las condiciones de transporte y almacenamiento que eviten la alteración o degradación de la muestra, y aspectos relacionados con la custodia de las muestras ambientales (Galán Madruga et al., 2018).

Debido a la importancia que tiene la fase pre-analítica en monitorizar y proponer soluciones para poder disminuir tanto el número de infecciones humanas que afectan el sector público, como el impacto que los virus tienen en el ambiente, se desarrolla el presente trabajo.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Para entender mejor el desarrollo de este manual para la detección de virus en agua es necesario hacer un recorrido por los hechos más relevantes dentro de la historia de la virología, ya que sin dichos descubrimientos no sería posible llegar a las investigaciones actuales en el estudio de virus. Así como el desarrollo de las diversas metodologías que hoy en día se emplean para el estudio de estos.

Aunque no existe un registro exacto de la primera epidemia producida por un virus, gracias a evidencias arqueológicas en momias del Antiguo Egipto y grabados antiguos donde se muestran lesiones características de viruela y poliomielitis, podemos afirmar que los virus han afectado la salud humana desde hace miles de años. Sin embargo, por mucho tiempo estas enfermedades se atribuyeron a efectos de los planetas o bien, al enojo de los dioses ante las conductas humanas (Ossa L, 2001).

La historia de la virología inicia a finales del siglo XIX, en esta época se había descrito ya el papel de los hongos y bacterias en enfermedades humanas y se había descubierto un método para obtener cultivos puros de ellos. Sin embargo, quedaban muchas enfermedades de las que no se conocía una etiología definida. En 1892, con la aparición del “mosaico del tabaco”, enfermedad que impedía el crecimiento de las plantas de tabaco y daba a las hojas una apariencia manchada, Dimitri Ivanowsky, un botánico ruso, demostró que la savia de dichas plantas, aún después de pasar por un filtro que retenía bacterias, seguía siendo infecciosa (Solomon et al., 2011).

Unos años después, en 1898, Martinus Beijerinck, un microbiólogo holandés, presentó a la Academia de Ciencias de Ámsterdam sus investigaciones sobre el agente del mosaico del tabaco. Beijerinck describió al agente causal como un *contagium vivum fluidum* o “virus”, siendo esta la primera vez que se emplea el término haciendo referencia a un agente infeccioso biológico. El fundamento de su descubrimiento fue que este agente podía atravesar los filtros de porcelana desarrollados por Chamberland y que el mismo era capaz de provocar enfermedad al ser inoculado en plantas de tabaco previamente sanas, misma conclusión a la que llegó Ivanowsky años antes. Beijerinck también postuló que el virus se convertía en parte del metabolismo celular, que interaccionaba con éste y que requería de algo más complejo que el microscopio óptico para poder observar su estructura (Ossa L, 2001).

A principios del siglo XX, científicos en todo el mundo reportaron enfermedades causadas por agentes infecciosos semejantes al del mosaico del tabaco, pues pasaban a través de los filtros que removían todos los microorganismos conocidos y eran tan pequeños que no podían verse con un microscopio óptico. Un ejemplo claro es la primera pandemia del virus de influenza A, producida por una cepa del subtipo H1N1 en 1918. Esta enfermedad, denominada gripe española, se diseminó a todo el planeta y produjo aproximadamente 50 millones de muertes (Solomon et al., 2011).

Fue hasta 1930, con el desarrollo del microscopio electrónico que fue posible visualizar un virus por primera vez (Arraiza et al., 2009). Debido a su pequeño tamaño y a su parasitismo intracelular obligado, que impide su multiplicación en medios axénicos (carentes de células vivas), los virus pudieron ser estudiados hasta mediados del siglo XX, cuando se desarrollaron los cultivos celulares y el microscopio electrónico. El desarrollo de células vivas en cultivo fue posible a partir

de la década de 1940, cuando se comenzaron a emplear los antibióticos, lo que permitió mantener a las células en cultivo libres de contaminación bacteriana (Cashdollar & Wymer, 2013). Así comenzó la edad moderna de la Virología cuando en 1948, Seller y Enders lograron por primera vez la replicación de un virus en cultivo (Solomon et al., 2011).

En la década de 1940, una vez identificado el virus causante de la epidemia de polio o poliovirus, se creía que la única manera en que este podía transmitirse era mediante el contacto directo con una persona infectada (Alberto et al., 2013). Sin embargo, se demostró que el virus podía transmitirse también mediante agua, pues al alimentar ratas sanas de laboratorio con agua contaminada con poliovirus estas resultaban enfermas también. A este hallazgo no se le dio gran relevancia hasta 1955 con la epidemia de hepatitis E ocurrida en Nueva Delhi, India, donde se reafirmó que el agente viral era transmitido mediante agua (Botto, 2005).

En las décadas siguientes, gracias a una gran cantidad de estudios, se volvió claro que algunos virus como el poliovirus, adenovirus, norovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis E, podían ser transmitidos por agua poniendo en peligro la salud humana (Van Heerden et al., 2005). Lo que propició el desarrollo de métodos para su cuantificación y caracterización en diferentes tipos de agua. Los primeros estudios que investigaron el proceso de filtración de muestras de agua se basaban en un proceso de adsorción por membranas coloidales, cuyo principal propósito era determinar el tamaño de las partículas virales (Moore et al., 1981).

En 1952, con la aparición de las resinas de intercambio iónico se pudo llevar a cabo la concentración de poliovirus y un año más tarde, en 1953 se demostró que estas resinas eran capaces

de concentrar virus en muestras de aguas residuales (Murray et al., 2018). Posteriormente, usando procesos de floculación en muestras de agua de río, se demostró que se podían analizar grandes volúmenes de agua. Durante la década de 1960 y 1970, surgió un gran interés en desarrollar técnicas para aislamiento y detección de virus en muestras de agua, expandiendo así el campo de la virología ambiental (Pierce, 2008).

En 1965, durante un simposio sobre la transmisión de virus en agua, se discutieron los principales problemas que implicaba la presencia de virus en agua, los métodos existentes de detección y cómo se podía proteger la salud de la población de la exposición a los virus (Cashdollar & Wymer, 2013). En 1975, la Organización Mundial de la Salud formó un grupo de expertos en bacteriología y virología para el análisis de agua, el cuál determinó algunos métodos para el aislamiento de virus en muestras de agua (Hurst et al., 1998). Más adelante, en 1981 se publicó la décimo quinta edición de los Métodos Estandarizados para la Examinación de Agua, incluyendo métodos para la concentración y detección de virus en agua (Haramoto et al., 2004).

En julio de 1997, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos comenzó el estudio Requisito de Recopilación de Información o ICR por sus siglas en inglés (*Information Collection Requirement*) con el fin de compilar la información existente sobre los virus en agua y crear una estandarización sobre los límites permisibles para diferentes parámetros en el agua de consumo humano (Donaldson et al., 2002). Finalmente, durante los siglos XX y XXI se desarrollaron diversas técnicas moleculares que permitieron el desarrollo de nuevos y eficaces métodos diagnósticos para las enfermedades virales e identificación de virus, incluyendo aquellos de la matriz agua (Ossa L, 2001).

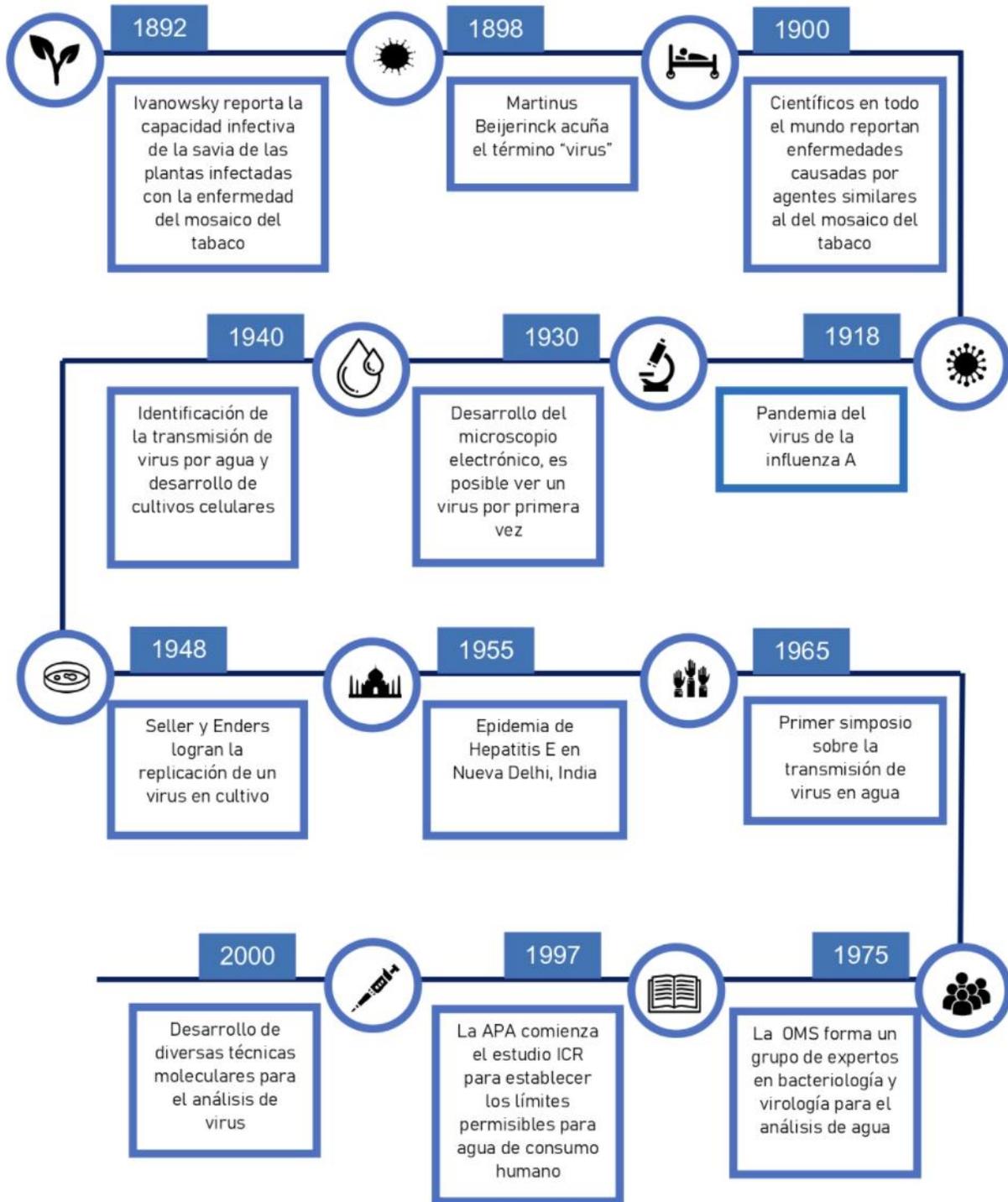


Fig. 1. Línea del tiempo con los eventos más importantes en el estudio de virus en agua.

Características de los virus

Etimológicamente, virus significa veneno en latín. Aunque no todos los virus son patógenos, muchos de ellos son causantes de una amplia gama de enfermedades humanas (Pavón, 2020). Las características generales de los virus son:

Tamaño

La mayoría de los virus posee un tamaño muy inferior al de las bacterias. Las bacterias se miden en micrones ($1\mu\text{m} = 10^{-6}$ metros). Para los virus se utiliza una medida inferior al micrón, llamada nanómetro (nm) o milimicrón ($\text{m}\mu = 10^{-9}$ metros, equivalente a la milésima parte de un micrómetro (Negroni & González, 2018). Su tamaño varía desde 20 hasta 300 nm (Solomon et al., 2011)

Estructura

Un virus se compone de un centro de ácido nucleico, puede ser ADN o ARN. El ácido nucleico puede ser de cadena simple (cs), como el ARNcs; o de cadena doble (cd), como el ARNcd. El tipo de ácido nucleico y la estrategia de replicación son importantes para clasificar a los virus (Solomon et al., 2011).

El ácido nucleico se encuentra rodeado por un recubrimiento proteico llamado cápside, la cápside está conformada por subunidades proteicas denominadas capsómeros (Fig. 2), dependiendo su organización, los capsómeros determinan si el virus tendrá forma helicoidal o poliédrica. Además, algunas familias de virus poseen otra estructura, de composición lipoproteica, llamada envoltura. Los virus que presentan envoltura se denominan envueltos, en contraposición aquellos que carecen

de envoltura se les denomina desnudos. La envoltura es lipoprotéica, de composición similar a la de la membrana de la célula infectada, ya que los virus la adquieren de esta. La partícula viral completa con su capacidad infectante se denomina virión, que es la forma en que el virus se traslada desde la célula huésped donde fue sintetizado hasta una nueva célula huésped donde pueda replicarse (Negroni & González, 2018).

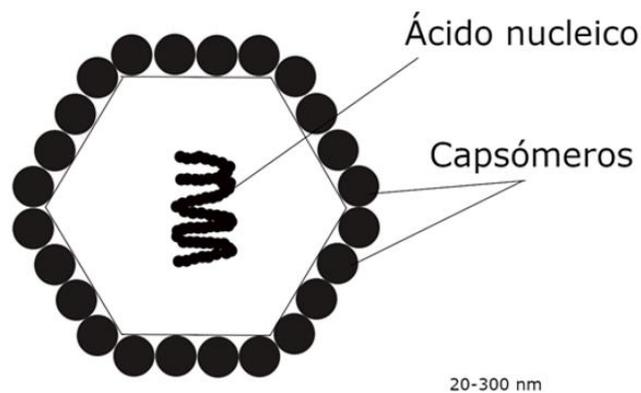


Fig. 2. Estructura general de un virus desnudo.

Parásitos intracelulares obligados

Los virus carecen de los sistemas enzimáticos productores de energía necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas indispensables para el crecimiento y multiplicación como los que poseen las células procariotas o eucariotas. Por esta razón deben necesariamente utilizar los sistemas de las células que parasitan y por ello se definen como parásitos genéticos intracelulares obligados (Ossa L, 2011).

Los virus se consideran entidades biológicas inertes, porque no están compuestos de células y no pueden realizar actividades metabólicas o reproducirse por cuenta propia. Además, carecen de los componentes necesarios para realizar respiración celular o para sintetizar proteínas y otras moléculas (Pavón, 2020). Al estudio de los virus se le denomina virología y a aquellos profesionales que estudian los virus se les denomina virólogos.

Virus transmitidos por agua

Los virus de transmisión hídrica son responsables de manifestaciones clínicas diversas, desde infecciones asintomáticas a gastroenteritis, conjuntivitis, cardiopatías, hepatitis, meningitis y encefalitis (Tabla 1). Las tasas de infección varían considerablemente de una zona a otra, según las condiciones sanitarias y socioeconómicas (García, 2006) y en un sentido más amplio, las condiciones del socioecosistema que contribuyen en mayor o menor medida a la vulnerabilidad de los individuos. Debido a su impacto en la salud humana, entre los virus más estudiados presentes en agua se encuentran los *adenovirus*, *astrovirus*, *calicivirus*, *enterovirus*, *virus de la hepatitis A*, *virus de la hepatitis E* y *rotavirus* (OMS, 2011).

Adenovirus

Clasificación y morfología: la familia *Adenoviridae* comprende los géneros *Mastadenovirus* (infecta a mamíferos) y *Aviadenovirus* (infecta a las aves). Hasta la fecha, se han descrito 51 tipos de adenovirus humanos (adH), clasificados en 6 grupos (A-F). Constan de un genoma de ADN bicatenario en una cápside icosaédrica sin envoltura, con un diámetro de 80 nm (Chapron et al., 2000).

Epidemiología: los patrones epidemiológicos varían entre los diferentes serotipos, la mayoría es responsable de infecciones respiratorias y oculares, aunque algunos pueden provocar infecciones gastrointestinales. Los adenovirus son una fuente importante de gastroenteritis infantil. En general, los lactantes y los niños son los grupos de edad más vulnerables a infecciones por adenovirus, y muchas infecciones son asintomáticas (Guerrero-Latorre et al., 2011). La dosis infectiva se estima entre 10 y 100 virones (Bellido, 2007).

Vías de contagio: el contacto entre personas es una de las principales vías de transmisión de adenovirus. Otra vía es la transmisión fecal–oral, oral–oral y por contacto mano-ojo, así como la transferencia indirecta por medio de superficies contaminadas. Aunque no hay evidencia de epidemias por contaminación por agua de bebida o alimentos, se atribuye a los adenovirus un alto porcentaje de los brotes de origen hídrico (Diesch, 2009).

Prevalencia en agua: los adenovirus se excretan en cantidades abundantes en las heces humanas y se ha comprobado su presencia en aguas residuales y en aguas de consumo tratadas en todo el mundo. Son más resistentes a la acción de la luz ultravioleta que los enterovirus, e incluso, en aguas residuales inoculadas con adenovirus se han detectado virus después de 60 días a 15° C y 4° C, que es más de lo que resisten los enterovirus (Espigares, 2006).

Astrovirus

Clasificación y morfología: los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae*. Son virus de ARN monocatenario rodeados por una cápside icosaédrica sin envoltura con 28 nm de diámetro. Se han descrito ocho serotipos de astrovirus humanos (astVH) (Nadan et al., 2003).

Epidemiología: los astVH causan gastroenteritis, sobre todo diarrea, principalmente en niños menores de cinco años, aunque también se ha notificado en adultos. La enfermedad tiene corta duración y su incidencia máxima es en invierno. Los astVH son los causantes de sólo una pequeña parte de las gastroenteritis notificadas. Sin embargo, dado que la enfermedad es normalmente leve y muchos casos no se notifican, es posible que se esté subestimando el número de infecciones (Vu et al., 2017). La dosis infectiva es baja ya que entre 10 y 100 partículas del virus pueden causar una infección (Bellido, 2007).

