

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Validación del método para la concentración, determinación y cuantificación de indicadores virales de contaminación fecal de origen humano en aguas recreacionales”

HERNÁN ANDRÉS HERRERA FERNÁNDEZ

LUIS ALBERTO SALGUERO DE PAZ

SUHEIRY ELCIRA RODRÍGUEZ DUARTE

Para optar al título de
QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, octubre de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**“Validación del método para la concentración, determinación y cuantificación
de indicadores virales de contaminación fecal de origen humano en aguas
recreacionales”**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por

HERNÁN ANDRÉS HERRERA FERNÁNDEZ

LUIS ALBERTO SALGUERO DE PAZ

SUHEIRY ELCIRA RODRÍGUEZ DUARTE

Para optar al título de
QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, octubre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darnos la fortaleza y sabiduría para culminar una de las metas de nuestra vida profesional.

A NUESTROS PADRES

Por su amor incondicional, apoyo y comprensión que nos han brindado desde siempre.

A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por brindarnos los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

A Licda. LETICIA CASTILLO, Dra. KARIN HERRERA, Licda, MARIA LUISA GARCÍA DE LÓPEZ, Lic. MARTÍN GIL, Msc. MARIA EUGENIA PAREDES y Lic. FEDERICO NAVE.

Por su orientación y asesoría para el desarrollo de la investigación.

A EL LABORATORIO NACIONAL DE SALUD, AL LABORATORIO DE AGUAS DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA, CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONCYT)

Por permitir y proporcionar la ayuda necesaria para el desarrollo de la investigación.

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.
Licda. Liliana Vides de Urizar
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales
Br. Julio Alberto Ramos Paz

Decano
Secretario
Vocal I
Vocal II
Vocal III
Vocal IV
Vocal V

ÍNDICE

Contenido	Pág.
I. Ámbito de la Investigación	1
II. Resumen	4
III Antecedentes	
A. El Agua	4
1. Disponibilidad del Agua	4
2. Usos del agua en Guatemala	6
3. Calidad del agua en Guatemala	8
4. Tratamiento del agua residual en Guatemala	9
5. Legislación sobre el agua en Guatemala	10
B. Origen de las infecciones transmitidas por el agua	10
1. Infecciones transmitidas por virus	12
2. Epidemiología de las infecciones transmitidas por el consumo de agua	13
C. Virus y sus generalidades	14
1. Virus presentes en el agua	16
D. Virus como indicadores de contaminación fecal	20
1. Ventajas de los virus como indicadores de contaminación fecal	20
2. Desventajas de los virus como indicadores de contaminación fecal	21
3. Importancia de la determinación de virus en aguas	21

E. Otros microorganismos indicadores de contaminación fecal	22
1. Bacterias	22
F. Métodos para la concentración y cuantificación de virus	24
1. Métodos de concentración	24
2. Métodos de detección e identificación de virus	26
III. Justificación	29
IV. Objetivos	30
V. Hipótesis	31
VI. Materiales y Métodos	31
A. Universo de trabajo	32
B. Muestra	32
C. Recursos humanos	32
D. Recursos institucionales	33
E. Recursos Materiales	34
F. Metodología	36
G. Diseño de la investigación	40
VII. Resultados	42
VIII. Discusión de Resultados	44
IX. Conclusiones	47
X. Recomendaciones	48

XI. Referencias	49
XII. Anexos	59

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo forma parte de los proyectos de investigación científica financiados por la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT). Estos proyectos buscan obtener información novedosa sobre la calidad microbiológica del medio ambiente y la salud humana en Guatemala y se realizan dentro de un marco de colaboración entre la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y el Laboratorio de Agua y Alimentos de la Universidad de Barcelona, España.

El agua residual de origen urbano, de hospitales, animal, de la industria y otras representan la principal fuente de patógenos introducidos al medio ambiente, como los virus que son considerablemente estables a las condiciones adversas del medio ambiente. Según información facilitada por la Organización Mundial de la Salud, considerando únicamente las enfermedades diarreicas, frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año, mayoritariamente niños menores de 5 años alrededor del mundo. Dentro de las enfermedades infecciosas, los virus son los principales causantes de brotes relacionados con la contaminación del agua y los alimentos en los países más desarrollados. En Guatemala no existe una infraestructura sólida para el tratamiento de las aguas residuales, por tanto es de suponer que muchas de la infecciones en la población se deban al consumo de agua y alimentos contaminados con agua residual (WHO, 2009).

El presente trabajo tubo como finalidad evaluar nuevas metodologías para la concentración y detección de virus patógenos contaminantes de agua. Las técnicas que se implementaron permitirán en un futuro más cercano, evaluar la calidad microbiológica del agua empleando adenovirus humanos como microorganismo indicador, así como caracterizar la presencia de los principales virus responsables de brotes de gastroenteritis relacionados con agua contaminada para uso y consumo humano.

II. RESUMEN

El presente trabajo tubo como finalidad evaluar nuevas metodologías para la concentración y detección de virus patógenos contaminantes de agua. Las técnicas que se implementaron permitirán en un futuro más cercano, evaluar la calidad microbiológica del agua empleando adenovirus humanos como microorganismo indicador, así como caracterizar la presencia de los principales virus responsables de brotes de gastroenteritis relacionados con agua contaminada para uso y consumo humano.

Se llevó a cabo un estudio experimental, enfocado en la validación de una metodología de floculación orgánica para concentrar partículas víricas, usadas como indicadores de contaminación fecal, dicha metodología es una herramienta útil y novedosa. Para establecer y estandarizar el método de concentración, cuantificación y detección de virus, se realizaron Procedimientos Operativos Estándares (POES) los cuales quedaron implementados en el Laboratorio Nacional de Salud.

Se evaluó la reproducibilidad y precisión de la metodología de concentración y detección de partículas víricas, mediante la determinación cuantitativa de HAdV recuperados a partir de diez litros de agua de mar, utilizando el ensayo de qPCR. En un total de 6/10 (60%) de las muestras se detectó genoma vírico, probablemente el porcentaje de las muestras negativas 4/10 (40%) se pudo deber a la presencia de posibles inhibidores víricos presentes en las muestras de agua de mar, como la alta concentración de sal, oleaje y la falta de una centrifuga adecuada. Sin embargo, en estos porcentajes se consideró como aceptable la reproducibilidad del método anteriormente descrito.

El estudio mostró una baja eficiencia de recuperación de partículas virales en el agua de mar (0.20% que fue el mayor porcentaje de recuperación), debido a factores que se explicaron anteriormente. En las muestras de agua de río se obtuvo un porcentaje aceptable de recuperación vírica de Adenovirus humano (12.13% que fue el mayor porcentaje de recuperación). En el agua de lago, fue donde se obtuvo la mejor eficiencia de recuperación de partículas víricas con un porcentaje de (54.90% que fue el mayor porcentaje de recuperación).

La detección de virus entéricos de origen humano, por técnicas de Biología Molecular, desarrolladas, proporciona la máxima sensibilidad y especificidad, pues permite obtener datos reales sobre patógenos presentes en el ambiente. La evaluación de la metodología se efectuó mediante un ensayo interlaboratorio con el laboratorio de aguas de la Universidad de Barcelona permitió evaluar la metodología de qPCR en el Laboratorio Nacional de Salud; para la comparación de la metodología de detección y cuantificación viral se analizaron réplicas del estándar de Adenovirus humano, con diluciones que van desde la 10^{-1} a la 10^{-6} , obteniendo un total de 7 réplicas analizadas. Los estándares fueron medidos al mismo tiempo en ambos laboratorios, y la comparación se realizó por medio de la prueba de hipótesis para diferencias pareadas por t de student, en donde: $H_0: \mu_d=0$ (μ_d = promedio de las diferencias), a un nivel de significancia alfa (α) de 0.05. Al comparar los valores obtenidos se puede inferir que existió poca dispersión, ya que el promedio de las diferencias $\mu_d = 0.86$ en las diluciones con respecto a la media correspondiente, dicha desviación fue menor para el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala.

Se puede concluir que se considera factible, sensible, específica y confiable la metodología de cuantificación viral, implementada en el Laboratorio Nacional de Salud durante los años 2012 y 2013.

III. ANTECEDENTES

A. El Agua

El agua (H₂O), es un líquido insípido, incoloro e inodoro, que en su composición pura es difícil de obtener debido a que cualquier sustancia es soluble en ella, es utilizada por todos los seres que habitan en la tierra para su desarrollo, siendo ésta parte esencial para la vida. El agua juega un papel importante en los seres vivos, pudiéndose decir que es una fuente primordial para la vida. Del total de agua distribuida en el planeta, un gran porcentaje de ésta, 97% no es utilizable para el consumo humano, debido a que ésta se encuentra en los mares y océanos, por lo tanto el 3%, restante sería la reserva de agua dulce. De este 3% el 79% está en la cresta de los glaciares; el 20% se encuentra en aguas subterráneas y solamente el 1% se halla en las superficies accesibles, del cual el 52% se encuentra en lagos; 38% se halla en la humedad del suelo; 8% que corresponde al agua contenida en la atmósfera; 1% es agua que está en los organismos vivos y el otro 1% restante se encuentra en ríos y arroyos (Rodríguez Mellado y Marín Galvín, 1999; Roldán, 1992; Solórzano Ponce, 2005).

1. Disponibilidad del Agua

El país como un todo parece estar solvente del riesgo hídrico puesto que tiene una oferta total estimada anual de 97,120 millones de metros cúbicos y la posibilidad per cápita/año es de 7,873 metros cúbicos, cantidad 7 veces mayor a los 1000 metros cúbicos que son considerados como mínimo en las necesidades básicas que una persona necesita al año, denominado también “estrés hídrico”. Existen zonas en las cuales ya se manifiesta estrés hídrico, en los sitios tradicionalmente llamados zonas secas del país, Zacapa, Chiquimula y Jutiapa, y en las partes altas del altiplano (Cobos C y Colom E, 2005; Mutz, 2004).

La amplia disponibilidad de agua en Guatemala es consecuencia de su estratégica posición geográfica entre dos grandes masas de agua, el Océano pacífico y el Océano Atlántico y el tránsito de los vientos húmedos que se originan en el Mar Caribe y en el

Océano Pacífico lo cual genera una precipitación de 2,034 mm que oscila entre 500 mm en el área de oriente hasta 6,000 mm en la parte noroccidental debido a la topografía, según informes de la Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia (SEGEPLAN). De este capital hídrico la sociedad guatemalteca usa aproximadamente el 10%. De este 10% un 40% se usa en la agricultura en tanto el porcentaje de uso doméstico es de aproximadamente 9%, incluyendo un 3% para uso industrial. El resto que corresponde a un 48% en su mayoría es utilizado para generar energía. Desafortunadamente mucho de este uso doméstico sucede en regiones urbanas densamente pobladas ubicadas en partes altas, lejos de las cuencas de los ríos como en la Ciudad de Guatemala, Quetzaltenango, Chimaltenango, Huehuetenango entre otras. Dicha ubicación genera presiones extremas en estos recursos. Además la alta densidad poblacional genera altos niveles de contaminación de aguas no tratadas que vuelven a las fuentes hídricas contaminándolas (Cobos C y Colom E, 2005; (FUNDESA), 2012; Mutz, 2004; (SEGEPLAN), 2006).

Cerca de 3 millones de guatemaltecos carecen de servicios mejorados de agua y casi 6 millones no cuentan con servicios de saneamiento. Solo un 15% potabiliza las aguas y solo un 5% hace tratamiento de aguas residuales. Otros datos registrados por la Fundación para el Desarrollo de Guatemala (FUNDESA) en el año 2012, indican que más del 22% de la población guatemalteca no cuenta con acceso a fuentes mejoradas de agua, cerca de un 40% de los recursos hídricos presentan algún grado de contaminación, y la inversión que hace el Estado de Guatemala por habitante, en cuanto a abastecimiento de agua y saneamiento, es menos de Q. 75 al año ((FUNDESA), 2011; Mutz, 2004).

Guatemala cuenta con una extensión territorial de 108,889 km², tiene sus principales fuentes de agua en vertiente del Atlántico o Mar de las Antillas, en donde, precisamente, no se encuentran asentados los principales conglomerados humanos, en contraste, la vertiente del Pacífico, que comprende la costa sur, la boca costa y el altiplano, concentra el mayor consumo de agua, por ser la región en donde se asientan los conglomerados más numerosos. Guatemala cuenta con 1,151 sistemas lacustres, 7 lagos, 365 lagunas y 779 lagunetas. Según el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN), estos recursos hídricos representan una superficie de agua de 950 km², además hay 38 grandes ríos con un caudal de

201,000 metros cúbicos por segundo. El 55% del territorio nacional lo forman cuencas internacionales, por las cuales un fuerte caudal de sus aguas drenan hacia países vecinos: 47.5% hacia México, 7% hacia El Salvador, 6% hacia Belice y el 0.5% hacia Honduras. Los datos anteriores refieren la importancia que tienen las cuencas nacionales en los países vecinos. Por ejemplo, los ríos Usumacinta, Culco, Selegua, entre otros, se dirigen al territorio mexicano, alimentando el río Grijalva, que es el principal recurso hídrico para la generación hidroeléctrica del sureste mexicano (Cobos C y Colom E, 2005; Mutz, 2004).

2. Usos del agua en Guatemala

De acuerdo a la información más reciente sobre la disponibilidad de agua en Guatemala,

Según su uso el agua se puede clasificar en:

a. Doméstico

La utilización del agua es para beber, preparación de alimentos, higiene personal, lavandería. En Guatemala partiendo de la información disponible en el censo de población y habitación del año 2002, según formas de abastecimiento, por área urbana y rural y por vertiente, 1.45 millones de hogares disponen de agua por tubería en su domicilio (66.3%); 0.2 millones de hogares poseen agua por tubería de acceso comunal o comunitario (8.3%); la tasa de cobertura de agua en forma apropiada es de 74.5%; por medio de pozos se abastece el 15.3% de hogares guatemaltecos y el 10.1% lo hace por medios precarios, ambos considerados como formas no apropiadas de abastecimiento (Castañón David, 2012; Rojas, 1989; Solórzano Ponce, 2005).

b. Industrial

Es el agua utilizada como materia prima o bien ingrediente en manufactura y/o fabricación. Por ejemplo se utiliza para el lavado de minivegetales, fabricación de medicamentos y cosméticos, para producir vapor en calderas, como refrigerante o calefacción

en procesos térmicos, como lubricante, etc. La industria primaria es consumidora de significativa cantidad de agua. Lamentablemente el Estado no lleva registros de consumo de agua para fines industriales ni los datos revelados por estas empresas son proveídos al Estado ni publicados para el acceso general de la población. Asimismo, la industria de la construcción es una actividad que no se puede producir sin agua. Estimaciones de la Escuela Regional de Ingeniería Sanitaria (ERIS), de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), indican que para construir una vivienda de 60 m² se requieren alrededor de 10 m³ de agua. Con base a ese indicador se ha podido estimar, muy a groso modo, el requerimiento de agua en esa rama de la actividad económica (Rojas, 1989; (SEGEPLAN), 2006; Elías Carlos Alberto, et al, 2005; Solórzano Ponce, 2005).

c. Agrícola

El principal uso de agua en Guatemala es el agrícola, que es el agua utilizada para riego y lavado de productos agrícolas: por ejemplo, para riego por goteo o aspersión en diferentes cultivos, en la elaboración de abono orgánico, etc. En Guatemala, la superficie dedicada a la agricultura es de 311,558 hectáreas de terreno, el cual el 80% de esa superficie se encuentra localizada en la vertiente del Océano Pacífico, donde se utiliza para la caña de azúcar y palma africana. Se consideró que en el país el agua para riego se utiliza exclusivamente en el período seco (seis meses por año), siendo el patrón de referencia de riego los cultivos de caña de azúcar, palma africana, banano o plátano, melón y brócoli. Además, se ha estimado el consumo de agua para otros fines agropecuarios (beneficio de café, agua para ganado, aves, recambio del espejo de agua en 1500 hectáreas de estanques que producen camarón y otros), cuya demanda de agua se estima en el 10% del equivalente actual en riego (Castañón David, 2012; Rojas, 1989; Solórzano Ponce, 2005).

d. Recreativo

Se refiere al agua utilizada para baño, natación, deportes acuáticos, etc. Por ejemplo, piscinas públicas y privadas; los sectores turísticos también requieren buena cantidad de agua (Castañón David, 2012; Rojas, 1989; Solórzano Ponce, 2005).

Spillman afirma que en Guatemala, el turismo se considera la segunda fuente de ingresos del país después del café. Los lagos y los ríos son una parte vital del paisaje de Guatemala. El lago de Atitlán, Lago de Petén Itza y el Lago de Izabal son particularmente importantes para la recreación. También importante es el río Dulce con su conexión al océano Atlántico (Spillman T, et al., 2000).

La superficie acuática total se estima en 1,093 kilómetros cuadrados con un gran potencial de desarrollo (Spillman T, et al., 2000).

3. Calidad del agua en Guatemala

Para el uso que se le da al agua en Guatemala es primordial que el agua sea de buena calidad, esto se logra con el adecuado tratamiento de las aguas residuales de varios tipos como el agua doméstica, industrial, agrícola y pluvial, al no ser tratadas estas aguas diversos microorganismos patógenos pueden llegar a verterse a las principales fuentes de agua en el país, afectando la calidad de esta y a personas que la consumen, sobre todo niños, mujeres embarazadas y personas que se enferman con mayor frecuencia (Menino M., 2006; Rojas, 1989; Solórzano Ponce, 2005).

Uno de los problemas fundamentales del recurso hídrico es la contaminación que recibe y el impacto directo que tiene en la salud de las personas. Los pocos estudios realizados al respecto, muestra parámetros que visualizan el impacto del problema. Por ejemplo, de las 331 municipalidades solamente 24 cuentan con plantas de tratamiento de agua potable (se encuentran registradas 49 plantas, 23 de ellas en la ciudad capital, de las cuales únicamente funcionan 15, es decir, solamente el 4,5% de los municipios le dan algún tipo de tratamiento al agua que consumen sus habitantes. Fuentes del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) señalan que solo el 15% de la población del área urbana recibe agua apta para consumo humano ((MSPAS), 2011; Mutz, 2004).

Análisis bacteriológicos de años anteriores al 2004 indicaban que el número de coliformes por cada 100 cm³ en promedio era de 1.68×10^9 , siendo el máximo estándar permisible de 1×10^3 (Mutz, 2004).

La identificación de microorganismos indicadores presentes y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas. Frente a las dificultades y a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con organismos indicadores, a diferencia de los patógenos, están presentes en el tracto gastrointestinal del humano, y conociendo que estos microorganismos indicadores están presentes en el agua, se puede inferir que en el agua exista la presencia de microorganismos patógenos (Campos, 1999).

4. Tratamiento del agua residual en Guatemala

El objetivo perseguido con el tratamiento es conseguir que el agua esté libre de microorganismos patógenos y de sustancias químicas que puedan afectar la salud del usuario (Queipo de Llano E., 2013).

Según Mutz junto con el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en los 223 centros urbanos con una población mayor a 2000 habitantes, que cuenta con sistemas de drenajes, únicamente 24 aplica tratamiento a sus aguas residuales, en tanto que el resto de la población que cuenta con drenajes, descargan las aguas residuales directamente a los ríos, causando graves problemas de contaminación ambiental, especialmente cuando la contaminación es en las cabeceras o en las partes altas de las cuencas ((MSPAS), 2012; Mutz, 2004).

Otros estudios de Mutz y datos proporcionados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, se ha determinado que las aguas residuales anuales de la ciudad de Guatemala, se estiman en más de 140 millones de metros cúbicos, y que las plantas de

tratamiento, funcionando idealmente, solamente pueden procesar el 5% de este caudal de contaminación ((MSPAS), 2011; Mutz, 2004).