Vías de contagio: los astVH se transmiten por vía fecal-oral. La transmisión de persona a persona se considera la vía de transmisión más frecuente. También puede tener importancia la ingestión de agua o alimentos contaminados con materia fecal que contenga los virus (OMS, 2006).

Prevalencia en agua: las personas infectadas generalmente excretan gran cantidad de astVH en las heces, de modo que estos virus se encuentran presentes en las aguas residuales. Aunque también se han detectado astVH en fuentes de agua y en sistemas de abastecimiento de agua de consumo. Además, su morfología cambia ante un pH elevado (Vu et al., 2017).

Calicivirus

Clasificación y morfología: la familia *Caliciviridae* está formada por cuatro géneros de virus de ARN monocatenario con cápside (de 35 a 40 nm de diámetro) sin envoltura. Los calicivirus humanos (CVH) incluyen los géneros *Norovirus* y *Sapovirus* (Blanton et al., 2006).

Epidemiología: los CVH son una de las causas principales de gastroenteritis vírica aguda en todos los grupos de edad. Los síntomas incluyen náuseas, vómitos y cólicos. Habitualmente, alrededor del 40% de las personas infectadas presentan diarrea; algunas tienen fiebre, escalofríos, cefalea y mialgias, y algunos enfermos presentan sólo vómitos, pero no diarrea. La enfermedad se conoce también como «enfermedad de los vómitos de invierno». Los síntomas suelen ser relativamente leves y rara vez duran más de tres días (Blanton et al., 2006). Su dosis infectiva es muy baja, ya que se calcula que 10 partículas víricas son suficientes para causar una infección (Fernández-Gómez, 2010).

Vías de contagio: las vías de transmisión más frecuentes son el contacto persona a persona y la inhalación de partículas de polvo y aerosoles contaminados, así como de partículas de vómito transportadas por el aire. Se han confirmado como fuentes importantes de exposición el agua de consumo y una gran variedad de alimentos con contaminación fecal humana. También se han asociado numerosos brotes con diversas fuentes de aguas contaminadas, como agua de consumo, hielo y aguas recreativas (Montero, 2015).

Prevalencia en agua: los CVH se excretan en las heces de las personas infectadas, por lo que estarán presentes en aguas residuales domésticas y en alimentos y agua con contaminación fecal (OMS, 2006).

Enterovirus

Clasificación y morfología: el género *Enterovirus*, perteneciente a la familia *Picornaviridae*, comprende 69 serotipos que infectan al ser humano. Constan de un genoma de ARN

monocatenario rodeado por una cápside icosaédrica sin envoltura con un diámetro de 20 a 30 nm. Los enterovirus se localizan entre los virus más pequeños conocidos (Grabow et al., 2007).

Epidemiología: los enterovirus son una de las causas más frecuentes de infecciones virales humanas. Se ha calculado que causan cerca de 30 millones de infecciones al año en los Estados Unidos de América (E.U.A). El espectro de enfermedades causadas por los enterovirus es amplio y varía desde fiebre leve hasta miocarditis, meningoencefalitis, poliomielitis, herpangina, exantema vírico de manos, pies y boca e insuficiencia multiorgánica neonatal. Se ha descrito la persistencia de los virus en enfermedades crónicas como la polimiositis, la miocardiopatía dilatada y el síndrome de fatiga crónica (OMS, 2011). Bastan dosis de una sola unidad infecciosa de enterovirus para inducir una infección en un adulto (WHO, 1979).

Vías de contagio: entre las principales vías de transmisión se encuentra el contacto entre personas, la inhalación de virus transportados por el aire y el consumo de agua contaminada por heces humanas (Bracho, 2008).

Prevalencia en agua: las personas infectadas por enterovirus los excretan en las heces. De los tipos de virus detectables mediante técnicas convencionales de aislamiento en cultivo celular, los enterovirus son, por lo general, los que se encuentran en mayor abundancia en aguas residuales, recursos hídricos y aguas de consumo tratadas (OMS, 2011).

Virus de la hepatitis A

Clasificación y morfología: el virus de la hepatitis A (VHA) es la única especie del género *Hepatitisvirus*, familia *Picornaviridae*. Constan de un genoma de ARN monocatenario rodeado por una cápside icosaédrica sin envoltura con un diámetro de 20 a 30 nm (Saiz, 2007).

Epidemiología: El virus causa la hepatitis A, también llamada «hepatitis infecciosa» es muy contagioso. Se ha reportado que la gravedad de la enfermedad aumenta con la edad y después de un periodo de incubación de 28 a 30 días, la enfermedad se manifiesta con síntomas como fiebre, decaimiento, náuseas, anorexia, molestias abdominales y, finalmente, ictericia (OMS, 2011). Si bien la dosis infectante exacta del virus de la Hepatitis A es desconocida, ésta se presume baja, entre 10 y 100 partículas virales (Gust, 1992).

Vías de contagio: la vía de transmisión más común es de persona a persona, pero los alimentos y el agua contaminados con heces humanas, son fuentes de infección importantes. Las pruebas epidemiológicas de la transmisión por el agua del VHA son más concluyentes que las correspondientes a cualquier otro virus. Las personas que viajan de zonas con buen saneamiento a zonas con saneamiento deficiente se exponen a un riesgo de infección elevado (OMS, 2006).

Prevalencia en agua: el VHA se excreta en la materia fecal de las personas infectadas. En zonas con saneamiento deficiente los niños a menudo se infectan a una edad muy temprana y adquieren inmunidad permanente sin manifestar síntomas clínicos de la enfermedad. En zonas con un buen saneamiento la infección tiende a producirse en etapas posteriores de la vida (Cuthbert, 2001).

Virus de la hepatitis E

Clasificación y morfología: el *Virus de la hepatitis E* (VHE) pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, del género *Orthohepadnavirus*. El genoma del VHE es de ARN monocatenario, en una cápside icosaédrica sin envoltura de unos 27 a 34 nm de diámetro (OMS, 2011).

Epidemiología: el VHE causa hepatitis, similar en muchos aspectos a la causada por el VHA. No obstante, el periodo de incubación tiende a ser más largo (40 días en promedio). El VHE es endémico y ocasiona enfermedades clínicas en ciertas partes del mundo en desarrollo, como la India, Nepal, Asia central, México y partes de África (OMS, 2011). La dosis infectante exacta del virus de la Hepatitis E es desconocida, sin embargo, se ha reportado que este virus requiere una mayor dosis infectiva que la requerida para la transmisión del VHA, aproximadamente 250 partículas infecciosas (Dreier et al., 2018).

Vías de contagio: en un bajo porcentaje de casos, se ha notificado la transmisión secundaria del VHE mediante el contacto persona–persona. La baja tasa de transmisión entre personas sugiere que el agua contaminada fecalmente tiene un papel importante en la transmisión del VHE. Los reservorios animales también pueden servir como vías de exposición (Vidal et al., 2020).

Prevalencia en agua: el VHE se excreta en las heces de las personas infectadas y se ha detectado en aguas residuales, sin tratar y tratadas. La característica distintiva del VHE es que es el único virus entérico con un reservorio significativo en animales, incluidos los domésticos, en particular el ganado porcino, también el vacuno y el caprino, e incluso en roedores (Peláez et al., 2016).

Rotavirus

Clasificación y morfología: el genoma de las especies del género *Rotavirus* es de ARN bicatenario segmentado, contenido en una cápside icosaédrica sin envoltura con 50 a 65 nm de diámetro rodeada por una capa doble que confiere al virus aspecto de rueda, de ahí el nombre rotavirus. El virus completo tiene unos 80 nm de diámetro. El género *Rotavirus*, se encuentra en la familia *Reoviridae*; y es dividido en siete grupos serológicos (A-G). Los grupos A-C infectan humanos, siendo los del grupo A los agentes patógenos más importantes (Baggi & Peduzzi, 2007).

Epidemiología: los rotavirus humanos (RVH) son la principal causa de mortalidad infantil en el mundo. Típicamente, 50 a 60% de los niños hospitalizados con gastroenteritis aguda están infectados por rotavirus humanos. La infección aguda se manifiesta repentinamente con una diarrea acuosa intensa, acompañada de fiebre, dolor abdominal y vómitos; pueden producirse deshidratación y acidosis metabólica, y si la infección no se trata adecuadamente puede ser mortal. (Peláez et al., 2016). La dosis infectante mínima parece ser de 10 a 100 partículas virales, y como una persona con diarrea por rotavirus frecuentemente excreta un número elevado de virus (10^8 a 1.0^{10} partículas infectantes/ml de heces), esa dosis puede ser fácilmente adquirida a través de manos, objetos o utensilios contaminados (WHO, 2011).

Vías de contagio: se transmiten por la vía fecal-oral. Se ha reportado que la transmisión de persona a persona e inhalación de rotavirus humanos atmosféricos son mucho más importantes que la ingestión de agua o alimentos contaminados. Sin embargo, se han descrito brotes ocasionales de origen hídrico o alimentario (OMS, 2006).

Prevalencia en agua: los enfermos excretan rotavirus humanos en concentraciones de hasta 10^{11} virus por gramo de heces durante periodos de 8 días. Los virus han sido detectados en aguas residuales, ríos, lagos y agua de consumo humano potabilizada. Son estables a pH ácido y mantienen su infectividad meses a temperaturas entre 4° y 20°C (OMS, 2011).

Tabla 1. Características de los principales virus en agua

Virus	Clasificación y morfología	Epidemiología	Vías de contagio	Prevalencia en agua
Adenovirus	Familia: Adenoviridae Géneros: Mastadenovirus y Aviadenovirus. Serotipos de adH: 51 Genoma de ADN bicatenario, cápside icosaédrica sin envoltura de 80 nm.	Infecciones respiratorias, oculares y gastrointestinales.	Contacto persona - persona, vía fecal-oral, oral-oral. Agua y superficies contaminadas	Aguas residuales y de consumo.
Astrovirus	Familia: Astroviridae Género: Astrovirus Serotipos de astVH: 8 Genoma de ARN monocatenario, cápside icosaédrica sin envoltura de 28 nm.	Gastroenteritis, principalmente en niños.	Contacto persona- persona, vía fecal-oral. Agua y alimentos contaminados.	Aguas residuales y de consumo.
Calicivirus	Familia: Caliciviridae Géneros: Norovirus y Sapovirus. Genoma de ARN monocatenario, cápside sin envoltura de 35 a 40 nm.	Gastroenteritis aguda en todos los grupos de edad.	Contacto persona- persona, inhalación de partículas de polvo y aerosoles contaminados. Alimentos y agua contaminada	Aguas residuales y de consumo.
Enterovirus	Familia Picornaviridae. Género: Enterovirus Serotipos: 69 Genoma de ARN monocatenario, cápside icosaédrica sin envoltura, de 20 a 30 nm.	Desde fiebre leve hasta miocarditis, meningoencefalitis, poliomielitis e insuficiencia multiorgánica neonatal.	Contacto persona- persona, inhalación de virus en el aire y consumo de agua contaminada	Aguas residuales y de consumo.
Virus de la hepatitis A	Familia: Picornaviridae. Género: Hepatovirus Genoma de ARN monocatenario, cápside icosaédrica sin envoltura de 20 a 30 nm.	Hepatitis A	Contacto persona- persona. Agua y alimentos contaminados.	Aguas residuales y de consumo.
Virus de la hepatitis E	Familia: Hepadnaviridae, Género: Orthohepa- dnavirus. Genoma de ARN monocatenario, cápside icosaédrica sin envoltura de 27 a 34 nm.	Hepatitis E	Contacto persona- persona. Agua contaminada	Aguas residuales y de consumo.
Rotavirus	Familia: Reoviridae Género: Rotavirus Serotipos: 3 Genoma de ARN bicatenario segmentado, cápside icosaédrica sin envoltura, de 80 nm.	Gastroenteritis aguda, principalmente en niños	Contacto persona- persona, vía fecal-oral, inhalación de rotavirus atmosféricos. Agua y alimentos contaminados.	Aguas residuales y de consumo.

Los patógenos virales difieren de las bacterias transmitidas por agua o alimentos en que son inertes en el ambiente, no se replican en agua, alimentos o ambiente; son estables y resistentes a la mayoría de los métodos tradicionales utilizados para el control bacteriano, pues en general, sobreviven en agua no clorada a 4° C por un periodo de entre 30 y 90 días. Además, tienen dosis infecciosas notablemente bajas, la mayoría necesita tan solo entre 10 y 100 partículas infecciosas para enfermar a un adulto (Betancourt et al., 2006).

Salud Pública

En la mayoría de los países todavía predominan los peligros para la Salud Pública que guardan relación con el medio ambiente, como alimentos y aguas insalubres, contaminación microbiana del ambiente y en general, saneamiento deficiente (OMS, 2011). El aumento de la población y su concentración en las ciudades se han traducido en una presión cada vez mayor sobre los recursos naturales, incluyendo el abastecimiento de agua potable a la población, además de dificultar la evaluación apropiada de aguas residuales, excretas y residuos sólidos. Estas condiciones favorecen la alta incidencia de enfermedades diarreicas y epidemias (Espinosa-García et al., 2004).

El agua como primer recurso de supervivencia y salud debe cumplir con un saneamiento eficiente y gestionarse adecuadamente. Los estudios de rutina de calidad microbiológica se limitan al control bacteriológico sin tener en cuenta la importancia de los virus transmitidos por agua como causa de enfermedad esporádica o epidémica, la resistencia viral a la mayoría de los tratamientos convencionales usados en agua para consumo o en aguas residuales y su persistencia en condiciones extremas en el ambiente (Orozco, 2009).

Impacto ambiental

Se plantea por numerosos autores y expertos en el tema, que los factores ambientales, como la calidad del aire y del agua, son clave en la salud humana (Romero, 2007). Investigaciones sobre el impacto que tienen los factores ambientales en los individuos y las poblaciones, ha demostrado que la interacción de elementos naturales y sociales juega un papel importante en problemas de salud y el incremento o reducción de la morbimortalidad para enfermedades transmisibles como la hepatitis, el dengue, la fiebre tifoidea, la tuberculosis, la leptospirosis y la malaria, entre otras, y no transmisibles como el cáncer, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las cardiopatías y las enfermedades cerebrovasculares (Salas-Plata Mendoza, 2006).

Sin lugar a duda, la salud humana depende de la voluntad y la capacidad de una sociedad para mejorar la interacción entre la actividad humana y el ambiente químico, físico y biológico. Pues se estima que en países industrializados un 20 % de la incidencia total de enfermedades puede atribuirse a factores medioambientales (Hidalgo, 2010). Aunado a esto, la sobreexplotación de recursos y el inadecuado manejo de residuos, han favorecido el brote de nuevas enfermedades, muchas de ellas virales (Medina, 2010).

Normatividad

Con el fin de asegurar agua de calidad para la población y cuidar el ambiente, En la agenda 2030 de la Organización de las Naciones Unidas en su objetivo No. 6 sienta las bases para garantizar la disponibilidad, saneamiento y gestión del agua para todos (ONU, 2018). En México, la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos el Artículo 4 menciona que toda persona

tiene derecho al acceso, disposición y saneamiento de agua para consumo personal y doméstico en forma suficiente, salubre, aceptable y asequible (Constitución Política De los Estados Unidos Mexicanos, 2021).

Además, existen Normas Oficiales Mexicanas enfocadas a la vigilancia y gestión del agua, como la NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Esta Norma Oficial Mexicana establece los límites permisibles de calidad y los tratamientos de potabilización del agua para uso y consumo, que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados o cualquier persona física o moral que la distribuya, en todo el territorio nacional.

La NOM -014-SSA- 2009 "Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados". Ofrece una guía detallada para el muestreo de agua para uso y consumo humano en los elementos de un sistema de abastecimiento públicos y privados, incluyendo aspectos bacteriológicos y fisicoquímicos, así como criterios para manejo, preservación y transporte de muestras. Mientras que la NMX-A-A-3-1980 "Aguas residuales- muestreo", anteriormente NOM-AA-3-1975. Establece los lineamientos generales y recomendaciones para muestrear las descargas de aguas residuales, con el fin de determinar sus características físicas y químicas.

Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana NOM-030-STPS-2009 "Servicios preventivos de seguridad y salud en el trabajo-Funciones y actividades". Establece las funciones y actividades que deberán realizar los servicios preventivos de seguridad y salud para prevenir accidentes y

enfermedades de trabajo. En el apartado 5.6, se menciona que el responsable de seguridad y salud en el trabajo debe: “Establecer los procedimientos, instructivos, guías o registros necesarios para dar cumplimiento al programa de seguridad y salud o a la relación de acciones preventivas y correctivas de seguridad y salud en el trabajo” (DOF, 2007).

Bioseguridad

Se define como bioseguridad al conjunto de normas diseñadas para la protección del individuo, de la comunidad y del ambiente contra el contacto accidental con patógenos biológicos, químicos o elementos radiactivos (Escalona et al., 2019). El tema de bioseguridad es bastante complejo, pues comprende aspectos como: niveles de seguridad, clasificación de agentes por grupo de riesgo, equipo de protección personal (barrera primaria), instalaciones (barrera secundaria), capacitación del personal, manejo de residuos peligrosos, señalización y código de colores, desinfección, esterilización y planes de contingencia (Murray et al., 2018).