5. Legislación sobre el agua en Guatemala

Guatemala no posee una administración nacional del agua ni cuenta aún con un marco jurídico que le permita la administración del recurso, su aprovechamiento y conservación. La Ley de aguas, aún no ha sido aprobada y la falta de información o consenso con las comunidades provocan enfrentamientos por regular el agua. A principios de 2005, se aprobó como iniciativa de ley, la Ley General del Agua, la cual establecía la creación de una institución que se encargaría de la administración del recurso hídrico en el país, sin embargo, al no haber existido consenso con diferentes comunidades indígenas del occidente del país, la ley fue rechazada en manifestaciones populares previo a su promulgación que estaba programada para mayo de 2005. En la actualidad se está tratando de lograr el consenso con diferentes sectores, organizaciones no gubernamentales y especialmente con comunidades indígenas que por siglos han manejado el recurso hídrico localmente y conservado sus fuentes de agua (Oliva Hernández, 2006).

B. Origen de las infecciones transmitidas por el agua

Las enfermedades como diarrea, disentería amebiana, disentería bacteriana, disentería balantidiar, gastroenteritis, poliomiелitis, meningitis, hepatitis, cólera y fiebre tifoidea son causadas por microorganismos patógenos como bacterias, virus y protozoarios, presentes en aguas contaminadas (Csuros & Csuros, 1999; McFeteters, 1990; (OMS), 2006).

Las enfermedades infecciosas se transmiten principalmente a través de excretas de seres humanos y animales, en particular de las heces. La utilización del agua contaminada con microorganismos patógenos en la preparación de alimentos conlleva a la aparición de diferentes enfermedades infecciosas ((OMS), 2006).

La falta de servicios de evacuación sanitaria de desechos y de agua limpia para beber es el motivo por el cual mundialmente existen más de 12 millones de defunciones por año, como consecuencia principalmente de infecciones gástricas (Davison & Meyers, 1992; (OMS), 2006; Ortiz, 2000; (USAID), 1990).

Existen diversos tipos de agentes patógenos que pueden transmitirse por el agua de consumo fecalmente contaminada. La gama de agentes patógenos cambian en función de factores variables como el aumento de las poblaciones de personas y animales, el incremento del uso de aguas residuales, los cambios de los hábitos de la población o de las intervenciones médicas, las migraciones y viajes de la población, y presiones selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o de recombinaciones de los agentes patógenos existentes, especialmente las bacterias. También existe una considerable variabilidad en la inmunidad de las personas, ya sea adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada por factores como la edad, el sexo, el estado de salud y las condiciones de vida. La transmisión por el agua de consumo es sólo uno de los vehículos de transmisión de los agentes patógenos transmitidos por vía fecal-oral. Pueden ser también vehículo de transmisión los alimentos contaminados, las manos, los utensilios y la ropa, sobre todo cuando el saneamiento e higiene domésticos son deficientes. Para reducir la transmisión de enfermedades por la vía fecal-oral es importante mejorar la calidad del agua y su disponibilidad, así como los sistemas de eliminación de excrementos y la higiene general (Hundesda, 2012; (OMS), 2006).

En Guatemala aunque existen medidas para el control y prevención de la contaminación de los principales recursos hídricos del país, no se han realizado estudios que apoyen la efectividad de estos centros de tratamientos de agua. El grado de contaminación de estos cuerpos de agua va en ascenso, y la causa principal es el grado de contaminación que existe generado por industrias, domicilios, hospitales y drenajes que no cuentan con un pre-tratamiento de estas aguas antes de verterlas ya sea en drenajes, ríos, lagos y mares (Ortiz, 2000).

Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son el grupo de patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es costoso (Ayres y Wescot, 1987).

1. Infecciones transmitidas por virus

Una gran cantidad de virus de origen humano se excretan a través de las heces y la orina de individuos sanos que son portadores, además de los enfermos. Estas llegan a las aguas residuales y se dispersan en el medio, pudiendo llegar a contaminar posibles fuentes de abastecimiento de agua y alimentos que se convierten en focos potenciales de infecciones. En estos medios la concentración de virus suele ser habitualmente muy baja. En muchos brotes de enfermedades de transmisión hídrica presumiblemente de origen vírico, es difícil identificar el agente etiológico debido a la falta de métodos lo suficientemente sensibles y fiables (Pina S. 2001).

La alta prevalencia de virus entéricos en el medio ambiente, causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos. Muchos virus son transmitidos por vía oral, produciendo infecciones sub clínicas y en una pequeña parte de la población infección sintomática. Algunos virus que infectan a los seres humanos, prevalecen en el ambiente, dando lugar a enfermedades mortales, como la Hepatitis aguda en adultos y gastroenteritis en niños (Rotavirus). El desarrollo de la enfermedad está relacionado con la dosis infecciosa del agente viral, la edad, estado inmunológico y nutricional de la persona infectada, así como la disponibilidad de cuidado de la salud. (Bofill et. al, 2013).

Desde el punto de vista de salud pública, los virus entéricos son el grupo de patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el diagnóstico a nivel de laboratorio es costoso (Ayres y Wescot, 1987).

2. Epidemiología de las infecciones transmitidas por el consumo de agua

a. Epidemiología en Guatemala

Citado en el informe del año 2012, en el año 2011 el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), reportó que de las enfermedades transmitidas por el consumo de agua, 80 fueron casos clínicos de cólera en diferentes puntos del país, predominando 38 casos en el área de Totonicapán ((CNE), 2012).

Además, 988 casos de gastroenteritis fueron por rotavirus, lo que afectó principalmente a infantes comprendidos entre las edades de 3 a 24 meses provocándoles diarrea, vómitos y severos cuadros de desnutrición según el Centro Nacional de Epidemiología. Los departamentos que más casos reportaron son: El Quiché, Huehuetenango, Quetzaltenango, Petén sur-oriental y El Progreso((CNE), 2012).

En datos registrados sobre la hepatitis A, se reportaron que el departamento con la tasa más alta fue el Departamento de Izabal con 33.14 que corresponde a 137 casos, el total de las infecciones por hepatitis A fue de 224 casos ((CNE), 2012).

Ante el incremento de casos nuevos de gastroenteritis en el país, los virus más vigilados son los mencionados anteriormente sobre todo rotavirus y hepatitis A, debido a que son los causantes de la alta morbilidad en niños menores de 5 años ((CNE), 2012, (MSPAS), 2011).

C. Virus y sus generalidades

Los virus constituyen un grupo único de agentes infecciosos, cuya característica diferencial reside en su organización simple y acelular, así como en su patrón de reproducción. Una partícula vírica completa o virión consta de una molécula de ADN o de ARN rodeados por una cubierta de proteínas, y a veces por otras capas. Estas capas añadidas pueden ser muy complejas en contener hidratos de carbono, lípidos y proteínas adicionales (Prescott, Harley y Klein, 1999).

Los virus pueden existir en dos fases: extracelular e intracelular. En estado extracelular al virus también se le puede llamar virión, y es una partícula minúscula que contiene ácidos nucleicos rodeado por proteína y es metabólicamente inerte y carece de funciones respiratorias y biosintéticas. En la fase intracelular los virus existen principalmente como ácidos nucleicos que se replican y que inducen al metabolismo del huésped a sintetizar componentes del virión, para luego ser formado y liberado de la célula (Prescott, Harley y Klein, 1999).

Los virus se diferencian de células vivas en varios aspectos:

- Son parásitos obligados.
- Su organización es simple y acelular.
- Presencia de ADN o ARN, pero no ambos.
- Su incapacidad para replicarse de forma independiente, requieren de células animales, vegetales o bacterianas para cumplir su ciclo replicativo.
- No presentan sistemas enzimáticos propios productores de energía, necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, ribosomas, etc.
- La replicación viral es dependiente de las actividades metabólicas de las células hospederas (Prescott, Harley y Klein, 1999; Ruchansky D., 2013).

La morfología viral ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas, debido a la importancia de los virus por el incremento de enfermedades infecciosas de origen

desconocido, con esto se inicia el estudio de la estructura de los virus y al comportamiento de estos microorganismos dentro de las células del hospedero. El progreso de los estudios realizados a la morfología viral han surgido del uso de diferentes técnicas: el microscopio electrónico, la difracción de rayos X, los análisis bioquímicos y estudios inmunológicos. La estructura de un virus según Ruchansky es simple, pero a pesar de esto existe cierta diversidad que es usada para la clasificación de estos microorganismos. El tamaño de los viriones, oscila entre unos 10 y 300 o 400nm de diámetro (Prescott, Harley y Klein, 1999; Ruchansky D., 2013).

Todos los viriones, incluso si poseen otros constituyentes, están contruidos alrededor de un núcleo constituido por la nucleocápside, la cual está formada por un ácido nucléico ADN o ARN contenido en el interior de una cubierta proteica denominada cápside, que Ruchansky afirma que está formada por numerosas copias de proteínas, que protegen al material genético viral y ayuda a su transferencia entre las células huésped (Prescott, Harley y Klein, 1999; Ruchansky D., 2013).

Existen cuatro tipos morfológicos estructurales y generales de viriones:

- Algunas cápsides tienen forma icosaédrica. Estas cápsides parecen esféricas cuando se observan a pocos aumentos en el microscopio electrónico.
- Otras cápsides son helicoidales y su forma es similar a los cilindros proteicos huecos que pueden ser rígidos o flexibles.
- Muchos virus tienen una envoltura, una capa externa membranosa que rodea a la cápside o la nucleocápside. Los virus con envoltura tienen una forma variable, irregularmente esférica, aunque su nucleocápside puede ser icosaédrica o helicoidal. Esta envoltura está constituida por lipoproteínas de origen celular en las que se insertan glicoproteínas.
- Los virus complejos tienen una simetría de la cápside que no es puramente icosaédrica ni helicoidal. Pueden poseer colas y otras estructuras o tener paredes complejas de múltiples capas rodeando al ácido nucléico. Tanto las cápsides helicoidales como las icosaédricas son estructuras macromoleculares grandes constituidas por muchas copias

de uno o de unos pocos de subunidades proteicas o protómeros (Flint S. et al., 2009; Prescott, Harley y Klein, 1999; Ruchansky D., 2013).

1. Virus presentes en el agua

a. Adenovirus (HAdV)

Los adenovirus se aislaron por primera vez en un cultivo de células adenoides humanas. Desde entonces se han identificado 100 serotipos, de los cuales por lo menos 47 son capaces de infectar al ser humano, estos se han clasificado en 6 subgrupos que van de la A-F (Murray, et al., 2006).

Los primeros adenovirus humanos que se identificaron numerados del 1 al 7, son los más habituales. Los trastornos habituales provocados por los adenovirus son, infección de vías respiratorias, conjuntivitis, cistitis hemorrágica y gastroenteritis (Murray, et al., 2006).

i. Morfología y estructura

Los adenovirus humanos son virus de ADN bicatenario con un genoma compuesto por unas 36,000 pares de bases, este genoma está formado por una molécula bicatenaria lineal de ADN con una proteína terminal (peso molecular 55kDa). Los viriones son no encapsulados de un diámetro entre 70 y 90 nm. La cápside consta de 240 capsómeros formados a su vez por hexones y pentones (Murray, et al., 2006).

ii. Estabilidad

La partícula vírica es resistente a pH ácido, a la bilis y enzimas proteolíticos, lo que permite la multiplicación en el intestino humano (Allard, 1992).

Asimismo, la ausencia de membranas o estructuras lipídicas hacen que sean resistentes a disolventes orgánicos, son también resistentes a la desecación e incluso a un tratamiento leve con cloro (Green & Pina, 1963; Murray, et al., 2006).

iii. Replicación

La infección se inicia con la unión de las fibras al receptor de la superficie de células permisivas, y la internalización posiblemente por endocitosis. Una vez en el endosoma, una bomba proteica dependiente de ATP hace que disminuya el pH, con lo que se altera la carga neta de la cápside vírica. La interacción de la cápside vírica con la membrana lipídica produce la ruptura del endosoma, permitiendo el transporte del virión hasta el núcleo celular. La cápside remanente se pierde durante la liberación del core dentro del núcleo. La replicación del ADN, la transcripción y la maduración de los adenovirus tiene lugar en el núcleo celular (Sharp & Wadell, 1995).

iv. Epidemiología

Las infecciones por Adenovirus están muy extendidas a escala mundial. Con mayor frecuencia las infecciones por HAdV se producen en niños menores de 4 años y con menor frecuencia en adultos (Sharp & Wadell, 1995).

La transmisión de los HAdV puede ocurrir en forma de casos esporádicos o en brotes epidémicos. La vía de transmisión depende en gran medida del serotipo y de la enfermedad asociada, pudiendo transmitirse a través de secreciones orgánicas, transmisión aérea (por ejemplo: aerosoles generados por tos o estornudos), transmisión hídrica (por ejemplo: brotes de conjuntivitis asociados a piscinas, por mala cloración del agua), transmisión fecal-oral (van Heerden, Ehlers, Vivier, & Grabow, 2005).

b. Poliomavirus

El virus JC (VJC) pertenece al género *Polyomavirus*, escindido desde hace unos años de los *Papoviridae* para constituir una familia propia, que acoge también a los virus BK y SV40 y a otros recientemente caracterizados (Jiang, J, Johnson, & Imperiale, 2009; van Regenmortel, Fauquet, et al., 2000).

Tanto el poliomavirus humanos JC y BK son ubicuos, aunque generalmente no producen enfermedades y son difíciles de cultivar en cultivos celulares (Murray, et al., 2006).

i. Morfología y estructura

Las partículas víricas de poliomavirus presentan una cápside de simetría icosaédrica con un diámetro entre 40 y 50 nm. El virión contiene una doble cadena de ADN (ADN de doble cadena, 5000 pares de base, genoma circular), resistente a la desecación a temperatura ambiental, son resistentes al calor relativo, pero no resistente al éter. Se pueden inactivar con la exposición prolongada a temperatura de 50 °C, por acción proteolítica y por luz ultravioleta (Romero Cabello, 2007).

ii. Replicación

Una vez que el virus ha entrado a la célula, su ADN se libera e introduce en el núcleo. Los genes de expresión temprana codifican los antígenos grandes T y pequeños t, unas proteínas que estimulan el crecimiento celular. La replicación vírica necesita la maquinaria de transcripción y replicación del ADN proporcionada por la célula en crecimiento. Las células permisivas permiten la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de expresión tardía del virus y la replicación vírica, lo cual provoca la muerte celular. En la actualidad se conocen con detalle algunos de los mecanismos que permiten a los antígenos T (grandes, medianos y pequeños) de poliomavirus transformar células en cultivo, e involucran la interacción con un número elevado de proteínas celulares, cuya función se ve alterada como consecuencia de esta interacción (Murray, et al., 2006).

La proteína más importante dentro de las que se transcriben antes de la replicación de proteínas tempranas es el antígeno T. Las funciones de este antígeno son numerosas: participa en la regulación de la transcripción y en la replicación e interactúa con el ADN, el ARN y las proteínas celulares. A la proteína T se le atribuyen funciones de inducción del crecimiento, y podría participar en la transformación tumoral (Walker, Padgett, Zurhein, Albert, & Marsh, 1973; Weber & Major, 1997).

De las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, la mayor es VP1, responsable de la conformación de la estructura icosaédrica y que contiene los epitopos para la inducción de anticuerpos y reconocimiento (Cole, 1995; Sabath & Major, 2002; Safak, Barruco, et al. 2001).

La secuenciación genética de poliomavirusJC, especialmente de VP1, ha permitido definir al menos 7 diferentes genotipos, de entre los que el más numeroso en europeos y americanos es el 1 (Agostini, Ryschkewitsch, et al., 1998; Sala, Kousignian, et al., 2001).

Existen 2 posibles estados del virus: actividad/lisis celular y latencia. Inicialmente, los viriones se unen a receptores de membrana de las células próximas y son transportados al núcleo. La transcripción del genoma viral durante la infección se divide en 2 fases: precoz (antes de la replicación del ADN) y tardía (después). El ciclo lítico comienza con la expresión de la proteína temprana T (Gordon, Gallia, et al., 2000).

Según la estructura de la región reguladora, las líneas de VJC se dividen en arquétipicas y reordenadas. Se cree que los arquétipos son los responsables de la propagación entre la población y de la infección latente, y son incapaces de replicarse de manera efectiva en células gliales (Ciappi, et al., 1999; Yogo, Kitamura, et al., 1990).

iii. Epidemiología

Los poliomavirus presentan distribución cosmopolita, infectan al hombre desde las edades pediátricas, una vez adquirido este virus se mantiene siempre en el organismo humano,

de forma que los adultos presentan anticuerpos específicos en más del 70% de los casos. Otro virus de la familia es el SV40, y sus anticuerpos específicos se han encontrado en personas que han tenido contacto con monos y algunos otros después de recibir la vacuna antipoliomielítica (Romero Cabello, 2007).

No se sabe con certeza la forma en que se transmiten los virus JC, BK, y SV40, sin embargo, se propone que pudiera adquirirse a través de la ingestión de aguas contaminadas con heces fecales de origen humano (Romero Cabello, 2007).

D. Virus como indicadores de contaminación fecal

Un microorganismo indicador de contaminación debe reunir las siguientes características: ser un constituyente normal de la microbiota intestinal de individuos sanos; estar presente de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos; estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están; presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación; debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos; su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de los microorganismos patógenos (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal); debe ser fácil de aislar y cuantificar; no debe ser patógeno. Los virus reúnen muchas de las características mencionadas anteriormente, son pocas las características que no poseen, una de estas podría ser, no encontrarse en grandes cantidades en algunos tipos de agua, por lo que se requiere que las muestras sean en volúmenes grandes. Otra que se podría mencionar es que los procesos de cuantificación son un poco costosos por lo tanto es difícil de obtenerlos. No existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal y apenas algunos grupos satisfacen algunos de estos requisitos (Campos, 1999).

1. Ventajas de los virus como indicadores de contaminación fecal

Los virus indican el origen y la fuente de contaminación fecal en el agua. La principal ventaja que presentan los virus, sobre las bacterias, es que estos son más resistentes a los

procesos de destrucción-inactivación, por lo que la resistencia de estos a factores ambientales es igual o mayor que la de los patógenos (Bofill Mas, et al., 2011).

2. Desventajas de los virus como indicadores de contaminación fecal

Una desventaja que pueden presentar los virus, sobre las bacterias, es que los procedimientos de aislamiento e identificación son mas sencillos en las bacterias que en los virus (Bofill Mas, et al., 2011).

3. Importancia de la determinación de virus en agua

Se ha propuesto dos grupos de virus ADN como indicadores de la presencia de patógenos humanos en el ambiente. Estos virus son el adenovirus humano (HAdV) y poliomavirus JC humano. Estos se han propuestos ya que son virus muy estables en el ambiente y son excretados en las heces y orina (poliomavirus JC humano) por los humanos que no presentan un cuadro clínico (Bofill Mas, et al., 2006).

Más de 140 virus patógenos y gran variedad de bacterias y protozoos pueden ser transmitidos al hombre a través del agua. Estos son microorganismos entéricos eliminados a través de las heces de personas infectadas. Los más comunes son bacterias, protozoos causantes de gastroenteritis y los virus de la hepatitis. Algunos de estos microorganismos (como rotavirus) no generan una protección inmunitaria a largo plazo por lo que la infección puede repetirse varias veces a lo largo de la vida. Acerca de los virus se sabe que, aún en bajas concentraciones, tienen la capacidad de causar infección o enfermedad (Schwartzbrod, 1995).

Los adenovirus humanos y los JC poliomavirus funcionan correctamente como indicadores, ya que al detectarlos se determina la presencia de microorganismos patógenos como el virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, rotavirus, astrovirus, norovirus, como la presencia de patógenos bacterianos como *Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter*, siendo estos últimos los causantes más frecuentes de gastroenteritis bacteriana. Otros agentes

patógenos como *Yersinia* y *Campylobacter* se encuentran relacionados con brotes en agua y peces contaminados (Griones, et al., 2010).

Respecto a los protozoarios, los indicadores adenovirus humano y JC poliomavirus correlacionan con la presencia de los géneros *Cryptosporidium*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Cyclospora*, *Toxoplasma* y microsporidios en muestras de agua que pueden ser causantes de gastroenteritis (Girones, et al., 2010).

Los colifagos se relacionan directamente con su huésped bacteriano específico *E. coli*. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, los coliformes fecales no son buenos indicadores de contaminación fecal, ya que desaparecen rápidamente. Por consiguiente es mejor usar microorganismos más resistentes, como los colifagos que reflejan mucho mejor los niveles de *Salmonella* (Borrego, et al., 1987).