Los laboratorios microbiológicos son lugares de trabajo que presentan riesgos identificables de contagio de infecciones a personas que trabajan dentro o cerca de ellos. La identificación del virus del VIH significó un estímulo para la aplicación de manuales de laboratorio que trataran sobre medidas de seguridad para el personal dentro del laboratorio. La OMS publicó en 1983 la primera edición del manual de Bioseguridad en el laboratorio, en donde se plasman lineamientos y normas generales específicos para cada uno de los 4 niveles de bioseguridad (García Rubio & Santiago Rodríguez, 2020). Todos los virus capaces de infectar al humano deben ser manipulados a un nivel 2 o mayor de seguridad, los virus de otras especies animales deben ser también manipulados a estos niveles, ya que en ocasiones pueden infectar y causar alguna patología en humanos, zoonosis (Allende et al., 2008). A continuación, se menciona la clasificación correspondiente a virus,

específicamente aquellos que se encuentran en agua, así como el equipo de seguridad que se requiere para cada grupo.

Grupo de riesgo 1: Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales. Equipo de seguridad: Bata, cubrebocas y guantes.

Grupo de riesgo 2: Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para la población o el medio ambiente. En este grupo se incluye a los adenovirus, astrovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E y rotavirus. Equipo de seguridad: Bata, cubrebocas y guantes.

Grupo de riesgo 3: Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de manera usual no se propagan de un individuo a otro. Equipo de seguridad: Bata, cubrebocas y guantes, medios de contención primaria.

Grupo de riesgo 4: Agentes causantes de enfermedades humanas serias o letales, para las cuales normalmente no hay disponibles medidas preventivas y/o terapéuticas. El contagio entre individuos infectados se da fácilmente (alto riesgo individual, alto riesgo a la comunidad) (Lara et al., 2007). Equipo de seguridad: batas o traje de una sola pieza, guantes, mascarillas o respirador y gafas protectoras.

No obstante, los lineamientos existentes se centran en el trabajo que se realiza dentro del laboratorio y muchas veces se omiten los procedimientos de bioseguridad para la etapa pre-analítica (Botto, 2005) que no solo protege al personal involucrado sino también la integridad de las muestras. Por lo cual, con el fin de crear un ambiente de trabajo más seguro y saludable para laboratoristas, personal de apoyo y comunidad en general, así como proteger la integridad de las muestras de agua para análisis virológico, en el presente trabajo, se incluyen las medidas que deben tomarse en cuenta para la protección del individuo contra el contacto accidental con patógenos virales y la obtención de muestras ambientales de agua confiables.

JUSTIFICACIÓN

Conocer la calidad del agua es importante para comprender mejor los problemas de infecciones por ingesta de agua contaminada, contaminación de ecosistemas y tratamiento de agua (Guerrero, 2019). Para determinar la calidad del agua se realizan análisis cuantitativos de parámetros fisicoquímicos y de microorganismos y virus en el laboratorio (Pedret et al., 2007).

En su mayoría, los microorganismos y virus de ambientes acuáticos son poco conocidos para el público, excepto en el contexto de patogenicidad o descomposición de alimentos (Pace, 1997). Aun cuando expertos en microbiología han descubierto que los ecosistemas acuáticos poseen una diversidad microbiológica y viral mayor a todas las especies de plantas y animales descritas hasta el momento. En particular, la abundancia de virus en agua es de 5 a 25 veces la abundancia de bacterias, lo que coloca a los virus como los agentes infecciosos más abundantes y, según Fuhrman (1999) más diversos del mundo. Es por esto por lo que el presente manual se enfoca a la detección de virus en sistemas acuáticos, haciendo énfasis en los virus entéricos que representan un riesgo para la salud pública.

Para la detección de virus en agua, antes de ser procesada en el laboratorio y dependiendo del tipo de análisis al que será sometida, la muestra de agua usualmente pasa por una fase pre-analítica que contempla acciones como: condiciones de colecta, fijación, almacenaje, condiciones de transporte y concentración. Es muy importante que cada uno de los pasos involucrados en la fase preanalítica se realice de la manera adecuada, pues se ha reportado que entre 46 y 68.2% del total de errores en el proceso del laboratorio son debidos a un mal manejo de la muestra (Donayre et al., 2013).

Resultados erróneos pueden afectar las decisiones que se tomen en torno a la salud de la población, de los ecosistemas y, por ende, también al sector económico.

En México, los protocolos para la toma, transporte, almacenaje y concentración de muestras ambientales de virus en agua son escasos, debido principalmente a que la virología se enfoca al análisis en laboratorio y al desarrollo de vacunas, no al manejo previo de la muestra (Trujillo et al., 2017). Esta falta de protocolos para la fase pre-analítica, al tratarse de virus, puede exponer la salud del personal involucrado en el manejo de la muestra. Por todo lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de crear un manual sobre la toma, transporte, almacenaje y concentración de muestras que pueda ser utilizado en México para aquellos que pretenden incursionar en el campo de la virología ambiental.

OBJETIVOS

General

Integrar un manual que establezca las bases para la fase pre-analítica del análisis de virus en muestras de agua: toma, transporte, almacenaje y concentración de muestras, para asegurar la integridad de la muestra y la confianza en los resultados

Particulares

- Establecer la relevancia de la virología ambiental ante las condiciones actuales de deterioro ambiental.
- Describir protocolos de bioseguridad y normatividad existente respecto al tema.
- Describir el equipo para la colecta de muestras y condiciones para su esterilización.
- Describir el proceso para la toma de muestras de agua.
- Definir las condiciones para el transporte y almacenaje de muestras.
- Describir los principales métodos utilizados para la concentración de virus en agua.

DESARROLLO

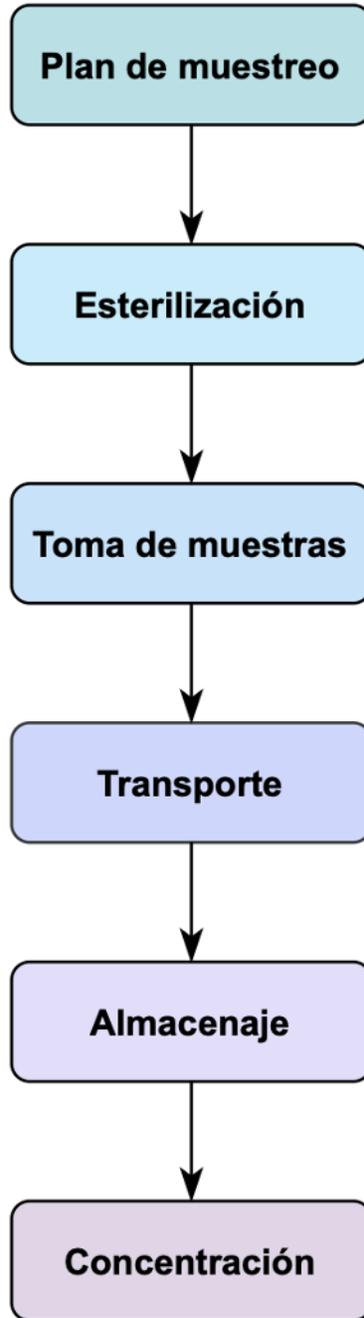
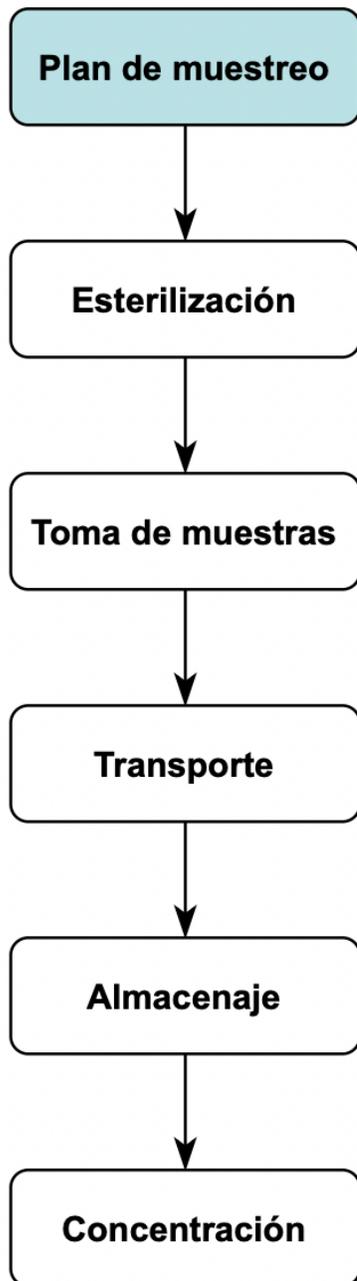


Fig. 3. Etapas descritas en el manual para la toma y procesamiento de muestras de agua hasta su concentración.



Previo al muestreo

Definir el plan de muestreo. Cuando se trate de un sitio de muestreo nuevo, se recopilará toda la información posible del área antes de realizar el trabajo. Si es posible incluir croquis, mapa o dibujo del sitio con el fin de ejecutar el muestreo de la forma más adecuada (Otzen & Manterola, 2017). Es importante que se tramiten los permisos con las autoridades en caso de ser necesarios, si se trabajará con una institución pública, por ejemplo, para evitar complicaciones durante la toma de muestras.

Determinar la fuente de agua. Los virus mencionados en la tabla 1 se pueden encontrar en diferentes fuentes de agua. Cualquier tipo de agua puede ser considerada fuente de agua para la obtención de muestras. Para fines de este manual, el agua se clasificará, con base en su origen, como agua subterránea, superficial y residual.

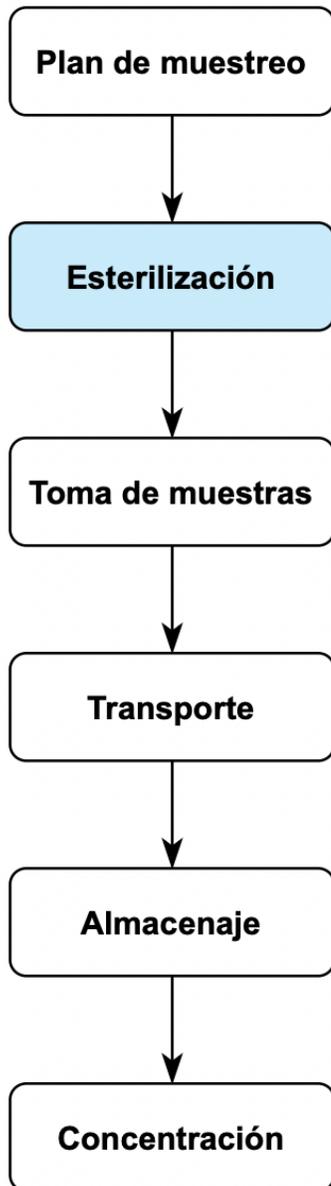
Entendiendo como agua subterránea aquella que se encuentra bajo la superficie del suelo. Como agua superficial a la cual se encuentra circulando o en reposo sobre la superficie de la tierra; comprendiendo dentro de esta definición a los ríos, lagos, lagunas, humedales, estuarios, océanos y mares. Y como agua residual aquella de composición variada proveniente de usos municipal, industrial, comercial, agrícola, pecuario o de cualquier otra índole, ya sea pública o privada y que por tal motivo haya sufrido degradación o alteración en su calidad original; incluyendo plantas de tratamiento de aguas residuales y/o domésticas, puntos de descarga internos o externos de industrias y redes de alcantarillado (DOF, 1992).

Seleccionar los puntos de muestreo. La selección de puntos de muestreo debe considerarse individualmente para cada cuerpo de agua, fuente de abastecimiento o sistema de distribución que sea de interés. Sin embargo, existen criterios generales que deben tomarse en cuenta para ello. Los puntos de muestreo deben ser representativos considerando los lugares más susceptibles de contaminación o puntos con antecedentes de problemas de contaminación; puntos con fugas frecuentes, densamente pobladas o más alejadas de las instalaciones de potabilización, así como sitios donde la influencia humana sea baja o nula. Considerando siempre una distribución uniforme de los puntos de muestreo a lo largo del sistema (DOF, 1992).

Determinar el tipo de muestra. La vigilancia de la calidad el agua se basa en la toma y análisis de muestras puntuales y compuestas. Una muestra puntual es aquella que se toma en un momento determinado, resulta adecuada para informar de la calidad del agua en un momento específico. Mientras que las muestras compuestas se preparan mezclando varias muestras puntuales o mediante la recolección de una fracción continua de la descarga o cuerpo de agua o sistema a

muestrear; las porciones individuales se recogen a intervalos de tiempo previamente establecidos. El tipo (puntual o compuesta) y número de muestras a recolectar y los parámetros a determinar en cada una de ellas, determinarán los contenedores (número y características) y equipos de medición y muestreo necesarios (Arraiza et al., 2009).

Equipo de muestreo. Las generalidades para una correcta toma de muestra incluyen: contar con todo el material necesario previamente esterilizado, verificar que las tapas de los contenedores sean herméticas para evitar derrames, realizar un adecuado lavado de manos, utilizar guantes estériles, y rotular los contenedores con los datos correspondientes al lugar, fecha y hora de la toma de muestra (Botto, 2005). Es posible que se necesite una variedad de aparatos de muestreo para detectar virus en aguas ambientales. Estos incluyen frascos, botellas, baldes, bidones, bombas, filtros de cartucho y sus soportes, y mangueras. Si es necesario almacenar muestras de gran volumen (5 L o más), incluso un bote de basura nuevo de plástico esterilizado con una tapa hermética se puede usar como recipiente de almacenamiento de agua (López Casas et al., 2011). Es preferible que los recipientes utilizados para las muestras de agua sean de polipropileno, ya que puede reducir la adsorción de las partículas virales a las paredes del recipiente (Moore et al., 1981). Alternativamente, se sugiere que el aparato esté hecho de acero inoxidable, latón o un polímero químicamente resistente. Esto ayuda en términos de robustez para uso en operaciones de campo, facilidad de limpieza y resistencia a la corrosión química que puede ser causada por sal o pH extremos (Hurst et al., 2007). En el mercado existe una amplia diversidad en cuanto a volumen de contenedores de polipropileno.



Esterilización de material de colecta

Se define esterilización como aquel procedimiento que logra la ausencia total de microorganismos viables, ya sea por calor, adición de ciertos químicos, exposición a radiación, entre otras técnicas. Es de vital importancia que todo el material que se utilice durante cualquier procedimiento en el laboratorio de microbiología se encuentre esterilizado antes y cuidar que permanezca así hasta que sea usado (Mitchell & Gu, 2010). Existen diversos agentes (temperatura, luz ultravioleta, pH, medio iónico y solventes lipídicos), que pueden actuar sobre los constituyentes del virus produciendo su inactivación (Hurst et al., 2007). Las formas más comunes para esterilización de material en laboratorios de microbiología se describen a continuación:

1. En estufa de esterilización: mantener el material a 200°C durante 1 hora; 180°C durante 1 ½ hora o 160°C durante 2 horas.
2. En la autoclave las condiciones de esterilización son: 120°C durante 20 minutos a 1,1 atmósferas o 15 lb/pulg².

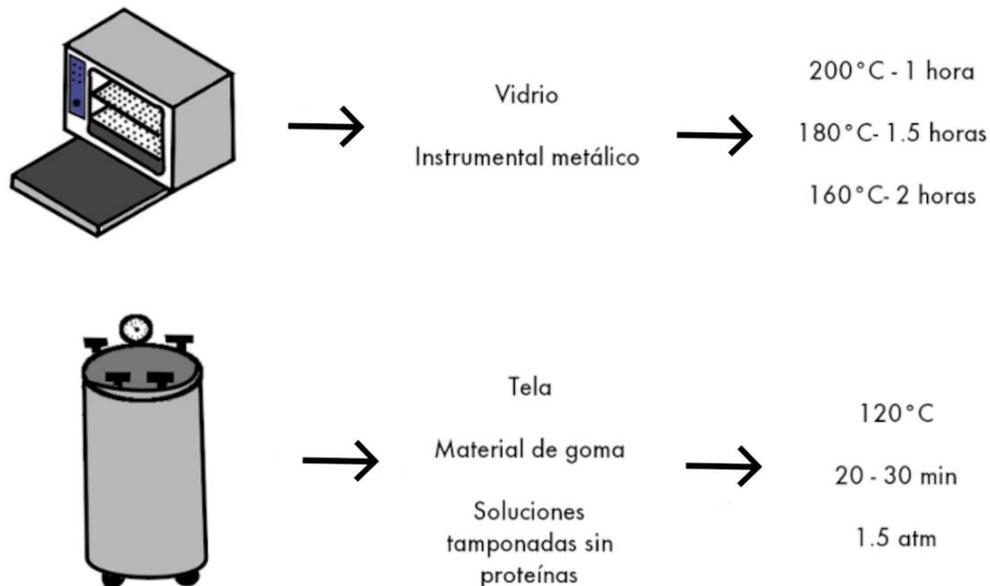


Fig 4. Proceso de esterilización en laboratorio para instrumental utilizado en el análisis de agua.

El método por elegir depende del material a esterilizar; para ropa, material de goma y soluciones tamponadas sin proteínas debe utilizarse la autoclave, ya que esos elementos no resisten el calor seco de la estufa. Para aquellos materiales que resisten el calor (vidrio, instrumental metálico) puede emplearse la estufa de esterilización o la autoclave. Antes de esterilizar cualquier material se debe asegurar que el producto es esterilizable (y que puede introducirse en la autoclave), esa información se obtiene del fabricante. En materiales que no resisten el calor (plásticos principalmente) se utiliza el óxido de etileno o la radiación ionizante (Hurst et al., 2007).

Esterilización en campo

Si se requiere esterilizar contenedores en campo, la opción más sencilla es sumergir los contenedores en agua limpia y dejar hervir. Si por algún motivo es imposible llevar a cabo esta acción, a continuación, se describe un proceso alternativo en el que se utiliza un agente químico que, de acuerdo con el tiempo de exposición, asegura que no permanezcan microorganismos viables en el contenedor de muestreo o materiales que se requieran (Hurst et al., 2007).

Contenedores

1. Llenar el recipiente completamente con agua limpia (sin turbidez evidente) y agregar una solución de hipoclorito de calcio al 0.5% al agua a una tasa de 3.8 ml por galón. Una solución al 10% de blanqueador líquido doméstico estándar (vendido como 5.25% de hipoclorito de sodio en peso) se puede utilizar como sustituto de la solución de hipoclorito de calcio.
2. Mezclar completamente la solución de hipoclorito con el agua y dejar que el agua permanezca en el recipiente de almacenamiento durante al menos 15 minutos.
3. Vaciar el agua del recipiente de almacenamiento, y enjuagar el recipiente a fondo con agua limpia, posteriormente, llenar completamente con agua limpia.
4. Agregar una solución estéril de tiosulfato de sodio al 50% a este segundo llenado de agua a una razón de 10 mL por galón.
5. Mezclar la solución de tiosulfato de sodio con el agua y dejar en el recipiente de almacenamiento durante al menos 5 minutos.
6. Finalmente, vaciar el recipiente y llenar con la muestra de agua prevista.

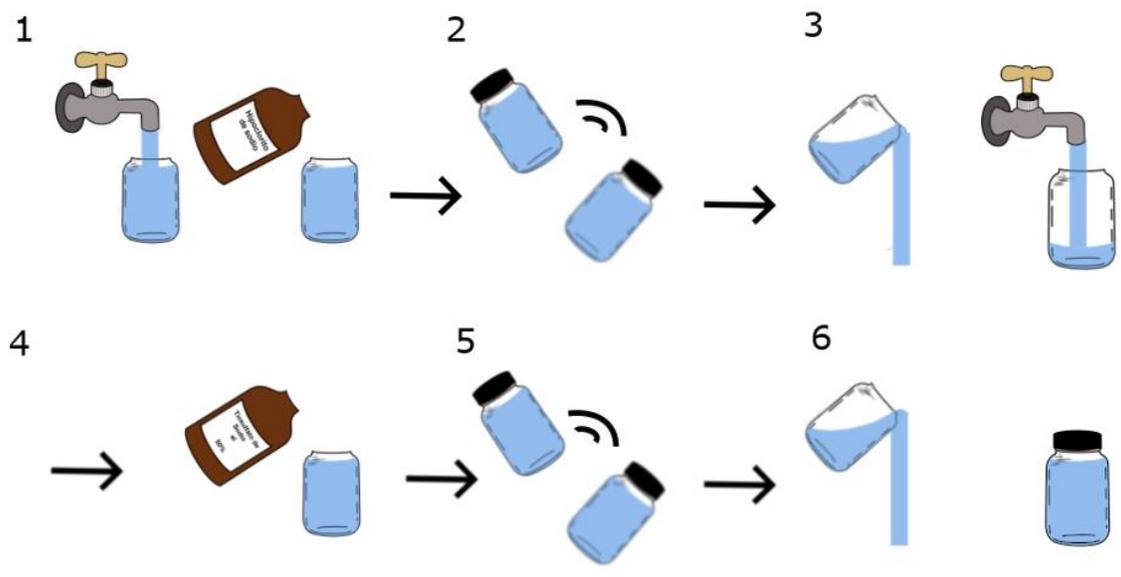
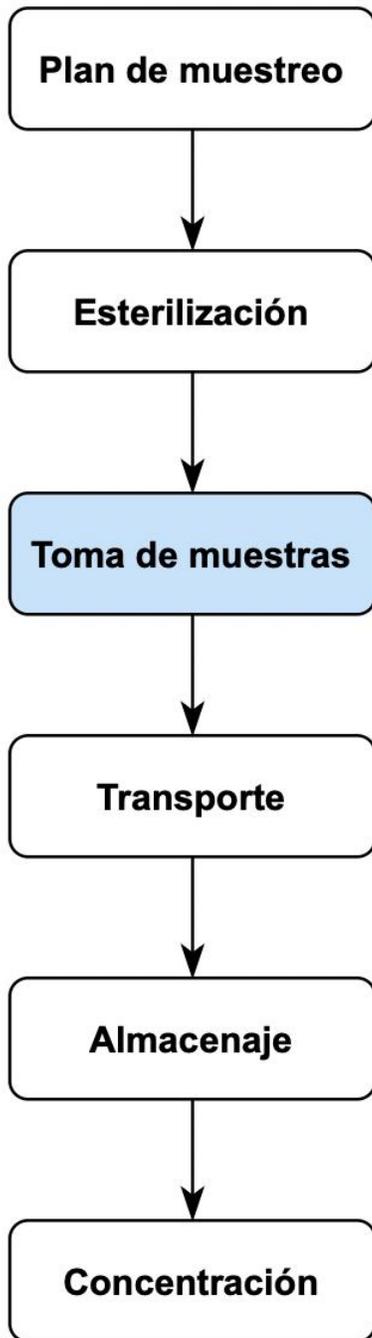


Fig. 5. Técnica de esterilización de contenedores en campo para la toma de muestras de agua en un grifo.



Toma de muestras

El muestreo ambiental es el primer paso para evaluar las características de un ecosistema a través de la medición de parámetros fisicoquímicos y biológicos (Cashdollar & Wymer, 2013). Previo a un muestreo es importante tener definida la forma como serán tomadas las muestras, teniendo en cuenta el presupuesto, el personal con que se cuenta, la capacitación del personal, el transporte, los costos de inversión, los costos de operación y mantenimiento, la vida útil de los equipos, los requerimientos de energía, espacio y la disponibilidad de los mismos, entre otros (Alberto et al., 2013).

Toma de muestra de agua de un grifo.

Siguiendo lo indicado por la NOM -014-SSA 1. “Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados”. Es importante que el agua de los grifos provenga directamente del sistema de distribución. No debe efectuarse toma de muestra en grifos que presenten fugas, ya que el agua puede correr por la parte exterior del grifo y contaminar la muestra. De ser posible, deben removerse los accesorios o aditamentos externos como mangueras, boquillas y filtros de plástico o hule antes de tomar la muestra. Si se requiere tomar muestras de agua de un pozo profundo, se utiliza una tubería de desfogue y se utiliza el procedimiento descrito a continuación.

1. Limpiar el orificio de salida con una torunda de algodón impregnada de solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/L.
2. Dejar correr el agua de 3 a 5 min para asegurar que el agua estancada que contenían las tuberías ha sido removida.
3. Cerca del orificio de salida, quitar la tapa del frasco, mantener la tapa hacia abajo para evitar contaminación.
4. Tomar la muestra lo antes posible y sin enjuagar el frasco; dejar el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (aproximadamente 10% de volumen del frasco) y colocar la tapa al contenedor.

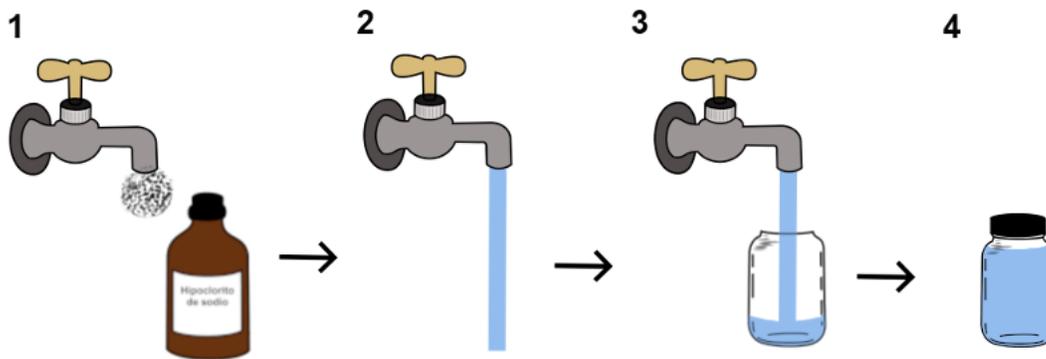


Fig. 6. Procedimiento para la toma de muestras de agua de un grifo

Toma de muestra de un cuerpo de agua superficial

1. Lavar manos y antebrazos con agua y jabón.
2. Sumergir el frasco en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 30 cm, abrir y enderezar el cuello hacia arriba. En todos los casos debe evitarse tomar la muestra de la capa superficial o del fondo, donde puede haber sedimento y en el caso de captación en cuerpos de agua superficiales, no deben tomarse muestras muy próximas a la orilla o muy distantes del punto de extracción; si existe corriente en el cuerpo de agua, la toma de muestra debe efectuarse con la boca del frasco en contracorriente.
3. Sacar el frasco del agua y colocar la tapa.

Con el objeto de conocer las variaciones de las condiciones particulares del cuerpo receptor, y si las condiciones del estudio lo permiten, se recomienda establecer un ciclo anual de muestreo que cubra las épocas de precipitación pluvial y estiaje (DOF 1992). Esto dependiendo del objetivo de estudio.

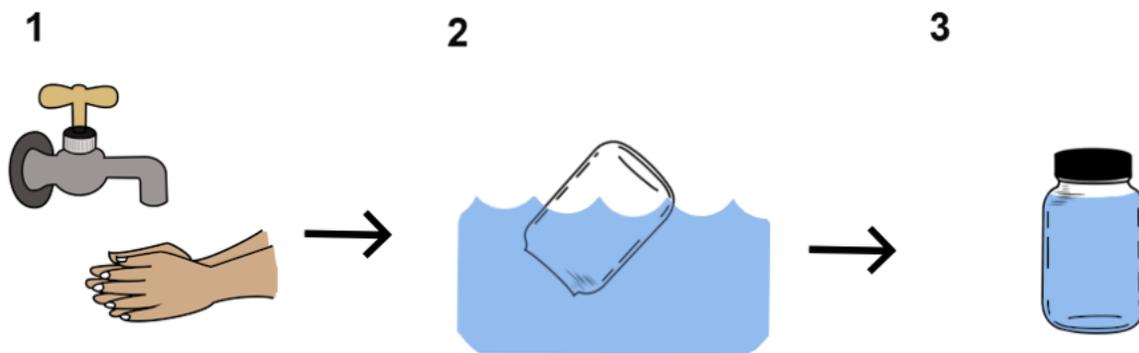


Fig. 7. Procedimiento para la toma de muestras de agua superficial o tanque de almacenamiento.

Toma de muestras de aguas residuales

Muestreo en puntos de descarga de agua residual

Ubicar la toma, de preferencia en un punto con buena presión y que permita el fácil acceso al muestreo.

1. Dejar fluir un volumen igual a 10 veces el volumen de la muestra.
2. Cerca del orificio de salida, quitar la tapa del frasco, mantener la tapa hacia abajo para evitar contaminación y proceder a la toma de muestra lo antes posible y sin enjuagar el frasco; dejar el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (aproximadamente 10% de volumen del frasco).
3. Colocar la tapa al contenedor.

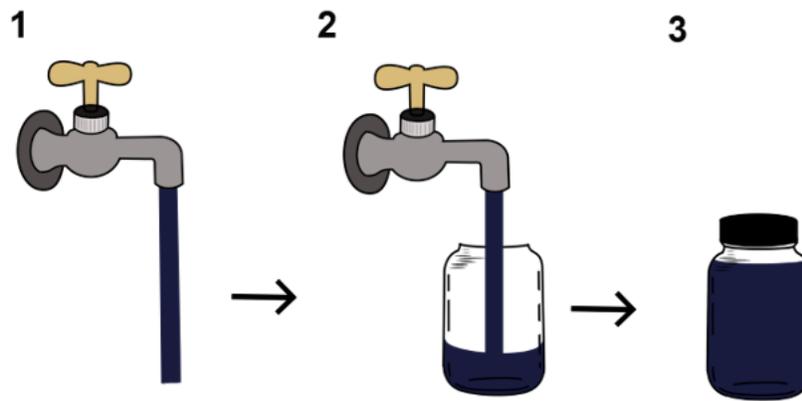


Fig. 8. Procedimiento para muestreo en tomas de aguas residuales

Colecta en puntos de descarga de agua residual

1. Enjuagar repetidas veces el recipiente muestreador e introducirlo en la descarga.
2. Transferir la muestra con el recipiente muestreador.
3. Transferir la muestra del recipiente muestreador al recipiente para la muestra.



Fig. 9. Procedimiento para muestreo en aguas residuales en forma de chorro

Controles

Para efectuar el seguimiento analítico de las condiciones de las muestras durante los procesos de almacenamiento y transporte, se llevan a los sitios de muestreo seleccionados los siguientes controles:

- *Testigo*: solución de concentración conocida del analito de interés; su función es soportar y hacer seguimiento de las condiciones de transporte, preservación y almacenamiento de las muestras.
- *Blanco*: muestra que no contiene el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de muestreo y análisis, y debe ser sometido a las mismas condiciones y al mismo procedimiento que las muestras. Su función es demostrar que las muestras no sufrieron procesos de contaminación cruzada, ni alteraciones en el transcurso del muestreo y almacenamiento (verifican el estado de limpieza de los envases) (López Casas et al., 2011).

Réplicas

Toda replica tiene por objetivo realizar un muestreo en la misma ubicación para aumentar la precisión del procedimiento y reflejar las variaciones propias de un cuerpo de agua. También se utilizan en laboratorios para medir la precisión de cierto método analítico empleado. Se espera que los resultados por análisis de duplicados sean muy similares dentro del margen de error establecido (Blancas & Medina, 2000).

Cantidad de muestreo

Para el muestreo de aguas residuales, el volumen recomendado de muestra es de 1L, debido a que en el agua residual se encuentran altas concentraciones de microorganismos. Para aguas superficiales, un volumen útil mínimo probablemente sería de 100 litros, siendo preferibles de 150 a 200 litros (Hurst et al., 2007). Mientras que para el agua de grifo el volumen mínimo de muestra es de 1 litro (NMX-AA-3, 1992). Sin embargo, el volumen de la muestra de AR es muy variable, depende en gran medida del objetivo del trabajo. Debe considerarse que la calidad del AR es afectada por la población emisora, temporada del año, si se trata de agua de drenajes separados o mezclados. Y algo muy importante es la experiencia que tenga el grupo de trabajo al respecto, la cual nos puede llevar a muestras menores a 1 litro. Si se trata de la primera vez que se realiza es muy recomendable consultar a grupos con experiencia.

Identificación de las muestras

Cada frasco será rotulado con el nombre y datos del punto de muestreo, incluyendo fecha y hora de recolección, tipo de muestra (puntual o compuesta), parámetros medidos en el sitio y cualquier observación que contribuya a esclarecer las condiciones de la muestra. En lo posible se recomienda establecer puntos de muestreo permanentes, tratando de asegurar condiciones de muestreo reproducibles.

Para concluir el procedimiento de muestreo, es recomendable registrar los datos que corresponden a cada muestra, esto puede realizarse en una libreta o bitácora de campo o en formatos previamente diseñados. Es fundamental que todos los términos que incluyan los formatos sean claros para los técnicos de muestreo. Es altamente recomendable que los formatos no sean hojas sueltas y que cuenten con folios o códigos únicos para cada muestra.

Datos generales de la muestra					
Fecha de toma _____	Si ()	Hora de toma _____	Tomada por _____		
Punto de toma concertado	No ()	Código de punto de toma concertado _____	Código de la muestra _____		
Tipo de agua	Cruda ()	Tratada ()	Coagulante _____	Desinfectante _____	
Fuente de abastecimiento	Río ()	Quebrada ()	Pozo profundo ()	Otros ()	Nombre fuente _____
Objeto de análisis	Vigilancia ()	Análisis solicitado	Cual _____		
	Diagnóstico ()		Fisicoquímico ()	Microbiológico ()	
	Control ()		Metales ()	Plaguicidas ()	
			Otros ()	Cuales _____	
Análisis en el sitio		Resultado	Método de ensayo	Realizado por	
	pH				
	Temperatura (°C)				
	Cloro libre (mg de Cl ₂ /L)				
	Turbiedad (UNT)				
Observaciones de campo _____					
Información del solicitante					
Nombre _____ Teléfono _____ Correo electrónico _____ Dirección _____					

Localización del punto de toma		
Localidad o vereda _____	Lugar _____	Dirección _____
Descripción _____	Coordenadas geográficas	Latitud _____
		Longitud _____

Recepción de muestra en el laboratorio		
Fecha de recepción _____	Hora de recepción _____	Código asignado a la muestra _____
Nombre de quien entrega _____	Firma _____	C.C. _____
Nombre de quien recibe _____	Firma _____	C.C. _____

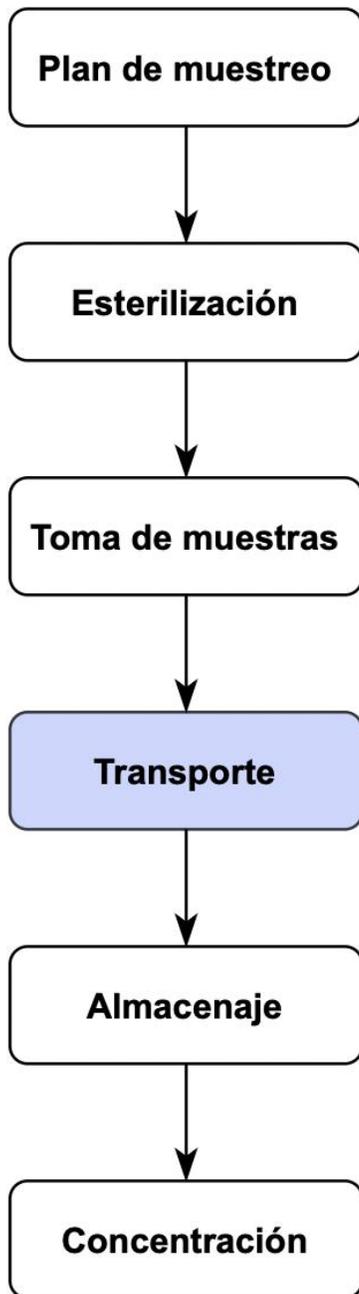
Fig. 10. Ejemplo de un formato para identificación y control de muestras.