Los coliformes están presentes en números bajos en las heces humanas y de animales homeotérmicos, pero están en número elevado en aguas residuales. Invariablemente estarán en aguas que contienen *E. coli* y por tanto serán indicadores de contaminación fecal. Por ser más resistentes a los factores ambientales y a la cloración que los coliformes y que todas las bacterias en general, su presencia en plantas potabilizadoras indica fallas en algún paso del tratamiento, en especial en la cloración. El tercer grupo propuesto, son los fagos que infectan *Bacteroides fragilis*. Este grupo presenta la ventaja de no replicar en ambientes naturales, dado que infectan una cepa anaerobia y su multiplicación se realiza solo bajo estas condiciones. Por otro lado su aislamiento se realiza en la mayoría de los casos en heces humanas (Kott, Ben Ari, & Vinour, 1978; Yates, 1992).

E. Otros microorganismos indicadores de contaminación fecal

1. Bacterias

Las bacterias, que son los microorganismos más utilizados como indicadores de contaminación fecal, se encuentran en el agua cuando ésta es contaminada, con el contenido

procedente del tracto gastrointestinal del hombre y otros animales. El grupo de bacterias más utilizado, como indicador, es el de los coliformes. El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana, ya que estos, son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente; permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas; se comportan de igual manera que algunas bacterias patógenas en los sistemas de desinfección. Los coliformes fecales y *E. coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras. Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, capaz de fermentar la lactosa a 44.5°C (Madigan, et al., 1997).

Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Otro de los aspectos negativos del uso de los coliformes totales como indicador es el hecho de que algunos coliformes son capaces de multiplicarse en el agua (Madigan, et. al., 1997).

a. Ventajas de las bacterias como indicadores de contaminación fecal

Los métodos empleados para la detección de este grupo de microorganismos son más económicos que el empleado en detección de virus. La metodología bacteriana para identificación es más sencilla y rápida que la de los virus (Madigan, et. al., 1997).

b. Desventajas de las bacterias como indicadores de contaminación fecal

Las bacterias no proporcionan el origen y la fuente de la contaminación. Las bacterias presentan una resistencia más reducida a los procesos de desinfección que los virus (Madigan, et. al., 1997).

F. Método para la concentración y cuantificación de virus

1. Métodos de concentración

Las aguas residuales urbanas contienen la suficiente concentración de virus que permiten la detección directa, o tras una etapa sencilla de concentración. Pero en ocasiones los virus entéricos se encuentran en el medio acuático en cantidades muy pequeñas, lo que hace necesario la concentración de grandes volúmenes de agua. Este paso constituye uno de los problemas principales de la virología ambiental (Calgua, et al., 2008).

La mayor parte de los métodos de recuperación de virus aprovechan las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Además tienen, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo (Calgua, et al., 2008).

Un buen método de concentración debe ser lo más simple, rápido y barato posible, debe proporcionar altas tasas de recuperación y ser aplicable a la recuperación de diferentes virus. El concentrado viral obtenido debe estar libre de posibles sustancias tóxicas o inhibidores presentes en las muestras, para que pueda ser utilizado en los procesos de detección subsiguientes (Calgua, et al., 2008).

Se han propuesto varios métodos de concentración, aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y a todo tipo de virus. La metodología debe escogerse en función de los diferentes factores:

- La concentración viral, variable según el tipo de agua y el virus de interés.
- El tipo de agua, ya que las variaciones en sus características físico-químicas y en la cantidad de materia orgánica afectan a la capacidad de agregación de lo virus, así como a la eficiencia de algunos métodos (Calgua, 2012).

a. Concentración de virus por floculación orgánica

La floculación orgánica aplicada comúnmente como método de concentración secundaria, se basa en la capacidad que tienen las proteínas para formar flóculos a pHs ácidos. Los virus presentes en solución son atrapados entre los flóculos permitiendo así su recuperación. Se utiliza el extracto de carne, la caseína o la leche descremada en polvo pues se ha descubierto que los virus poseen gran afinidad por este tipo de proteínas. Es una técnica sencilla, económica y rápida, aunque los resultados obtenidos dependen del virus (Calgua, et al., 2008; Lucena, et al., 1991).

La técnica de floculación es más efectiva utilizando como sustrato la leche descremada en polvo pues es mayor la afinidad que los virus presentan al tipo de proteínas que posee la leche. Para lograr la adherencia de los virus a la leche es necesario que esta tenga un pH aproximado a 3.5 y una conductividad igual o mayor a 1.5 mS, para que esta flocule y sea más eficiente el procedimiento (Calgua, et al., 2011; Lucena, et al., 1991).

Se conoce que los virus en el ambiente poseen carga negativa y al modificarse su pH haciéndolo más ácido por debajo de su pH isoelectrico (pHi), las partículas víricas cambian su carga a positiva, facilitando la unión de estas partículas a las flóculos de la leche (Calgua, et al., 2011; Lucena, et al., 1991).

b. Otros métodos de concentración de virus

i. Concentración de virus por filtración-elución

Los métodos de concentración por adsorción-elución sobre diferentes soportes responden a la capacidad de los virus para asociarse a diferentes materiales: membranas o cartuchos filtrantes, polvo de vidrio, lana de vidrio, sales metálicas, polielectrolitos insolubles, carbón activado. En estas uniones representan un papel fundamental la composición química de los soportes, la fuerza iónica y el pH del medio, y la presencia de materia orgánica en suspensión o proteínas (Lucena, et al., 1991).

ii. Concentración de virus por ultracentrifugación

Basada en la capacidad de los virus de precipitar cuando son sometidos a una fuerza centrífuga. Aplicable solo a pequeños volúmenes de agua, se ha utilizado con éxito para recuperar virus a partir de aguas con gran cantidad de materia orgánica o como método de reconcentración (Puig, et al., 1994).

iii. Concentración de virus por ultrafiltración

La ultrafiltración permite la separación mecánica de las partículas en función de su peso molecular. Se utilizan membranas con un diámetro de poro inferior al tamaño de los virus para permitir su retención. La suspensión vírica puede pasar a través de la membrana perpendicularmente o circular tangencialmente a la superficie. Son métodos de gran sensibilidad aunque el caudal de filtración suele ser pequeño y limitado por la colmatación de los filtros. Se ha aplicado comúnmente en muestras de aguas muy limpias y como método de concentración secundaria (Pina, 2001).

2. Métodos de detección e identificación de virus

En la mayoría de los casos el análisis virológico e identificación, se efectúa después del proceso de concentración de partículas víricas a partir de la muestra. Los sistemas de detección e identificación desarrollados son complejos, económicamente caros y se requiere de personal y equipamientos especializados (Primrose, et al., 2011).

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido la detección e identificación de bajas concentraciones de virus en muestras de diversos orígenes, proporcionando la máxima sensibilidad y especificidad. En la actualidad la mayoría de protocolos de detección e identificación de virus están basados en técnicas moleculares. La utilización de técnicas moleculares no implica la eliminación de la práctica de los métodos tradicionales. Las primeras permiten incrementar la sensibilidad y especificidad, y proporcionan resultados en el menor tiempo posible. Contrariamente, la detección molecular de virus no aporta información

sobre viabilidad de las partículas víricas, características evidenciadas únicamente mediante los estudios de inefectividad frente a células huésped (Primrose, et al., 2011).

a. Técnicas moleculares

Estas técnicas, que permiten manipular ácidos nucleicos in vitro (es decir, fuera de la células vivas u organismos) no constituyen una nueva disciplina, sino que son el resultado de desarrollos previos, durante los 50 años anteriores, de la bioquímica y de la biología celular. Esta nueva y poderosa tecnología ha revolucionado la virología y, en gran medida, ha desplazado el foco de atención de la partícula vírica, al genoma vírico (Primrose, et al., 2011).

i. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica innovadora utilizada en los análisis moleculares actuales, es la Reacción en Cadena de la Polímera (PCR), desarrollada en los años 80's por Kary Mullis. Esta técnica permite producir en el laboratorio un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica, incluso en millones (amplificarla), sin recurrir a la clonación. Como su nombre lo indica, se basa en la actividad de la enzima ADN Polimerasa, que es capaz de abrir una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos en el medio son los nucleótidos como adenina, guanina, timina y citocina; pues son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña molécula de ADN, que pueda unirse a la molécula que se quiere copiar, para que sirva como cebador o primer (Barrera H., et al., 1993; Cultek, 2009; Torres A. y Baca B., 1995).

El método se basa en las características de la estructura química del ADN y su replicación semiconservativa. Es decir, de acuerdo con el modelo de Watson y Crick, el ADN es un polímero formado por dos cadenas complementarias (cadenas antiparalelas), constituido por unidades desoxirribonucleótidos de cuatro bases nitrogenadas adenina, guanina, citocina y timina unidas al azúcar desoxirribosa. Para duplicarse, el ADN se separa en sus dos cadenas complementarias; así, cada una de ellas sirve de molde o plantilla. Al final del proceso se obtendrán dos moléculas de ADN, cada una de ellas formada por una cadena original y una

cadena complementaria que ha sido sintetizada (Persing, D., et al., 1993; Torres, A. y Baca, B., 1995).

Las dos cadenas de ADN se separan fácilmente cuando las uniones hidrógeno de las bases se rompen. Esto se realiza cuando una solución de ADN es calentada entre 77 y 100 °C. Las bases complementarias se reasocian espontáneamente para formar la doble hélice cuando la temperatura desciende (Torres, A. y Baca, B., 1995).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, pero presenta algunas desventajas, como que no es una técnica cuantitativa, y posee una alta probabilidad de tener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema, se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta, y realizar la adecuada manipulación de los reactivos. Para solventar los problemas de la cuantificación se ha generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a la PCR cuantitativa, o a la PCR tiempo real. La clave en la PCR cuantitativa, es la posibilidad de detectar en tiempo real, nuestro genoma de interés, para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherido una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe la fluorescencia, de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de un sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del inhibidor de la fluorescencia, y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (Cultek, 2009).

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a las consecuencias en la salud humana como enfermedades que ocasiona el consumo de agua contaminada por patógenos como virus, bacterias y parásitos, es importante que en Guatemala se lleven a cabo estudios de investigación que oriente a determinar cuál es el origen de la contaminación del agua.