Determinación de parámetros *in situ*

Se medirán directamente en el cuerpo de agua. En los casos que esta operación se dificulte y se tenga que efectuar la medición en un contenedor de la muestra, estos parámetros deben medirse a la mayor prontitud posible para minimizar cualquier error (Pepper & Gerba, 2004). Esto se puede realizar con ayuda de una sonda multiparamétrica, tal como la sonda EXO 1 de YSI, instrumento de parámetros múltiples que recopila información acerca de la calidad del agua a través de cuatro sensores intercambiables. Cada sensor mide determinados parámetros (temperatura,

conductividad, oxígeno disuelto, materia orgánica disuelta, nitratos, cloro, PH (Potencial de Hidrógeno) /ORP (Potencial de Oxido Reducción), clorofila y BGA (pigmentos de algas verdeazuladas), turbidez y sólidos suspendidos totales por medio de un conjunto de métodos de detección electroquímica, óptica o física. Aunque se puede utilizar cualquier equipo similar que mida los parámetros de interés de acuerdo con los objetivos de estudio.

De manera general, el primer paso al usar una sonda para la medición de parámetros fisicoquímicos es la calibración del equipo. Posterior a la calibración, la sonda esta lista para introducirse en el cuerpo de agua directamente o en cierta muestra de agua colectada. Según la configuración definida, la sonda recopila datos y los almacena para después transmitirlos a una plataforma de recopilación de datos (DCP) o los transmite directamente a la PC. Si se requiere hacer mediciones adicionales es necesario enjuagar los sensores de la sonda entre cada medición para obtener resultados confiables. Una vez que se termina de usar la sonda, los sensores se enjuagan con agua destilada, y se coloca la sonda en la solución de almacenamiento. Finalmente, tanto la sonda como el controlador portátil se guardan en el estuche con interior de goma espuma para proteger el equipo en periodos de desuso y asegurar la durabilidad del equipo.

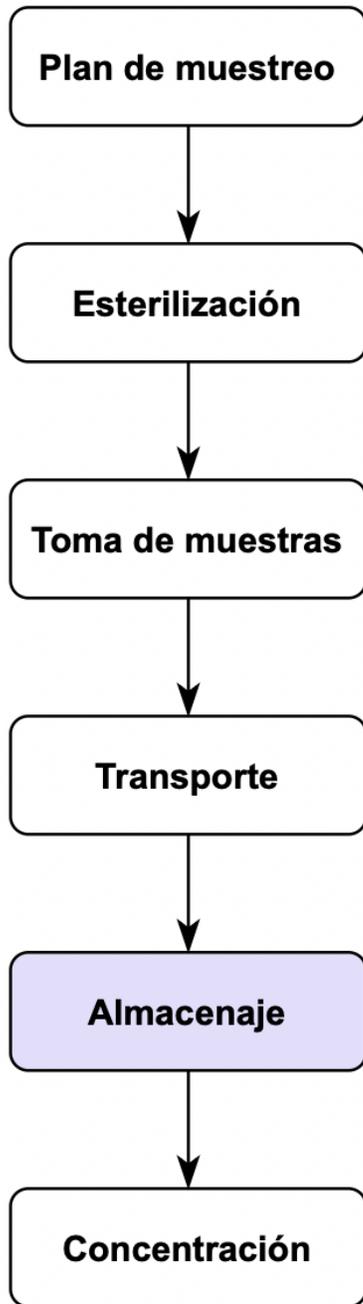


Transporte

Las muestras de agua son susceptibles a cambios químicos, físicos y biológicos en el tiempo que transcurre entre el momento del muestreo y el análisis. Por lo que, si no se toman precauciones necesarias antes y durante el transporte, así como en el tiempo que las muestras se preservan en el laboratorio antes de su análisis, los resultados finales de los parámetros medidos serán significativamente diferentes a los parámetros que existían en el momento de muestreo (López Casas et al., 2011).

Los virus son termolábiles, es decir, su estructura puede romperse al alcanzar una temperatura elevada. Por eso, entre los 50-65 °C expuestos 30 minutos, la mayoría de los virus se inactivan. Esto se debe a que las altas temperaturas provocan la desnaturalización de las proteínas que componen la cápside. Aunque existen excepciones, como el virus de la hepatitis B que se inactiva a los 120°C durante 30 minutos. En cambio, los virus son estables a temperaturas bajas. A -75°C se mantienen activos durante meses mientras que a -196°C pueden conservarse activos durante años (Montoya Villafane, 2008).

Es por ello que, el mantenimiento de la cadena de frío es sustancial para garantizar la integridad de la muestra. Se denomina cadena de frío a un proceso organizado de transporte, manipulación, conservación y almacenamiento en condiciones óptimas de luz y temperatura, garantizando en todo momento la integridad de la muestra, desde que es tomada hasta su análisis correspondiente (Barber-Hueso et al., 2009). Si es necesario almacenar una muestra de agua antes de que se procese, la muestra debe mantenerse en un lugar fresco para reducir la inactivación viral hasta que se pueda procesar para garantizar su integridad (Pierce, 2008). Para la conservación adecuada de las muestras, estas deben ser preservadas a 4°C y enviadas lo antes posible al laboratorio en hielo granizado o con enfriadores de uso doméstico (Fig. 11). Es importante evitar la congelación ya que muchos virus, en especial aquellos con envoltura son muy sensibles a la congelación y descongelación (Berríos & Ilabaca, 2019). Teniendo en cuenta que, la temperatura de refrigeración es aquella comprendida entre 4°C y 8°C. Mientras que, la temperatura de congelación se encuentra por debajo de los -18 °C (López Rojas, 2009).



Almacenaje

Para muestras de agua subterránea y superficial, las muestras de agua deben almacenarse en refrigerador con una temperatura no mayor a 4° C. Si se trata de aguas residuales crudas, la muestra debe almacenarse una noche en refrigeración, preferiblemente a 1° C, para permitir que los sólidos sedimenten, después de lo cual aproximadamente la mitad superior del volumen sobrenadante se decanta y se desecha (Hurst et al., 2007). Para el almacenamiento prolongado (para un periodo mayor a 15 días que abarque meses e incluso años), el acopio de la muestra se realiza en una sala refrigerada, dentro de los ultra congeladores por debajo de los - 80°C, evitando periodos de congelación y descongelación.

En cuanto a las precauciones que se deben tomar en el laboratorio para almacenar muestras potencialmente contaminadas con virus, es importante mencionar que, cumpliendo con el nivel de bioseguridad 2 en el laboratorio (por tratar con virus capaces de infectar al humano) siempre se debe usar bata, cubrebocas y guantes desechables al manipular las muestras, así como tener un buen etiquetado de las mismas donde se exprese explícitamente que la muestra puede ser potencialmente contaminada con virus para asegurar la protección del individuo contra el contacto accidental con patógenos virales (Escalona et al., 2019).

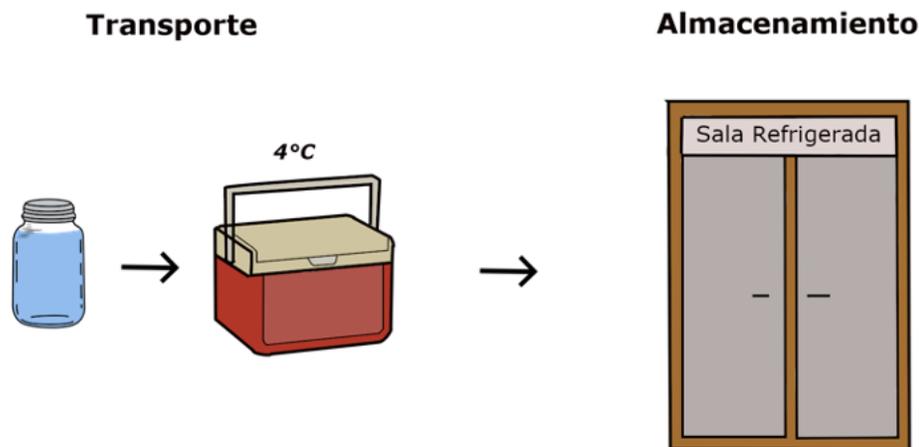
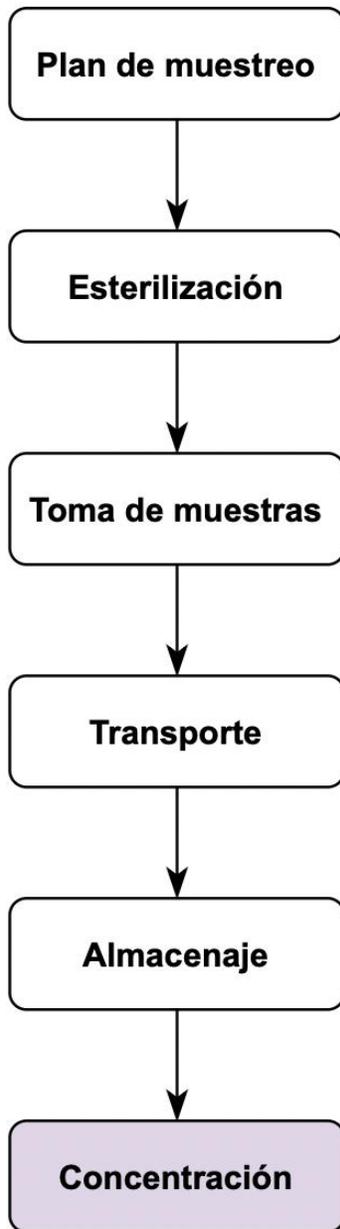


Fig. 11. Transporte y almacenamiento de la muestra.



Concentración de muestras

Las densidades de virus entéricos en el agua residual y tratada suelen ser muy elevadas por lo tanto no resulta necesario llevar a cabo una concentración de muestras, contrario a lo que sucede a las muestras de agua para uso y consumo humano. Existen más de treinta métodos validados para la concentración de virus, lo que indica que no hay una técnica universal (Peláez et al., 2010). Un método eficiente de concentración debe reunir los siguientes criterios: simplicidad, sensibilidad, alto rendimiento, que sea aplicable a diferentes tipos de virus e implique el menor costo posible.

Los métodos de concentración de virus a menudo son capaces de procesar solo volúmenes limitados de agua de una calidad determinada. Un volumen de muestra de menos de un litro y posiblemente tan pequeño como unos pocos mililitros puede ser suficiente para la recuperación de virus de aguas residuales sin tratar o tratadas primariamente. Para el agua potable y otras aguas relativamente no contaminadas, es probable que los niveles de virus sean tan bajos que se deben tomar muestras de cientos o quizás miles de litros para aumentar la probabilidad de detección del virus (Katayama et al., 2002). Los métodos para concentrar virus contenidos en muestras de agua pueden ser separados en 4 grandes categorías (Hurst et al., 2007). Describas a continuación:

Adsorción - elución

Los métodos de concentración por adsorción- elución, se basan en la capacidad de los virus para asociarse a diferentes materiales como membranas o cartuchos filtrantes. Ya que la mayor parte de los virus presentes en el medio hídrico son virus desnudos, es decir, sin envoltura lipídica. La cápside proteica compuesta de aminoácidos con grupos ionizables confiere a los virus una carga eléctrica dependiente del pH. Una gran parte de los virus al pH natural del agua, poseen una carga global negativa que les permite unirse sobre un soporte cargado positivamente mediante atracciones de tipo electrostático. Los filtros electropositivos están compuestos de celulosa con carga modificada y permanecen cargados positivamente con un pH inferior a 6. Estos filtros permiten la adsorción de virus a pH de 5,5-7,5, con una eficiencia de recuperación media de 64% (Girones, 2001).

La utilización de filtros microporosos con carga neta electronegativa requiere la acidificación de la muestra de agua o la adición de sales (NaCl, MgCl) para promover la adsorción, lo cual contribuye a eliminar las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los viriones y la superficie de

los filtros. Aunque es necesario mencionar que, la utilización de esta técnica se ve limitada por la inactivación de ciertos virus a valores de pH ácidos (Haramoto et al., 2004). La elución de los virus a partir de los soportes se hace con soluciones alcalinas, preferiblemente conteniendo extracto de carne o glicina con un pH entre 9 y 11 (Hurst et al., 1998).

Floculación fisicoquímica directa y separación de fases

Esta categoría de metodología de concentración viral se basa en: la floculación fisicoquímica (los virus se asocian con un precipitado que se forma cuando se agregan sustancias químicas al agua); separación de fases poliméricas (reparto selectivo de los virus con una de las dos fases acuosas que se generan y se separan gravimétricamente cuando se añaden sustancias poliméricas solubles a la muestra de agua); o hidroextracción (colocar la muestra de agua en un tubo hecho de membrana permeable, con ese tubo a su vez empaquetado en una sustancia polimérica hidrofóbica que extrae agua a través de los poros de la membrana), lo que da como resultado que los virus y solo una pequeña cantidad de agua residual se retenga dentro del tubo (Vivier et al., 2014).

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es el proceso mediante el cual los virus se retienen durante el paso de la muestra de agua a través de una columna de partículas de gel de polisacárido que porta anticuerpos unidos covalentemente, los cuales reconocen y se unen específicamente a un tipo de virus en particular. A continuación, los virus se liberan de la columna por alteraciones en la composición o fuerza iónica del fluido/tampón usado para mantener la hidratación del gel de polisacárido (Cashdollar & Wymer, 2013).

Ultrafiltración

La ultrafiltración implica la retención de virus en la muestra de agua original mediante una reducción de su volumen lograda por la exclusión del tamaño de los poros, en virtud de que, el tamaño de los poros es lo suficientemente pequeño como para eliminar moléculas que tienen masas del orden de 10,000 a 100,000 Da. Esto se logra recirculando el agua, bajo presión, a través de filtros de fibra hueca. Como se mencionó anteriormente, la cápside proteica compuesta de aminoácidos con grupos ionizables confiere a los virus una carga eléctrica dependiente del pH. Una gran parte de los virus al pH natural del agua, poseen una carga global negativa que les permite unirse sobre un soporte cargado positivamente mediante atracciones de tipo electrostático. Lo cual favorece un eluyente que pasa a través de la misma unidad de concentración para facilitar la recuperación del virus (Donaldson et al., 2002- Katayama et al., 2002).

La adsorción de los virus sobre la superficie de filtros microporosos se ve afectada por la temperatura, el pH, la turbidez y la concentración de materia orgánica en suspensión, que hacen variar la eficiencia de la recuperación. La materia orgánica disuelta y las partículas coloidales en suspensión presentes en las muestras puede provocar la saturación de los filtros, limitando así el volumen máximo que se puede procesar. Estas pueden, además, competir con los virus en la adsorción sobre los filtros (Girones, 2001).

Para decidir qué técnica de concentración emplear, se debe considerar el tipo de muestra ambiental que se examina. Es decir, si se trata de aguas ambientales (dulce o salina), agua potable o aguas residuales. También debe tomarse en cuenta el virus de interés y el equipo disponible.

Concentración de agua subterránea y superficial

Cumpliendo con los criterios para un método eficiente de concentración, dada su simplicidad, sensibilidad, alto rendimiento y el bajo costo una vez instalado el equipo, el método que se describe en este manual para la concentración de agua ambiental y potable es el método de ultrafiltración. De acuerdo con Polakcyk et al. (2008) en su artículo "Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple classes of microbes from 100L tap water samples", los pasos a seguir para la concentración de una muestra de 100 L son los siguientes:

Pretratamiento

1. Preparación de la unidad de filtración como se muestra en la figura 12.

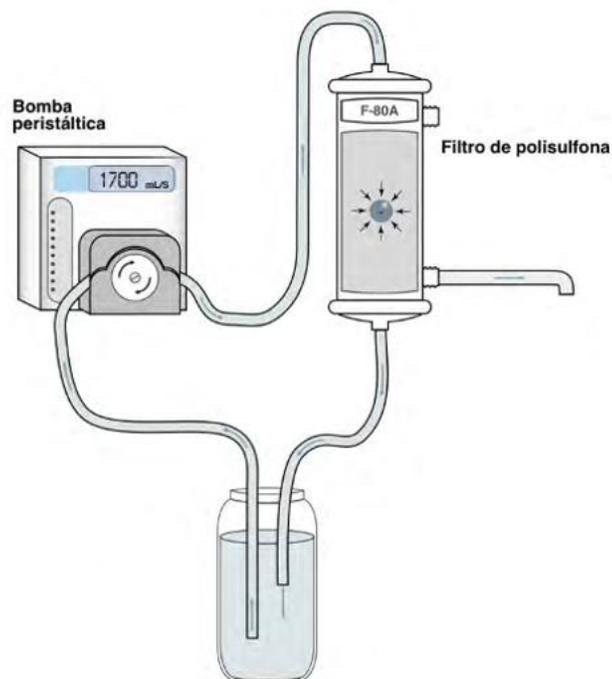


Fig. 12. Preparación de la unidad de ultrafiltración. Adaptado de *Diagrama del sistema de ultrafiltrado usado para concentrar partículas virales*, de Hjort Colunga, Erick Ricardo (2013).