Los virus como los adenovirus humanos y poliomavirus JC pueden ser utilizados como indicadores de contaminación fecal, ya que poseen ventaja sobre otros indicadores como *Escherichia coli* y *Enterococcus intestinalis*, estos virus poseen una mayor estabilidad en el ambiente que las bacterias y son buenos indicadores de la presencia de patógenos intestinales, ya que estos virus son excretados por los humanos cuando estos virus son adquiridos por la población. Por lo que es imprescindible contar con técnicas efectivas para la detección de estos indicadores virales (Bofill Mas, et al., 2011).

Es importante implementar metodologías vanguardistas para concentración de virus para luego estos ser identificados por técnicas moleculares. Estas metodologías de punta, permiten la determinación rápida y confiable de los virus causantes de gastroenteritis por contaminación fecal en las distintas aguas para uso y consumo humano.

Es necesario hacer un enfoque a los principales puntos geográficos con alta prevalencia de gastroenteritis en el país. En Guatemala, el Centro Nacional de Epidemiología, registra que en el año 2011 y 2012 tanto áreas del departamento de Petén como el departamento de Izabal poseen el registro de tasas más altas a nivel nacional de gastroenteritis.

El desarrollo de estas técnicas, abre un nuevo campo para investigación en las áreas de salud, industria y medio ambiente; por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales, y en análisis de aguas para consumo humano por mencionar algunos.

V. OBJETIVOS

A. General

Validar el método para la concentración, determinación y cuantificación de indicadores virales de contaminación fecal de origen humano en aguas recreacionales.

B. Específicos

1. Evaluar la precisión del método de concentración de partículas víricas.
2. Determinar la eficiencia de recuperación de partículas del método de concentración, empleando muestras artificialmente contaminadas y técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) tecnología Taq®Man.
3. Comparar los métodos de cuantificación viral entre el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala y el Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua y Alimentos de la Universidad de Barcelona.

VI. HIPÓTESIS

No se plantea hipótesis debido a que es un estudio descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

El universo de trabajo fueron muestras de río, lago y mar en donde se evaluó distintos parámetros estadísticos.

B. Muestra

Se evaluaron muestras de río, lago y mar contaminadas con estándar de Adenovirus y muestras sin contaminar, posteriormente se determinó el contenido vírico que las muestras poseen.

C. Recursos humanos

1. Investigadores:

- Br. Hernán Andrés Herrera Fernández (seminarista)
- Br. Luis Alberto Salguero de Paz (seminarista)
- Br. Suheiry Elcira Rodríguez Duarte (seminarista)

2. Asesores:

- Licda. Leticia Castillo Signor (Laboratorio Nacional de Salud)
- PhD. Karin Herrera (Universidad de San Carlos)
- Licda. María Luisa García de López (Universidad de San Carlos)

3. Co-Asesores:

- PhD. Rosina Girones (Universidad de Barcelona)
- PhD. Byron Calgua de León (Universidad de Barcelona)

4. Profesores de la Universidad de Barcelona que realizaron transferencia tecnológica:

- PhD. Byron Calgua de León (Universidad de Barcelona)
- PhD. Jesús Rodríguez Manzano (Universidad de Barcelona)
- PhD. Ayalquibet Hundesa Gonfa (Universidad de Barcelona)
- PhD. Laura Guerrero (Universidad de Barcelona)
- PhD. Marta Rusignol (Universidad de Barcelona)

5. Profesionales que apoyaron en el Laboratorio Nacional de Salud:

- Licda. Yolanda Mencos (Encargada Área de Virología)
- Licda. Leyla Dabroy (Encargada de Microbiología de Aguas y Alimentos)
- Licda. Maria del Carmen (Encargada de Aguas y Contaminantes de la Salud)
- Lic. Sergio Meneses (Área de Virología)
- Lic. Renato Torres (Aguas y Contaminantes de la Salud)

D. Recursos institucionales

1. Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, área de Virología y Microbiología de Aguas
2. Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Barcelona
3. Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología
4. Fondo para el Desarrollo Científico y Tecnológico 042-2011

E. Recursos materiales

1. Equipo

a. Equipo para concentración viral

- Centrifuga con capacidad de 250ml y velocidad de 8,000xg
- Envases de vidrio o plástico con fondo plano con capacidad de 250ml.
- Medidor de pH, termómetro y conductímetro
- Tubos cónicos con una longitud de 100-200cm
- Pipetas calibradas estériles descartables
- Tubos plásticos estériles de 1.5 y 10-15ml (Eppendorf)
- Agitadores magnéticos e imán
- Bomba peristáltica para extracción de sobrenadante
- Cronometro con capacidad para 8 a 10 horas
- Colector de desechos (bote plástico)

b. Equipo para determinación y cuantificación de virus PCR

- Vórtex
- Cabina de bioseguridad
- Campa de flujo laminar
- Congelador -20 °C
- Congelador a -80 °C
- Centrífuga
- Centrífuga placas RT-PCR
- Cubetas de 2ml para extracción de ADN
- Criobiales
- Criobox
- Incubadora a 37 °C

- Microcentrífuga
- Pipetas automáticas de 1 a 10 μ l, 5 a 50 μ l, de 10 a 100 μ l, 10 a 200 μ l y de 100 a 1000 μ l
- Puntas de pipetas rojas (1 a 10 μ l)
- Puntas de pipetas amarillas (5-50 μ l y de 10 -100 μ l)
- Puntas de pipetas azules (100-1000 μ l)
- Real Time PCR applied Biosystem
- Recipiente para descartar material bioinfeccioso
- Viales de almacenamiento de 1.5ml

2. Reactivos

a. Reactivos para concentración de virus

- Acido Clorhídrico (1N)
- Hidróxido de Sodio (1M)
- Leche descremada (Difco ref. 232100)
- Buffer de Fosfatos (PBS)
- Sales marinas artificiales (Sigma Ref. S9883)
- Estándar de Adenovirus a concentración de 53,700,000Cg/L.

b. Reactivos para determinación y cuantificación de virus PCR

i. Reactivos para extracción de ADN

- Buffer AVL (Buffer de lisis para la purificación del ácido nucléico viral)
- Buffer AW1 concentrado (Buffer para desnaturalizar proteínas en las muestras)
- Buffer AW2 concentrado (Buffer para la purificación de ADN)
- Buffer AVE (Buffer para disolver carrier ARN)

ii. Sondas y primers para extracción de ADN

- TaqManEnvironmental Master Mix 2.0
- Sonda de ADN de adenovirus humano AdP1 (5'-FAMCCGGGCTCAGGTA CTC-CGAGGCGTCCT-TAMRA-3') a una concentración final de 0.225µM
- Primers de ADN de adenovirus humano Adf (5'-CWTACATGCACATGKCSGG-3') y AdR (5'-CRCGGCARAAYTGCACCG-3') a una concentración final de 0.9µM

F. Metodología

1. Método de concentración de virus (Floculación orgánica)

a. Principio

La técnica consiste en llevar un volumen inicial con cierta concentración de virus presentes en la muestra a un volumen de menor cantidad, obteniendo un concentrado de virus significativo para ser identificados y cuantificados por medio de técnicas moleculares.

La cantidad de muestra a analizar debe ser acidificada con HCl 1N hasta llevarla a un pH de 3.5 (-0.2) y tener una conductividad mayor a 1.5mS, antes de añadir una cantidad de leche descremada pre floculada tomando en cuenta que se debe alcanzar una concentración de 0.01% de la solución de la misma. La muestra se agita durante 8 horas para permitir que los virus presentes se adhieran a los flóculos, posteriormente se deja reposar la muestra durante 8 horas para que sedimenten los flóculos. Se debe extraer el sobrenadante utilizando una bomba peristáltica y el volumen restante se centrifuga para volver a disolver los flóculos sedimentados en el buffer de fosfatos un pH de 7.5.

b. Procedimiento de río, lago y mar

i. Preparación de la muestra

- A las muestras de agua de río, lago y mar se agregó 100ul de estándar de Adenovirus.
- Medir la conductividad y pH de las muestras.
- De ser necesario corregir el pH de las muestras con HCL 1N o NaOH 1M hasta obtener un pH de 3.5 (+/-0.2) y la conductividad agregando sales marinas artificiales hasta alcanzar una conductividad mayor a 1.5mS. Es necesario llegar a este pH en la muestra para así modificar la carga de los virus (logrando que estos pasen de tener una carga negativa a positiva, y se adhieran fácilmente a los flóculos).
- En la muestra se ajusta la conductividad para que al momento de agregar la leche descremada pre-floculada esta no pierda su característica.

ii. Mezcla de la leche pre-floculada con la muestra

- Agregar 100ml de leche descremada pre floculada a 10L a las muestras de río, lago y mar.
- Con esto la solución final alcanza una concentración de 0.01%.
- Agitar la solución formada durante 8 horas, utilizando los agitadores magnéticos para que los virus se puedan adherir a la leche pre-floculada (Ver Anexo 1).
- Dejar reposar durante 8 horas para que los flóculos precipiten.

iii. Separación del flóculo del sobrenadante

- Remover el sobrenadante utilizando presión negativa, esto se logra llenando una manguera con agua, para luego sumergir una punta de la manguera en el sobrenadante, la punta que se encuentra libre es por donde saldrá el sobrenadante y se depositara en un colector.
- Se debe obtener el flóculo con la más mínima cantidad de sobrenadante posible.
- El flóculo debe ser trasvasado a un frasco no estéril.

iv. Centrifugación y suspensión del precipitado

- El flóculo colectado en sus frascos, se trasvasa a vasos de centrifugación especiales para su posterior centrifugación.
- La centrifugación debe ser llevada a cabo a 8,000xg durante un tiempo de 30 minutos.
- Luego de la centrifugación el sobrenadante debe ser descartado por decantación.
- El precipitado obtenido se debe resuspender en 2ml de buffer de fosfatos o buffer de fosfatos con un pH de 7.5, esto con la finalidad de separar los virus del flóculo inicial.