2. Preparación del filtro. Colocar un filtro para hemodiálisis y hacer correr en el sistema 1L de agua con una concentración de un gramo por litro de NaPP durante 30 min. Esto con el fin de favorecer la carga electronegativa dentro del filtro y evitar que los virus se queden adheridos al mismo.
3. Agregar 1g de Polifosfato de sodio (NaPP), a la muestra de agua de 10 L para lograr una concentración de 0.1%. En caso de que cambie la cantidad de muestra a concentrar, ajustar la cantidad de NaPP para que la concentración final sea de 0.1% de NaPP en la muestra. Tomando en cuenta que los volúmenes óptimos de muestra para la concentración oscilan entre 10 y 20 L para agua superficial; y entre 50 y 100 L si se trata de agua para uso y consumo humano.
4. Inactivar el cloro residual que puede estar presente en el agua mediante la adición de 50 ml de tiosulfato de sodio (40 mg/ml) para lograr una concentración final de 20 mg de tiosulfato por litro de agua. Posteriormente, medir el cloro residual de la muestra con un dispositivo Hach DPD Free, Kit de cloro o espectrofotómetro DR/2400 para garantizar que no quede cloro residual. Este paso se efectúa solo si la muestra es agua para uso y consumo humano y colectada en un sistema de distribución.

Procedimiento

5. Pasar la muestra de agua por la unidad de filtración hasta que se reduzca a un volumen aproximado de 1 litro. Al final de este paso, se recomienda pasar la muestra a un contenedor más pequeño para tener una mejor manipulación de esta.
6. Pasar el volumen restante de la muestra por la unidad de filtración y detener cuando queden alrededor de 100 ml. Este volumen será el resultado de la concentración primaria.

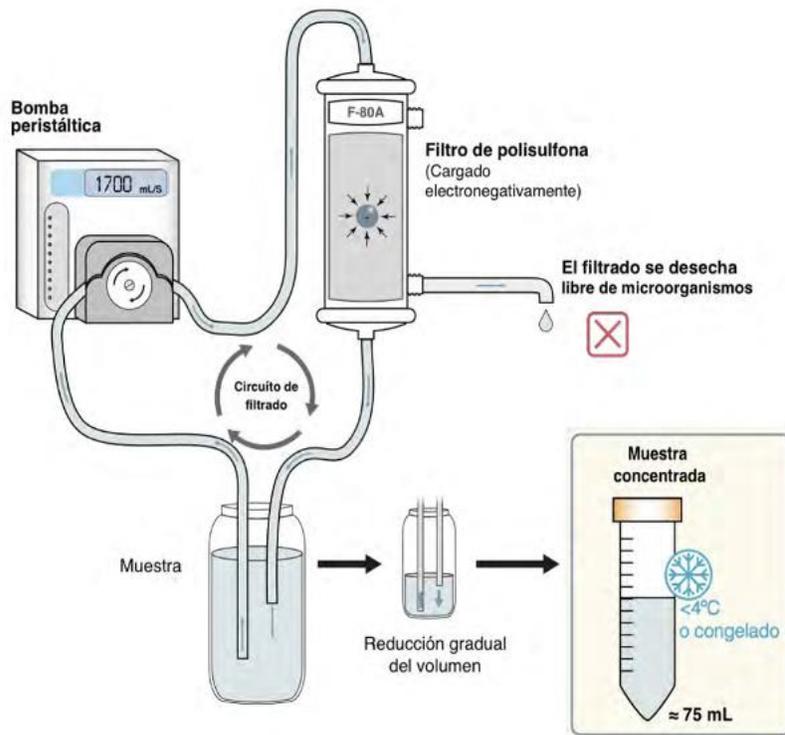


Fig. 13. Sistema de ultrafiltrado para la concentración de muestras. Adaptado de *Diagrama del sistema de ultrafiltrado usado para concentrar partículas virales*, de Hjort Colunga, Erick Ricardo (2013).

Reúso de filtros

Los filtros se pueden usar hasta 5 veces para concentrar agua para uso y consumo humano y hasta 3 veces para agua superficial. Los pasos para la desinfección de filtros son los siguientes:

- 1- Recircular por el sistema un litro de agua con 5 ml de cloro para lograr una concentración de 0.5% por 30 min.
- 2- Agregar a la muestra de agua 1 g de Tiosulfato de Sodio, para inactivar el cloro. Recircular por 45 min.
- 3- Medición en el espectrofotómetro para verificar que esta debajo de lo indicado en la norma. Método de DPD de Hatch.

Concentración secundaria

En este apartado cabe mencionar que no siempre es necesario efectuar una concentración secundaria, su realización depende del protocolo elegido y de los objetivos de estudio. Usualmente se emplea este procedimiento cuando se analizan muestras de agua con bajas densidades virales como el agua para uso y consumo humano, o superficial de cuerpos de agua sin turbidez evidente. En caso de que se haya optado por emplear la concentración secundaria los pasos a seguir son los siguientes:

1. Colocar 15 ml de la muestra en un filtro para centrífuga, se recomiendan los filtros para centrífuga Amicon Ultra-15, utilizados para la concentración de proteínas o virus.
2. Se coloca la unidad tapada en el rotor de la centrífuga equilibrando con una unidad de peso similar en el espacio contrario y se centrifuga a 5000 x g durante 30 min.
3. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante dejando aproximadamente 10 ml sobre el sedimento empaquetado para no perturbarlo y resuspender.
4. Transferir a un tubo de 50 ml agregando 5 ml solución al 2,5% de albúmina de suero bovino estéril (BSA).
5. Centrifugar a 4000 × g durante 30 min a 15 ° C
6. Desechar el sobrenadante.
7. Eluir el concentrado con PBS
8. Se separar en tubos de 1 ml.

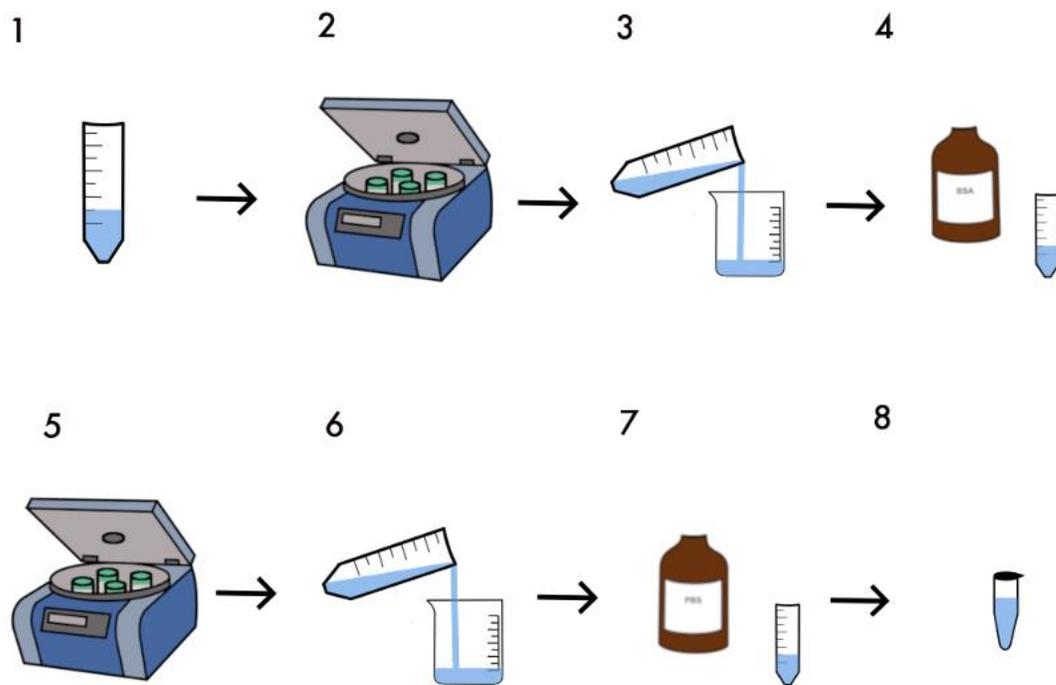


Fig. 14. Concentración secundaria por ultrafiltración

Concentración de agua residual.

Debido a la alta concentración de microorganismos que se encuentran en el agua residual, debido a su composición variada proveniente de usos municipal, industrial, comercial, agrícola, pecuario o de cualquier otra índole. Generalmente no se requiere realizar una concentración. Basta con realizar una filtración de la muestra, con una malla o gasa para remover residuos. Si, de acuerdo con los objetivos del estudio y el protocolo elegido, se requiere concentrar la muestra se puede realizar una concentración secundaria utilizando filtros para centrifuga. Estas muestras concentradas se pueden almacenar a -70°C antes del ensayo si los virus de interés son estables cuando se congelan. De lo contrario, las muestras concentradas deben almacenarse en refrigeración, preferiblemente a no más de 4°C (Hurst et al., 2007).

CONCLUSIONES

Se logró producir un manual que explica, de manera detallada, los pasos a seguir para la toma, transporte, almacenaje y concentración de muestras de agua para el análisis de virus; el cual permite asegurar la integridad de la muestra y la confianza en los resultados. De igual manera, se explicó la relevancia de la virología ambiental para resolver problemas de salud pública y de restauración del ambiente, además de sus contribuciones en investigación sobre la incidencia y comportamiento de virus en agua, la determinación la presencia de virus y el riesgo de infección en distintas fuentes de agua, especialmente por virus entéricos. Haciendo énfasis en como estos problemas afectan a la sociedad y la necesidad de un continuo análisis de calidad del agua.

Dentro del trabajo se describieron protocolos de bioseguridad y normatividad existente respecto a la vigilancia de calidad del agua. Se mencionaron los componentes de un plan de muestreo incluyendo la investigación previa y la determinación de la fuente de agua, puntos de muestreo, tipo de muestra y equipo de muestreo. Se presentó el proceso de esterilización del material y de la posterior toma de muestra, dependiendo el tipo de agua según su origen, incluyendo ilustraciones. Se mencionaron las condiciones en las que se debe transportar y almacenar una muestra de agua. Y finalmente, se expusieron diversos métodos para la concentración de muestras, explicando a detalle el método de ultrafiltración.

En conclusión, aunque anteriormente se han escrito manuales para el análisis de virus en agua en muestras ambientales. Hasta este momento, no se había reportado un manual enfocado únicamente a la toma, transporte y concentración de muestras con base en lo establecido en las Normas Mexicanas referentes a la vigilancia de calidad del agua. Por lo cual, este trabajo ofrece una guía

única que puede emplearse en futuros análisis en el campo de la virología ambiental. Tal es el caso de su aplicación práctica al proyecto “Etiqueta chinampera” (veáse Anexo 2) donde se utiliza como guía para el análisis de muestras del agua de los canales de Xochimilco en Ciudad de México. para ayudar a resolver problemas de salud pública y de conservación del ambiente.

ANEXO 1. TABLA DE CONSULTA RÁPIDA

Tabla de consulta rápida

Tipo de agua (Con base en su origen)	<u>Subterránea</u>	<u>Superficial</u>	<u>Residual</u>
Cantidad de muestreo	50- 100 L	10 L	<1 L
Temperatura de transporte	4°C		
Almacenamiento corto plazo (hasta 15 días)	< 4°C		1°C
Almacenamiento prolongado	-80°C		
Método de concentración primaria	Adsorción – elución / Floculación fisicoquímica directa y separación de fases / Cromatografía de afinidad/ Ultrafiltración		Filtrado con gasa
Método de concentración secundaria	Filtros para centrífuga		

Nota: El método a elegir depende de los objetivos de estudio. No siempre es necesaria una concentración secundaria.

ANEXO 2. APLICACIÓN DEL MANUAL

La utilidad de este manual la podemos apreciar en su aplicación al proyecto “La etiqueta chinampera como promotora del fortalecimiento económico, alimenticio y la restauración integral de la zona lacustre de Xochimilco a través del modelo chinampa-refugio”. Trabajo coordinado por el Dr. Luis Zambrano González del Instituto de Biología. UNAM y que ha sido financiado por Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI).

El proyecto se enfoca en el lago de Xochimilco, último remanente de los cinco grandes lagos que conformaban la Cuenca del Valle de México (el Lago de Chalco y Xochimilco compuestos por agua dulce; el de Texcoco, Zumpango y el Xaltocan de agua salobre). Este ecosistema se identifica como humedal, lo que según el comité para la caracterización de humedales de los Estados Unidos define como: un ecosistema que depende de un proceso constante o recurrente de inundación poco profunda o de saturación en o cerca de la superficie del sustrato (Veas-Ayala et al., 2018). Los humedales proveen importantes servicios ecosistémicos, entre los que destaca el mantenimiento de la biodiversidad, la producción de alimentos y el mantenimiento de la calidad del agua (SEMARNAT, 2012). Además, actúan como zonas importantes de filtración y recarga de aguas subterráneas, reducen la erosión del suelo, suministran áreas de refugio para la fauna, captura de carbono y contribuyen a la retención de sedimentos, fomentando la fertilidad del suelo (Landgrave et al., 2012).

En el caso específico del humedal de Xochimilco, este es de gran importancia al ser hábitat de una gran cantidad de especies de flora y fauna, algunas de las cuales son endémicas. Además de su

participación el ciclo hídrico de la ciudad. Y al resguardar una forma de cultivo que ha sido considerada como única en el mundo: la chinampería (Toledo et al., 2005).

La palabra “chinampa” proviene del náhuatl chinamitl = seto de cañas y apam = terreno plano. Este término se acuñó debido a que los entrelazados y tejidos de caña son el sustento principal de las chinampas. Las dimensiones de la chinampa son variables. Morfológicamente pueden describirse como parcelas estrechas de forma rectangular construidas por encima del nivel del agua, lo que permite el flujo permanente de la humedad evitando la salinización de su superficie (Toledo et al., 2005).

El modelo chinampa – refugio busca construir una simbiosis entre la producción agrícola y la conservación del ajolote, una de las especies más afectadas por el deterioro de Xochimilco. Pues los requerimientos ecológicos y las características fisiológicas de este anfibio lo hacen altamente sensible a los cambios en su hábitat (Duellman et al., 1994).

En vista de la acelerada pérdida de esta valiosa especie y la urgente necesidad de establecer programas estratégicos para la salvaguardar al ajolote. Zambrano y colaboradores (2010) realizaron un análisis de la viabilidad de la población y determinaron que la mejor manera de restaurar las poblaciones de ajolote es aumentando la supervivencia de los huevos y las larvas, junto con la restauración del hábitat y el control de los depredadores, en lugar de la reintroducción de crías reproducidas en cautiverio. Bajo esta lógica, propusieron la creación del modelo refugio-chinampa, involucrando la conservación *in situ* del ajolote y en donde los organismos puedan llevar a cabo su ciclo de vida sin las amenazas que representan las condiciones actuales del Lago de Xochimilco.

Pues, aunque se han tomado distintas líneas de acción para fomentar su conservación. Desde su declaración como Patrimonio Cultural de la Humanidad por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). Su nombramiento como Área Natural Protegida (ANP) bajo la categoría de Zona Sujeta a Conservación Ecológica. Su inclusión en la Lista de Humedales con Importancia Internacional (Sitio RAMSAR). Su reconocimiento como Sistema Importante del Patrimonio Agrícola Mundial por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). A pesar de todos los instrumentos gubernamentales y mecanismos de protección que se han desarrollado para proteger el ecosistema, resulta una paradoja que hasta el día de hoy no se han documentado experiencias exitosas que reflejen una transformación evidente en Xochimilco. Esto se debe, quizá, a la falta de espacios que permitan la participación comunitaria, puesto que, generalmente la población local no es considerada en ninguna parte del proceso de gestión y planeación de las áreas destinadas a conservación. Por lo cual, surge la necesidad buscar formas alternativas de conservación bajo mecanismos incluyentes que tomen en cuenta sus necesidades y demandas.

Entre los mecanismos de conservación se encuentran las etiquetas ecológicas. El “etiquetado ecológico”, “eco-etiquetado” o “sello verde” es un instrumento de política ambiental con potencialidad para atraer a consumidores preocupados por el impacto que tiene su patrón de consumo en el medio ambiente y que estarían dispuestos a modificar determinados hábitos al adquirir productos que generen un menor impacto ambiental, siempre que tuvieran una información veraz al respecto (Jurjo et al., 2007).

El etiquetado ecológico enfocado a la industria alimenticia certifica que dichos productos poseen atributos que los distinguen de otros productos convencionales, como la eficiencia energética, la gestión forestal sostenible, los sistemas integrales de gestión de residuos, el reciclaje, el no uso de agroquímicos, la conservación de la vida silvestre, entre otros. Los productores que se encuentren interesados en obtener la Etiqueta Chinampera deberán ingresar una solicitud al organismo certificador. Una vez aceptada la solicitud, personal asignado realizará una visita previa a la unidad productiva del interesado para realizar una entrevista y e inspección de las condiciones de la chinampa. Ello, permitirá identificar el grado de avance del productor en cuanto a dos cuestiones: producción agrícola y refugios para el ajolote, también se deberán tomar muestras de agua, suelo y hortalizas para enviar a laboratorio para, en conjunto con la entrevista, se obtenga un diagnóstico inicial. Aquellos productores que resulten con un grado de avance mayor en sus chinampas podrán iniciar el proceso para la concesión de la Etiqueta Chinampera. Para los productores que no cumplan con la totalidad de los criterios, deben ser identificadas sus necesidades y limitantes a fin de determinar el tipo de asistencia técnica que se requiere para trabajar en conjunto y que así, puedan contar con una chinampa en condiciones óptimas para iniciar el proceso de certificación y se les otorgue la Etiqueta Chinampera.

Esto con el fin de conservar los humedales y los ajolotes de Xochimilco, pero también de ayudar a los productores de la zona. Pues se han reportado diversas problemáticas que los aquejan. En primer lugar, la cuestión ambiental; donde es evidente que existe una perturbación del sistema lacustre, principalmente por la incidencia de aguas negras en los canales, que incide directamente en la producción agrícola de la zona. Se debe trabajar en conjunto con el gobierno de la Ciudad de México para plantear iniciativas y dar solución en materia de drenaje, saneamiento e

infraestructura hidráulica que permitan contar con buena calidad del agua en Xochimilco para uso agrícola. Por otro lado, pese a que el ANP cuenta con un plan de manejo que prohíbe el desarrollo de asentamientos dentro de su polígono, es claro que no se han tomado las medidas necesarias para frenar su avance y a establecer e implementar medidas de gestión y vigilancia dentro de la zona.

En segundo lugar, en el ámbito social, se encontraron dos factores que vulneran a la zona chinampera. Primero, existe un fuerte abandono de chinampas. Las actividades agrícolas en Xochimilco cada día son menos apoyadas y reconocidas. Las nuevas generaciones han optado por buscar en otros puntos de la ciudad mejores oportunidades de desarrollo académico y laboral. (Castro et al.,1998) patrón que se repite en la mayoría de las comunidades campesinas de nuestro país. En la actualidad, sólo son los padres y los abuelos quienes se han quedado a trabajar sus chinampas. En este sentido, la Etiqueta Chinampera podría ser un detonador para el retorno de las familias xochimilcas al mejorar la economía local, ofrecer mejores oportunidades para la comercialización de sus productos y ser un mecanismo que involucre y genere empleo para los jóvenes que estén interesados en la agricultura.

Aunado a esto, existe una desvalorización del trabajo del chinampero, gracias a la creencia de una producción agrícola contaminada. Debido a la falta de información y la tergiversación por parte de los medios de comunicación. Este último factor también está ligado con los problemas de comercialización que enfrentan, pues al ser referido su producto como “contaminado” la demanda es menor y terminan por malbaratar su producto para lograr una ganancia (aunque menor) por sus hortalizas. De acuerdo con lo anterior, es necesario impulsar una serie de acciones que fomenten el reconocimiento del trabajo del sector agrícola en nuestra sociedad. Por último, existe una

marcada competencia con la producción convencional, los productores, al no contar con una garantía que avale a sus productos libres de agroquímicos tienen que competir con los bajos precios de otros productores.

De acuerdo con Vázquez (2018) en su tesis “Etiqueta Chinampera: una herramienta para la conservación de Xochimilco y del ajolote, Ciudad de México, México”, se detectó que los chinamperos consideran útil la implementación de un mecanismo de etiquetado ecológico para acceder a mejores condiciones de trabajo y mejorar las vías de comercialización para sus productos de la chinampa. Así mismo se encuentran dispuestos a integrar un refugio para ajolotes y trabajar bajo estándares de calidad que les permitan obtener la Etiqueta Chinampera. Además, su estudio refleja que diversos consumidores conocen la situación ambiental de Xochimilco y el ajolote, motivo por el cual, tienen una alta disposición a apoyar el proyecto a través de la compra de los productos de la chinampa, siempre y cuando, se les ofrezca información verídica.

En resumen, el proyecto “Etiqueta Chinampera” propone una herramienta viable para la conservación de la vida silvestre, específicamente del ajolote, una especie emblemática mexicana y, al mismo tiempo, dignifica el trabajo de los productores chinamperos. Retomando el proceso para la obtención de la etiqueta, como se ha mencionado anteriormente se requiere de un diagnóstico inicial de las chinampas que implica examinar muestras de agua, suelo y hortalizas. El presente manual contribuye al proyecto describiendo la metodología que debe emplearse para obtener resultados confiables al analizar virus presentes en agua. A continuación, se muestra la aplicación del manual en el desarrollo del proyecto junto con evidencia fotográfica.

Previo al muestreo

Definición del plan de muestreo. Se recopiló información sobre los humedales de Xochimilco, de los productos agrícolas chinamperos de la Zona Lacustre de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, y la problemática actual que enfrentan los productores del área. Incluyendo un mapa del sitio con el fin de ejecutar el muestreo de la forma más adecuada (Fig. 1-2).

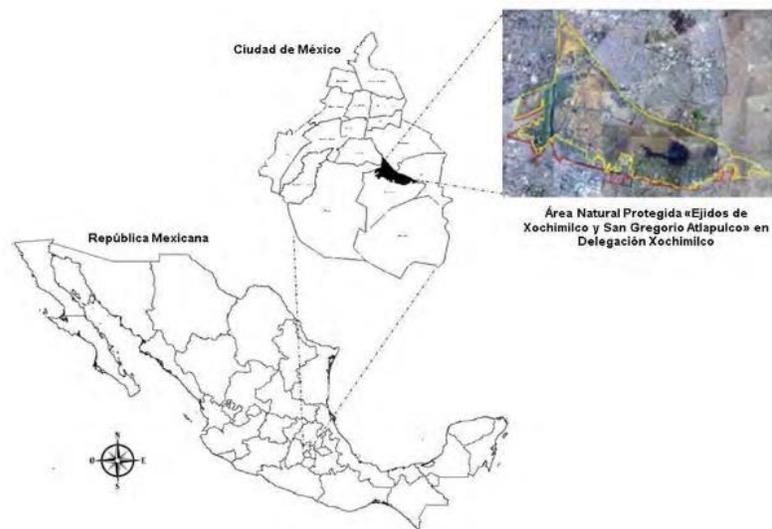


Fig. 1. Ubicación geográfica del Área Natural Protegida “Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco” (PAOT, 2009). Elaboración de Diana Vázquez (2018).

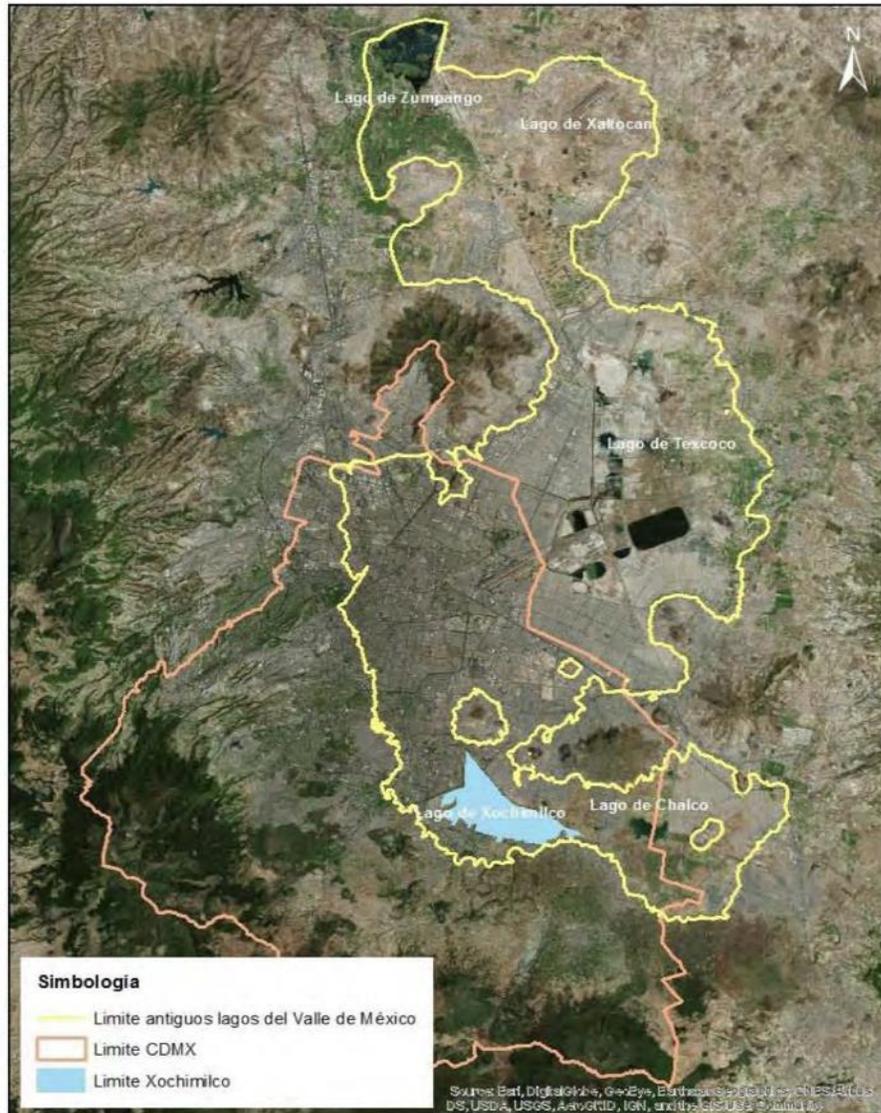


Fig. 2. Ubicación geográfica del Área Natural Protegida “Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco” enmarcada en los antiguos lagos de la Cuenca del Valle de México. Elaboración de Tania Fernández (2018).

Determinación de la fuente de agua. Tomando en cuenta su origen el agua de la zona lacustre de Xochimilco se considera agua superficial.

Selección de los puntos de muestreo. El primer requisito para seleccionar los puntos de muestreo fue seleccionar aquellas chinampas que estuvieran inscritas al programa Chinampa-Refugio, es decir, que algunos productores modifican sus chinampas para crear refugios de conservación del ajolote. Posteriormente, de las chinampas inscritas, se seleccionaron 17 conforme a las características de la chinampa. Finalmente, en las chinampas seleccionadas se identificaron tres puntos a lo largo del canal principal en contacto con la chinampa y para el refugio 3 puntos a lo largo del mismo para realizar la toma de muestras en cada temporada.

Determinación del tipo de muestra. Las muestras corresponden al tipo puntual, pues se tomaron en un momento determinado sin combinar fracciones de varias muestras. En un muestreo establecido cada 6 meses, para poder obtener datos sobre épocas de precipitación pluvial y estiaje. Las fechas de muestreo establecidas resultaron de la siguiente forma. Primer muestreo: temporada fría-seca, noviembre 2019. Segundo muestreo: temporada cálida-seca, abril 2021. Tercer muestro: lluvias, septiembre 2021. Se acordaron tres muestras por triplicado por sitio de muestreo a las que se les evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, materia orgánica disuelta, nitratos, cloro, pH (Potencial de Hidrógeno) /ORP (Potencial de Oxido Reducción), clorofila y BGA (pigmentos de algas verde-azuladas), turbidez y sólidos suspendidos totales. Parámetros biológicos: bacterias, virus y parásitos.

Equipo de muestreo

Como parte del equipo de muestreo se incluyeron frascos con capacidad de 1L de polipropileno (Fig. 3), Hieleras, bolsas de plástico tamaño grande, hielos azules, etiquetas y rotuladores (Fig. 4).

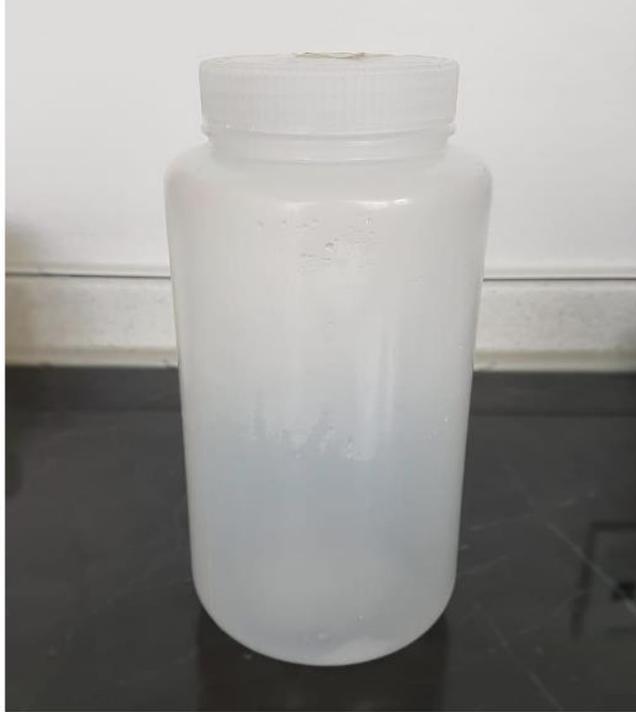


Fig. 3. Bote de polipropileno utilizado para muestreo de agua.



Fig. 4. Preparación del material de campo.

Esterilización de material de muestreo

Se esterilizaron los botes de polipropileno en la autoclave a 120°C durante 30 minutos a 1,1 atmósferas de presión por encima de la presión atmosférica (Fig. 5) y se verificó que las tapas de los contenedores fueran herméticas para evitar derrames (Fig. 6). En vista de que el muestreo fue realizado en un solo día y se llevaba todo el material previamente esterilizado, no fue necesario realizar ninguna esterilización en campo.



Fig. 5. Autoclave para esterilización.



Fig. 6. Esterilización del material en autoclave.

Procedimiento de muestreo

Para la toma de muestras se siguieron los pasos indicados en el apartado “Toma de muestra de un cuerpo de agua superficial o tanque de almacenamiento” del presente manual. Se realizó un lavado de manos y antebrazos con agua y jabón. Después se sumergió el contenedor de 1L en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad de 15 a 30 cm, una vez en que se encontraba en esta profundidad se abrió y enderezó posicionando el cuello hacia arriba con la boca del frasco en contracorriente. Finalmente, se colocó la tapa y se sacó el contenedor del agua (Fig.7-8).

Cantidad de muestreo

El volumen de muestra colectado fue un total de 51 litros por muestreo, ya que se colectó un litro por triplicado de 17 chinampas, 5 chinampas sin refugio y 12 con refugio. Pese a que el volumen indicado en el manual para aguas superficiales es de 100 litros para agua superficial, por cuestiones de logística se tomó la decisión de colectar dicho volumen. Además, se debe considerar que el

agua de Xochimilco es considerada una mezcla compuesta de agua residual tratada del cerro de la estrella, agua residual de asentamientos urbanos y agua de lluvia. Por lo que, presenta mayor probabilidad de tener una alta concentración viral, y por el mismo motivo, no es necesario un volumen de muestra superior para la detección de virus.



Fig. 7. Toma de muestras de agua del canal principal en Xochimilco.

Identificación de las muestras

Cada frasco se rotuló con el nombre y datos del punto de muestreo, incluyendo fecha y hora de recolección, tipo de muestra, parámetros medidos en el sitio y cualquier observación adicional sobre las condiciones de la muestra (Fig. 9). Adicional a esto, en una bitácora de campo se registró toda la información posible de las condiciones de muestreo.

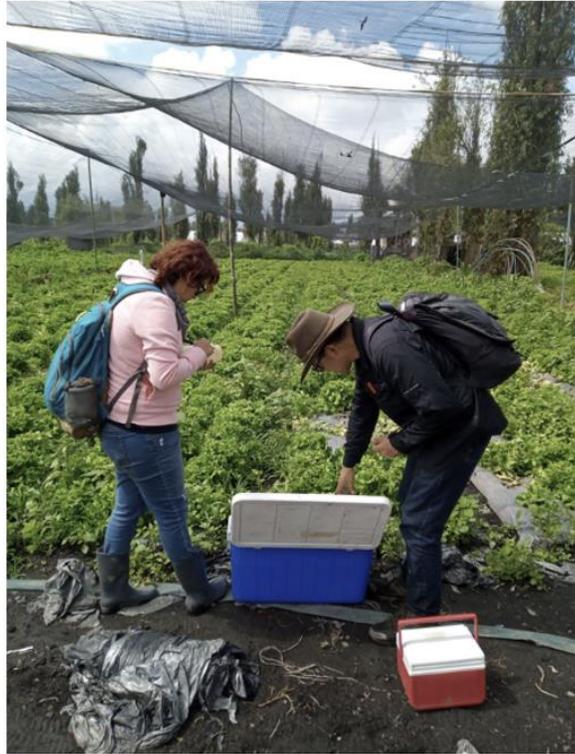


Fig. 8. Identificación de muestras y registro de condiciones de muestreo.

Determinación de parámetros *in situ*

La toma de parámetros fisicoquímicos se realizó con ayuda de una sonda multiparamétrica tal como se describe en la sección correspondiente del manual.

Transporte y almacenaje de muestras

Para mantener la cadena de frío, las muestras fueron preservadas a 4°C y enviadas lo antes posible con enfriadores al Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad (LANCIS) (Fig.10), ubicado en Ciudad Universitaria, alcaldía Coyoacán, Ciudad de México. Para aquellas muestras que no se analizaron de manera inmediata en el laboratorio y se requirió un almacenamiento prolongado, se almacenaron en una sala refrigerada, dentro de los ultra congeladores por debajo

de los -80°C (Fig. 11), evitando periodos de congelación y descongelación. Usando en todo momento bata, cubrebocas y guantes desechables al manipular las muestras para asegurar la protección del personal contra el contacto accidental con patógenos virales.