2. Métodos de detección y cuantificación de virus

a. Principio

El principio de la técnica consiste en amplificar los fragmentos de ADN que se han obtenido luego de la extracción, y ser detectados y cuantificados por la técnica de qPCR o PCR cuantitativa, la especificidad del método se logra utilizando el reactivo TaqMan que posee una sonda fluorogénica que permite la detección de productos o fragmentos de ADN detectados durante toda la reacción.

La sonda fluorogénica utiliza una molécula fluorogénica y un inhibidor de la fluorescencia, de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de un sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del inhibidor de la fluorescencia, y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

b. Procedimiento

i. Extracción de ADN viral

- Pipetear 560µl del Buffer AVL, y colocarlo en un tubo para microcentrífuga de 1.5ml.
- Agregar 140µl de la muestra, e incubar a temperatura ambiente (15-25 °C) por 10 minutos.
- Mezclar en un vortex por 15 segundos y volver a centrifugar para remover excesos o gotas de la tapa.
- Agregar 560µl de etanol absoluto (96 – 100%), mezclar en el vortex por 15 segundos.
- Pipetear 630µl de la mezcla anterior y servirlos en una columna.
- Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.
- Repetir agregando 500µl del Buffer AW1 a la columna y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo nuevo.
- Agregar 500µl del Buffer AW2 a la columna y centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo para microcentrífuga de 1.5ml.
- Agregar a la columna 40µl de Buffer AVE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugar por 1 min a 8000 rpm. Repetir el paso anterior, agregando otros 40µl de Buffer AVE.

ii. Preparación de las soluciones de trabajo y máster MIX para adenovirus humano

- Preparación de las soluciones de trabajo, primers y sondas, diluyendo los primers y las sondas, que se encuentran en un solución de 100 µM, a 10µl del primers se agregan 34.44µl de agua, para obtener una concentración final de 22.50 µM y a 10µl de la sonda se agregan 78.89µl de agua, para alcanzar una concentración final de 11.25µM.
- Para la preparación del reactivo (Master mix), se agregan 12.5µl de Mix 2x, 1µl de primer 1, 1µl de primer 2, y 0.5µl de sonda.

iii. Reacción final

- Agregar el 15µl de Máster MIX a cada pozo de la placa.
- Tomar en cuenta que habrán controles negativos para descartar contaminación.
- Agregar 10µl de muestra en los respectivos pozos y 10µl de agua purificada (duplicado) como controles negativos.
- Agregar 10µl del estandar de las diluciones 10^0 a 10^6 /10µl por triplicado, utilizando una pipeta exclusiva para ADN estandar.
- Centrifugar 3,000xg durante 3 minutos.
- Desarrollar la qPCR dentro de un adecuado sistema, seleccionando los parámetros apropiados (considerando el uso de la cubierta adhesivo y el volumen total en cada recipiente, etc.). Siguiendo la activación del AmpliTaq Gold por 10 min a 95°C, 40 ciclos (15 s a 95°C y 1 minuto a 60°C) son desarrollados.
- La cantidad de ADN sera definida como la mediana de la información obtenida despues de corregir el factor de diluciones cuando sea necesario.

G. Diseño de la investigación

Estudio experimental, de evaluación del método de concentración, determinación y cuantificación de partículas víricas en agua.

1. Evaluación de la reproducibilidad del método

- Muestra: 10 réplicas de agua de mar.
- Análisis: se determinó la precisión de la carga viral, utilizando parámetros estadísticos como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual debe ser menor a 2.0% (DeSain C., 1992; Martín-Smith M., Rudd D., 1990).

2. Determinación de la eficiencia de recuperación de las partículas víricas

- Muestra: 6 muestras de agua de río, lago y mar de las cuales 3 se contaminaron con 100µl de estándar de Adenovirus, las otras 3 muestras se utilizaron como blanco.
- Análisis: a cada una de las 3 réplicas de agua de río, lago y mar contaminadas con estándar de Adenovirus, se restó el valor de las muestras que no fueron contaminadas (muestra blanco), este valor se comparó con la concentración del estándar de Adenovirus y así evaluar el porcentaje de recuperación de las partículas víricas, se considera aceptable un porcentaje $\geq 50\%$ (Bofill-Mas et al. 2006).

3. Comparación de los métodos de cuantificación viral, entre el LNS y LMUB

- Diseño experimental: diseño pareado.
- Muestra: estándar directo de Adenovirus y las diluciones que van de la 10^{-1} a la 10^{-6} para hacer un total de 7 réplicas.
- Análisis: los estándares se corrieron al mismo tiempo en la universidad de Barcelona y en el Laboratorio Nacional de Salud. La comparación se realizó por medio de la prueba de hipótesis para diferencias pareadas por t de student, en donde: $H_0: \mu_d=0$ (μ_d = promedio de las diferencias), a un nivel de significancia alfa (α) de 0.05.

VIII. RESULTADOS

En la Tabla No. 1 se muestran las medidas de dispersión que se obtuvieron utilizando como matriz agua de mar; se observa que el coeficiente de variación es elevado, con un resultado de 129.98%, este porcentaje es aceptable para esta metodología, tomando en cuenta las dificultades que se presentaron en la realización de este estudio que se describen más adelante. Estos resultados fueron obtenidos a partir de los datos que se encuentran en el Anexo 2.

Tabla No. 1. Resultados de la Precisión del Método de Concentración de Partículas Víricas en muestras de mar

Medidas de Dispersión	Resultado
Coefficiente de Variación (%)	129.98
Desviación Estándar	1.1073
Promedio	0.8519

Fuente: Datos experimentales, área de virología UCREVE/LNS.

En la tabla No. 2 se presentan los resultados obtenidos en la recuperación de partículas víricas, se utilizaron tres muestras de orígenes diferentes (río, lago y mar). El porcentaje de recuperación se obtuvo de la diferencia de la muestra contaminada con estándar vírico de Adenovirus Humanos con un valor de 53,700,000Cg/L (muestra contaminada) menos la muestra sin contaminar (muestra blanco). Como se observa los resultados de recuperación para agua de mar son relativamente bajos en comparación con las muestras de río y lago.

Tabla No. 2. Recuperación del método de concentración de partículas víricas (n=9)

Orígen	Muestra	Porcentaje de Recuperación (%)
Mar	1	0.0452
	2	0.1196
	3	0.2035
Lago	1	37.9881
	2	54.9054
	3	35.7123
Río	1	12.1259
	2	6.8282
	3	4.0832

Fuente: Datos experimentales, Virología, LNS, 2013

La tabla No. 3 describe la comparación entre el Laboratorio de la Universidad de Barcelona y el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala por medio de la t student, de la cual se puede inferir que es aceptable dado que el promedio de las diferencias es muy cercano a cero y que no hubo una diferencia significativa entre ambos laboratorios ($p = 0.1737$). Y también como muestra el Gráfico No. 1 en el Anexo 3 que esta comparación presenta una buena precisión y exactitud. Estos resultados fueron obtenidos a partir de los datos que se encuentran en el Anexo 4.

Tabla No. 3. Tabla para prueba t de dos muestras equivalentes, para comparación de métodos.

	<i>Ct, ESTÁNDAR BCN*</i>	<i>Ct, ESTÁNDAR LNS*</i>
Media	26.2679	25.4074
Desviación estándar	6.3750	4.8226
Diferencia de los promedios	0.8605	
Desviación estándar de las diferencias	2.6477	
Observaciones	19	19
P(T<=t) dos colas	0.1737	

Fuente: Datos experimentales, Área de Virología Laboratorio Nacional de Salud Guatemala, Laboratorio de de Aguas y alimentos, Universidad de Barcelona, 2013

BCN* Barcelona LNS*Laboratorio Nacional de Salud

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se han descrito un grupo de virus ADN como indicadores de la presencia de patógenos humanos en el ambiente. Estos virus son el Adenovirus humano (HAdV). Se han propuesto en este estudio ya que son virus muy estables en el ambiente y son excretados en las heces por los humanos y no presentan un cuadro clínico (Bofill Mas, et al., 2006). Tal como se muestra en los resultados de la tabla No. 2, los virus que se propusieron han sido detectados en las aguas de río, lago y mar como se esperaba, corroborando así que estos virus son estables en el ambiente como lo cita Bofill Mas en su artículo “Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus. Applied and environmental microbiology”.

En Guatemala, a través de la cooperación, con la Universidad de Barcelona y como parte del proyecto de investigación, (Fodecyt 042-2011, Senacyt), se obtuvo la transferencia de tecnología, habiéndose implementado la metodología de la concentración de los virus, en aguas de uso y consumo humano.

Como parte de la validación del estudio se realizaron Procedimientos Operativos Estándares (POES), los cuales quedaron implementados en el Laboratorio Nacional de Salud; tal como se puede observar en el Anexo 5.

Se evaluó la reproducibilidad y precisión de la metodología de concentración y detección de partículas víricas, mediante la determinación cuantitativa de HAdV recuperados a partir de diez litros de agua de mar, utilizando el ensayo de qPCR. El procedimiento de concentración de virus se realizó a 4,500 revoluciones por minuto por una hora, dicho procedimiento se llevó a cabo a mayor tiempo y con menor fuerza, que la metodología original (siendo esta una variable introducida por falta de equipo, el cual no se cuenta en ningún centro de investigación, ni laboratorio de medición de calidad de agua en el país), la modificación que se realizó a esta metodología, pudo influir en que los flóculos no precipitaran junto con las partículas víricas de la manera adecuada, consiguiendo así afectar la reproducibilidad del método, como se muestra en el Anexo 2, de un 100% de muestras analizadas, el 60% de ellas fueron positivas y el resto negativas (40%).

En un total de 6/10 (60%) de las muestras se detectó genoma vírico, probablemente el porcentaje de las muestras negativas 4/10 (40%) se pudo deber a la presencia de posibles inhibidores víricos presentes en las muestras de agua de mar, como la alta concentración de sal, oleaje y la falta de una centrifuga adecuada. Estos factores influyeron en la poca adherencia de los virus a los flóculos de la leche tal como esta descrito en el método original. Todos los factores anteriormente descritos, provocaron una variabilidad de resultados por lo que pueden ser el motivo por el que el coeficiente de variación se encuentra por arriba del 100% (129.98%) (Ver Table No. 1) (Calgua B, et. al. 2008).