Fig. 9. Transporte de muestras al laboratorio



Fig. 10. Cuarto frío para el almacenamiento de muestras

Concentración de muestras

Para concentrar las muestras de agua de los humedales de Xochimilco se empleó el método de ultrafiltración antes explicado. El primer paso fue preparar la unidad de filtración y el filtro para hemodiálisis con el fin de favorecer la carga electronegativa. Para lograr lo anterior, se hizo correr en el sistema una concentración de un gramo por litro de NaPP, 1L durante 30 min. Posteriormente, se agregó 1g de Polifosfato de sodio (NaPP), a la muestra de agua de 10 L para lograr una concentración de 0.1%.

En seguida se condujo la muestra de agua por la unidad de filtración hasta que se redujo a un volumen aproximado de 1 litro. Al llegar a dicho volumen, se trasladó la muestra a un contenedor más pequeño para tener una mejor manipulación de la misma. El volumen restante de la muestra

se circuló por la unidad de filtración (Fig.12). El proceso se detuvo cuando quedaron alrededor de 45 ml (Fig.13).

Concentración secundaria

Se colocaron 15 ml de la muestra en filtros Amicon Ultra-15. Se insertó la unidad tapada en el rotor de la centrífuga equilibrando con una unidad de peso similar en el espacio contrario y se centrifugó a 5000x g durante 30 min (Fig. 14). Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante dejando aproximadamente 10 ml sobre el sedimento empaquetado para no perturbarlo y a continuación se resuspendió. Después, la muestra se transfirió a un tubo de 50 ml con una solución al 2,5% de albúmina de suero bovino estéril (BSA), se centrifugó a $4000 \times g$ durante 30 min a $15^\circ C$ y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se eluyó el concentrado con PBS, y se separó en tubos de 1 ml (Fig.15).



Fig. 11. Sistema de ultrafiltración ensamblado en el laboratorio



Fig. 12. Centrifugación para concentración secundaria.



Fig. 13. Centrifugación para concentración secundaria



Fig. 14. Obtención de muestra con concentración secundaria.

REFERENCIAS

- Alberto, C., Sierra, S., Enrique, M., y Bertel, C. (2013). *Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en aguas*. Noviembre, 1–101. Recuperado el 07 de septiembre de 2021, de <http://www.eumed.net/libros-gratis/2013a/1326/index.htm>
- Allende, J., Carú, M., Carvallo, P., y Romilio, E. (2008). *Manual de Normas de Bioseguridad*. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, 1–139.
- Arraiza, N., Viguria, P., Navarro, J., y Ainciburu, A. (2009). [53] *Manual de microscopia*. Auxilab, S.L., 2, 1–56. [https://pagina.jccm.es/museociencias/otras actividades web/material cnr web/manual de microscopia.pdf](https://pagina.jccm.es/museociencias/otras_actividades_web/material_cnr_web/manual_de_microscopia.pdf)
- Baggi, F., y Peduzzi, R. (2007). *Erratum: Genotyping of rotaviruses in environmental water and stool samples in southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:10. Pages 3681-3685, 2000. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4685.
- Barber-Hueso, C., Rodríguez-Sánchez, Ó., Cervera-Pérez, I., y Peiró, S. (2009). *La cadena de frío vacunal en un departamento de salud de la Comunidad Valenciana*. *Gaceta Sanitaria*, 23(2), 139–143. Recuperado el 20 de octubre del 2021, de <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2008.03.003>
- Bellido Blasco, J. B., y García, A. M. (2007). *Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas*. Aspectos actuales, 6.
- Berríos, C. S., y Ilabaca, R. G. (2019). *Manual De Microbiología*. In *Manual De Microbiología*. Recuperado el 12 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.2307/j.ctvkjb56f>
- Betancourt, L., Gadea, M., y Flores, K. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología médica*.
- Blancas, J. C., y Medina, F. (2000). *Calidad de los Resultados de Análisis en el Monitoreo de Agua – Estudio de Casos*.
- Blanton, L. H., Adams, S. M., Beard, R. S., Wei, G., Bulens, S. K., Widdowson, M. A., Glass, R. I., y Monroe, S. S. (2006). *Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004*. *Journal of Infectious Diseases*, 193(3), 413–421. Recuperado el 18 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1086/499315>
- Bofill-Mass, S., Clemente-Casares, P., Albiñana-Giménez, N., Maluquer de Motes-Porta, C., Hundesa-Gonfa, A., Girones Llop, R. (2005) *Efecto Sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por Virus Emergentes Humanos*. *Revista Española de Salud Pública*, 2005 (79). Páginas 253-269.
- Botto, L. (2005). *Toma de muestras para cultivos*. *Revista Del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 24(4), 164–167.
- Bracho, M. (2008). *Detección del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41 y bacteriófagos en agua para consumo humano*. *Ciencia*, 16(3).
- Cashdollar, J. L., y Wymer, L. (2013). *Methods for primary concentration of viruses from water samples:*

- A review and meta-analysis of recent studies*. Journal of Applied Microbiology, 115(1), 1–11. Recuperado el 1 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1111/jam.12143>
- Castro, R. G., Panqueva, A. G., y Drews, O. M. (1998). *La crítica a la globalización en América Latina*. Informática educativa, 11(1), 9-30.
- Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N., y Margolin, A. B. (2000). *Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure*. Applied and Environmental Microbiology, 66(6), 2520–2525. Recuperado el 20 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2520-2525.2000>
- Cuesta, M. B., & Jurjo, J. M. M. (2007). *El eco etiquetado, ¿un instrumento eficiente de política ambiental?* Boletín económico de ICE, (2915).
- Cuthbert, J. A. (2001). *Hepatitis A: Old and new*. Clinical Microbiology Reviews, 14(1), 38–58. Recuperado el 3 de noviembre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.38-58.2001>
- Diesch, S. (2009). *Antecedentes históricos Conceptos sobre la transmisión de las enfermedades virales por origen animal*.
- DOF. (1992). *Nom-AA-3-1980 Norma Mexicana “Aguas Residuales. – Muestreo”*. Diario Oficial de La Federación, 3–6. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa003.pdf%0A%0A
- Donaldson, K. A., Griffin, D. W., y Paul, J. H. (2002). *Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR*. Water Research, 36(10), 2505–2514. Recuperado el 10 de septiembre de 2021, de [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00479-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00479-1)
- Donayre, C., Cecilia, P., Zeballos, H. E., y Sánchez, B. J. (2013). *Realidad de la fase pre-analítica en el laboratorio clínico*. Revista Médica Herediana, 24(4), 325. Recuperado el 25 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.20453/rmh.v24i4.280>
- Dreier, J., Knabbe, C., y Vollmer, T. (2018). *Transfusion-transmitted hepatitis E: NAT screening of blood donations and infectious dose*. Frontiers in medicine, 5, 5.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. JHU press.
- Escalona, M. E., Vilchis, M. F., y Herrera, M. del coral. (2019). *Toma de muestras de laboratorio y medidas de bioseguridad*. Universidad Autónoma Del Estado de México. Centro Universitario Amecameca.
- Espigares-García, M. (2006) *Virus en aguas de consumo*. Higiene y Sanidad Ambiental, 6. Páginas 173-189.
- Espinosa-García, A. C., Arias-Ortíz, C. F., y Mazari-Hiriart, M. (2004). *Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública*. Hidrobiológica, 14(2), 166–178.
- Fernández, J. M. R., y Gómez, J. B. (2010). *Infecciones por norovirus*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 28, 51-55.

- Fuhrman, J. A. (1999). *Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects*. *Nature*, 541-548.
- Galán Madruga, D., Ruíz Boada, F. J., & Díaz López, G. (2018). *Metodología para la Toma de Muestra de Microorganismos Altamente Patógenos en Las Matrices Ambientales Aire, Agua y Suelo / Sedimento*. Centro Nacional de Sanidad Ambiental, 181. Recuperado el 14 de octubre de 2021, de <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-f06e501959>.
- García Rubio, V. G., y Santiago Rodríguez, M. del R. (2020). *Manual de prácticas de la unidad de aprendizaje: Virología*. Universidad Autónoma Del Estado de México. Centro Universitario Amecameca., 39.
- García, M. E. (2006). *Virus en aguas de consumo*. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 6(6), 173–189. Recuperado el 17 de septiembre de 2021, de http://www.saludpublica.es/secciones/revista/revistaspdf/bc510159f5f2fa3_Hig.Sanid.Ambient.6.173-189%282006%29.pdf
- Girones, R. (2001). Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología.
- Grabow, W. O. K. (2007). *Overview of Health-Related Water Virology*. *Perspectives in Medical Virology*, 17(07), 1–25. Recuperado el 19 de septiembre de 2021, de [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17001-4](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17001-4)
- Grabow, W. O. K., Taylor, M. B., & De Villiers, J. C. (2007). *New methods for the detection of viruses: Call for review of drinking water quality guidelines*. *Water Science and Technology*, 43(12), 1–8. Recuperado el 23 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0703>
- Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Hundesa, A., & Girones, R. (2011). *Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: Analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water*.
- Guerrero, M. (2019). *El agua, un recurso esencial*. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Gust, I. D. (1992). *Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world*. *Vaccine*, 10, S56-S58.
- Haramoto, E., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2004). *Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2154–2160. Recuperado el 20 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2154-2160.2004>
- Hidalgo, Berta Isabel Domínguez, Y. A. (2010). *La contaminación ambiental como factor determinante de la salud*. En *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* (Vol. 48, Issue 2). Recuperado el 1 de octubre de 2021, de <http://scielo.sld.cu>
- Hurst, C. J., Benton, W. H., & Stefler, R. E. (1998). *Detecting viruses in water*. *Journal / American Water Works Association*, 81(9), 71–80. Recuperado el 10 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1989.tb03273.x>

- Hurst, C. J., Garland, J., Mills, A., Crawford, R., Lipson, D., & Stetzenbach, L. (2007). *Environmental microbiology*. Physical Sciences Reviews, 3(11). Recuperado el 24 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0118>
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). *Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater*. Applied and Environmental Microbiology, 68(3), 1033–1039. Recuperado el 1 de noviembre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>
- Lara, H., Ayala, N., & Cristina, R. (2007). *Laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4: investigación de patógenos peligrosos*. Revista Mexicana de Patología Clínica y Médica, 54(4), 177–186.
- López Casas, J. G., Edith, O. M., Rey Benito, G. J., & Nava Tovar, G. (2011). *Manual de Instrucciones para la Toma, Preservación y Transporte de Muestras de agua de Consumo Humano para Análisis de Laboratorio*.
- López Rojas, H. Y. (2009). *Preservación de microorganismos por congelación*. Red Nacional de Alimentos. 89-92. Recuperado el 28 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/aem.42.6.963-975.1999>
- Martos, Á. (2015). *La importancia del agua en nuestro planeta*. Universidad de Jaen. Centro de Estudios de Postgrado.
- Medina, V. (2010). *Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres Ecology of emerging infectious diseases and wild species conservation*. Archivos de Medicina Veterinaria (Valdivia), 24, 11–24.
- Mitchell, R., & Gu, J. D. (2010). *Environmental Microbiolog*. In Environmental Microbiology: Second Edition. Recuperado el 2 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1002/9780470495117>
- Montero, A. (2015). *Detección, Cuantificación Y Caracterización Molecular De Astrovirus Clásicos Y Emergentes*. Universidad de La República de Uruguay, 1–122.
- Montoya Villafane, H. Humberto. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Editorial Universidad de Antioquia.
- Moore, R. S., Taylor, D. H., Sturman, L. S., Reddy, M. M., & Fuhs, G. W. (1981). *Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils*. Applied and Environmental Microbiology, 42(6), 963–975. Recuperado el 3 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/aem.42.6.963-975.1981>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. E. N. S., & Pfaller, M. A. (2018). *Microbiología*.
- Nadan, S., Walter, J. E., Grabow, W. O. K., Mitchell, D. K., & Taylor, M. B. (2003). *Molecular Characterization of Astroviruses by Reverse Transcriptase PCR and Sequence Analysis: Comparison of Clinical and Environmental Isolates from South Africa*. 69(2), 747–753. Recuperado el 4 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.747>
- Negróni, M., & Inés González, M. (2018). *Virus: Generalidades*. Microbiología Estomatológica Parte I, 69–80.

- ONU. (2018). *Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible Una oportunidad para América Latina y el Caribe Gracias por su interés en esta publicación de la CEPAL*. En Publicación de las Naciones Unidas. Recuperado el 4 de octubre de 2021, de https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/40155/24/S1801141_es.pdf
- Orozco, A. V. I. (2009). *Tesis. El desarrollo sustentable del agua como asunto de seguridad nacional.pdf*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ossa L, J. E. (2001). *Historia y características de los virus*. Principios de Virología, 11–22.
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *International journal of morphology*, 35(1), 227-232.
- Pace, N. R. (1997). *A molecular view of microbial diversity and the biosphere*. *Science*, 734-740.
- Pavón, N. (2020). *Los buenos virus: relaciones virales mutualistas*. Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo, 2(1), 6–8.
- Pedret, S. V., Rodríguez, P. C., Vizcaíno, I. R., & Vidriales, J. L. C. (2007). *Errores relacionados con el laboratorio clínico*. *Química Clínica*, 26(1), 23–28.
- Peláez, D., Guzmán, B. L., Rodríguez, J., Acero, F., & Nava, G. (2016). *Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: Desafíos de los sistemas de abastecimiento*. *Biomédica*, 36, 169–178. Recuperado el 29 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>
- Peláez, D., Rodríguez, J. A., Rocha, E. L., y Rey, G. J. (2010). *Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo*. *Biomédica*, 30(3), 458. Recuperado el 2 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.281>
- Pepper, I., & Gerba, C. (2004). *Environmental microbiology*. In *Physical Sciences Reviews* (Vol. 2, Issue 11). Recuperado el 30 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0118>
- Pierce, J. T. (2008). *Manual of Environmental Microbiology, 3rd Edition*. In *Shock* (Vol. 29, Issue 2). Recuperado el 27 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000286267.62940.84>
- Pintó, R. Saiz, J. C. (2007). *Chapter 3 Enteric Hepatitis Viruses*. *Perspectives in Medical Virology*, Volumen 17. Pages 39-67. Recuperado en 21 de febrero de 2022, de [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17003-8](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17003-8)
- Polaczyk, A. L., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Hahn, D., Roberts, J. M., Amburgey, J. E., & Hill, V. R. (2008). Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of microbiological methods*, 73(2), 92-99.
- Romero Placeres, Manuel, Álvarez Toste, Mireya & Álvarez Pérez, Adolfo. (2007). *Los factores ambientales como determinantes del estado de salud de la población*. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 45 (2) Recuperado en 21 de febrero de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032007000200001&lng=es&tlng=es
- Saavedra, M., Tovar, C., & Betancourt, W. Q. (2012). *Virus entéricos en Ambientes Acuáticos: Métodos*

- De Concentración y detección*. *Interciencia*, 37(4), 260–265.
- Salas-Plata Mendoza, J. (2006). *Problemática del agua y crecimiento urbano en Ciudad Juárez, Chihuahua*. *Cultura Científica y Tecnológica*, ISSN-e 2007-0411, Volumen 3, Número 14-15, 2006.
- Solomon, E. P., Berg, L. R., & W, M. D. (2011). *Biology*. Ninth Edit. Brooks Cole.
- Toledo, V. (2005). *La memoria tradicional: la importancia agroecológica de los saberes*. *LEISA Revista de Agroecología*, abril 2005.
- Trujillo, M. E., Beltrán, R., Garcia, G., Chávez, F., Blanco, M. Á., Sarmiento, R. E., & Bolaños, D. (2017). *La Virología en México. Situación actual, retos y oportunidades*. *Academia Mexicana de Ciencias*, 216. Recuperado el 30 de octubre de 2021, de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/La_Virologia_en_Mexico_Situacion_Actual_4.pdf
- Van Heerden, J., Ehlers, M. M., Vivier, U. C., & Grabow, W. O. K. (2005). *Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water*. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 926–933. Recuperado el 16 de octubre de 2021, de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02650.x>
- Vázquez Mendoza, D. L. (2018). *Etiqueta Chinampera: una herramienta para la conservación de Xochimilco y del axolote*, Ciudad de México.
- Veas-Ayala, N., Quesada-Román, A., Hidalgo, H. G., & Alfaro, E. J. (2018). *Humedales del Parque Nacional Chirripó, Costa Rica: características, relaciones geomorfológicas y escenarios de cambio climático*. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1436-1448.
- Vidal, G., Enrique, J., Rodríguez, P., Pauleth, B., Zurita, Q., Viviana, M., & Feijoo, M. (2020). *Insuficiencia hepática causada por Hepatitis b* *Hepatic impairment caused by hepatitis b* *Insuficiència hepática causada por hepatite b*. 4(1). Recuperado el 28 de octubre de 2021, de [https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.\(1\).enero.2020.384-394](https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.(1).enero.2020.384-394)
- Vivier, J. C., Ehlers, M. M., & Grabow, W. O. K. (2014). *Detection of enteroviruses in treated drinking water*. *Water Research*, 38(11), 2699–2705. Recuperado el 1 de noviembre de 2021, de [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00433-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00433-X)
- Vu, D.-L., Bosch, A., Pintó, R. M., & Guix, S. (2017). *Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond*. Recuperado el 21 de septiembre de 2021, de <https://doi.org/10.3390/v9020033>
- World Health Organization. (1979). *Human viruses in water, wastewater and soil: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 23 to 27 October 1978]*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2011). *Guidelines for drinking- water quality*. *WHO Chronicle*, 38(3), 104–108.
- Zambrano, L., Valiente, E., & Vander Zanden, M. J. (2010). *Food web overlap among native axolotl (Ambystoma mexicanum) and two exotic fishes: carp (Cyprinus carpio) and tilapia (Oreochromis niloticus) in Xochimilco, Mexico City*. *Biological Invasions*, 12(9), 3061-3069.