No existen estudios con parámetros y límites de evaluación que permitan hacer una comparación sobre la reproducibilidad del método. Sin embargo, por el valor obtenido en la desviación estándar (129.98%) y el porcentaje de muestras positivas (60%), la reproducibilidad de este método se puede considerar como aceptable, tomando en cuenta la adaptación que se realizó a la metodología (Ver Tabla 1 y Anexo 2).

La eficiencia en los métodos de concentración de virus depende de varias variables, tales como la cantidad de virus presentes en la muestra, la naturaleza y el volumen de la muestra, como se muestra en el siguiente párrafo, se considera que la mejor matriz para trabajar la metodología son las muestras de lago, ya que en este tipo de muestra el agua se encuentra más estable y no presenta altas concentraciones de sales que afecten en la adherencia de los virus a los flóculos de la leche (Albina-Gimenez, et. al 2009; Calgua B, et al. 2008).

El estudio mostró una baja eficiencia de recuperación de partículas virales en el agua de mar (0.20% que fue el mayor porcentaje de recuperación), posiblemente debido a factores anteriormente descritos ó a la poca adsorción de los virus a las proteínas de leche por la alta concentración de sales en el agua de mar tal como lo describe Calgua B, et. al 2008. En las muestras de agua de río se obtuvo un porcentaje aceptable de recuperación vírica de Adenovirus humano (12.13% que fue el mayor porcentaje de recuperación). Sin embargo, en el agua de lago, fue donde se obtuvo la mejor eficiencia de recuperación de partículas víricas

con un porcentaje de (54.90% que fue el mayor porcentaje de recuperación), lo anterior pudo deberse a la baja conductividad que presenta el agua de lago y río, comparada con el agua de mar de nuestro país, que difiere de otras agua de mar, como puede observarse en estudios realizados en Barcelona y Rio de Janeiro (Bofill-Mas, et al. 2006).

El ensayo interlaboratorio con el laboratorio de aguas de la Universidad de Barcelona permitió evaluar la metodología de qPCR en el Laboratorio Nacional de Salud, al comparar los valores obtenidos se puede inferir que existió poca dispersión, ya que la diferencia de los promedios entre ambos laboratorios es de 0.86 ($\mu_d = 0.86$), Ver Tabla No.3, lo que lo hace muy cercana a cero por lo que es factible mencionar que el valor obtenido entre ambos ensayos es aceptable (Ruiz A, Rojas F, 2009).

La desviación estándar fue menor para el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala que para la Universidad de Barcelona como se muestra en la Tabla No. 3 (Desviación estándar LNS: 4.82 y UB: 6.37) y graficamente en el Anexo 4, se puede inferir que existió menos dispersión para el Laboratorio Nacional de Salud que para la Universidad de Barcelona, lo que permite dar confiabilidad a la metodología a implementarse en el Laboratorio Nacional de Salud (Ruiz A, Rojas F, 2009).

El análisis gráfico muestra una ligera discrepancia en las concentraciones 0 y 1 mejora en las siguientes diluciones, ésta diferencia fue atribuible a un posible error analítico de pipeteo, se descarta error de tipo sistemático ya que las otras diluciones no muestran variabilidad (ver Anexo 4). Según los datos obtenidos en este estudio comparativo de evaluación de método de detección de partículas víricas, no hubo diferencia significativa entre ambos laboratorios con una $p = 0.17$ ver Tabla No. 3 (Ruíz A, Rojas F, 2009).

Es necesario realizar estudios posteriores para la reproducibilidad del método, utilizando diferentes matrices de muestras de agua artificial y/o muestreos sistematicos, para mejorar, el porcentaje de recuperacion viral, sobre todo en agua de mar.

Se llevó a cabo un estudio experimental, enfocado en la validación de una metodología de floculación orgánica para concentrar partículas víricas, usadas como indicadores de contaminación fecal, dicha metodología, es una herramienta útil y novedosa, que permitirá en el futuro cercano, evaluar de una manera mas precisa, la calidad de las fuentes de agua en el país.

X. CONCLUSIONES

- A. En el presente estudio de investigación, se validó, el método para la concentración, determinación y cuantificación de Adenovirus humano que es un indicador de contaminación fecal de origen humano en aguas recreacionales.
- B. La reproducibilidad del método validado, se considera aceptable ya que del 100% de las muestras, el 60% fueron positivas y un 40% negativas.
- C. La eficiencia de recuperación de partículas víricas fue mejor en el agua de lago, ya que en esta matriz se llegó a obtener hasta un 54.9% de partículas recuperadas, seguida por el agua de río, obteniendo un porcentaje de 37.98% y por último el agua de mar con porcentajes de recuperación menor al 1%.
- D. La metodología de identificación de virus del Laboratorio Nacional de Salud es factible y confiable.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Continuar con la implementación de esta nueva metodología, mejorando los porcentajes de recuperación, para ello, procurar incluir equipo de alta centrifugación para volúmenes de 500ml.
- B. Continuar con la evaluación de la reproducibilidad del método utilizando matrices de agua artificial, sobre muestras de mar.
- C. Incluir en la metodología validada otros parámetros víricos causantes de infecciones transmitidas por el agua en el país, como Rotavirus y el virus de la Hepatitis A (HAV).
- D. Realizar estudios posteriores a las plantas de tratamiento de agua residuales del país, principalmente aquellas que vierten sus aguas a ríos importantes y cercanos a la población.
- E. Realizar otros estudios sobre la calidad del agua en Guatemala, principalmente en puntos con alta prevalencia de gastroenteritis.

XII. REFERENCIAS

Agostini, H., Ryschkewitsch, C., Singer, E., Baumhefner, R., & Stoner, G. (1998). JC virus type 2B is found more frequently in brain tissue of progressive multifocal leukoencephalopathy patients than in urine from controls. *J Hum Virol* , 200-206.

Allard, A. (1992). Enteric adenovirus type 41. Genoma organization and specific detection procedures. *ScienceDirect* , 113-125.

Ayres, R., & Wescot, D. (1987). La calidad del agua en la agricultura. *Estudio FAO riego y drenaje, No. 29* , 380-385.

Barrera, H., Ortíz, R., Rojas, A. y Resendez, D. (1993). Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*, s. l. 50-60.

Bofill Mas, S., Albina Gimenez, N., Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez Manzano, J., Allard, A., y otros. (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus. *Applied and environmental microbiology* , 7894-7896.

Bofill Mas,S., Rusiñol M., Fernandez X., Carratalá A., Hundesa A., Girones R. (2013) Quantification of Human and Animal Viruses to Differentiate the Origin of the Fecal Contamination Present in Environmental Sample. *Pub Med, Biomed, Res int.* 192089

Bofill Mas, S., Hundesa, A., Byron, C., Rusiñol, M., Maluquer de Montes, C., & Rosina, G. (2011). Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. *PubMed* , 5.

Borrego, J., Moriño, M., de Vicente, A., Córna, R., & Romero, P. (1987). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. *Water Research*, 5698-5712.

Calgua B., Mengewein A, Grunert A, (2008) Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples, Pub, Elsevier. Barcelona Spain.

Calgua, B., Monte Barardi, C. R., Bofill Mas, S., Rodríguez Manzano, et. al (2008). Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods*, 1-7.

Calgua B., Rodríguez Manzano J, Hudeza A. et. Al (2013) New Methods for the concentration of viruses from urban sewage using Quantitative PCR Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Spain.

Campos, C. (1999). *Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de aguas residuales para riego agrícola*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Barcelona. Barcelona.

(CNE), (s.f.). *Centro Nacional de Epidemiología*. Recuperado el 15 de Marzo de 2012 de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/mapa/atlas.html>

Castañón, D. (2012). *El agua en la economía de Guatemala*. Guatemala: s.n.

Ciappi, S, Azzi, A., De Santis, R., Leoncini, F., Sterrantino, G. et al. (1999). Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. *J Gen Virol*, 1017-1023.

Cobos, C y Colom, E. (2005). Situación del recurso hídrico en Guatemala. Documento técnico del perfil ambiental en Guatemala. Universidad Rafael Landívar. Guatemala.

Cole, C. (1995). Polyomavirinae: the viruses and their replication. *Fields virology* , 1997-2025.

Csuros, M., & Csuros, C. (1999). *Microbiological emanation of water and wasterwater*. Florida: s.n.

Cultek. (2009). *Manual de PCR en tiempo real*. Mexico: s.n.

Davison, J., & Meyers, D. (1992). *No time to waste poverty and the global invironment*. Oxford: s.n.

DeSain, C. (1992). *Master method validation protocols*. Biopharm. 30-42.

Elías, Carlos Alberto, et al. (2005). Determinación del agua no contabilizada y análisis tarifario del sistema de agua de Planes de Bárcenas. *Agua, Saneamiento & Ambiente*, 39.

Feigenbaum, L., Khalili, K., Major, E., & Houry, G. (1987). Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc Natl Acad Sci USA* , 3695-3698.

Flint, S., Enquist, L., Racaniello, V., Skalka, A. (2009). *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses*. Tercera Edición. Washington, D.C.:ASM PRESS. 20-35.

Frisque, R., & White, F. (1992). The molecular biology of JC virus, causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Molecular neurovirology – pathogenesis of viral CNS infections* , 25-158.

(FUNDESA), (2011). *Fundación para el Desarrollo de Guatemala* . Cost-Effectiveness Analysis. Capitulo IV: National Campaign for Water Chlorination. Guatemala. Recuperado el 25 de febrero de 2013 de:

www.fundesa.org.gt/cms/content/files/cides/GUATEMALA_CostEffectiveness_Analysis.pdf

(FUNDESA),(2012). *Fundación para el Desarrollo de Guatemala*. Usos del agua en Guatemala: Sostenibilidad del Sistema. Guatemala. Recuperado el 25 de Febrero de 2013 de http://www.fundesa.org.gt/cms/content/files/publicaciones/Boletin_de_Desarrollo_Recursos_Hidricos.pdf

Gordon, J., Gallia, G., Del Valle, L., Amini, S., & Khalili, K. (2000). Human polyomavirus JCV and expression of myelin genes. *J Neurovirol* , 92-97.

Green, M., & Pina, M. (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication, isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Virology Vol. IV* , 125-129.

Griones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corréa, A., y otros. (2010). Molecular detection of pathogens in water e the pros and cons of molecular techniques. *ScienceDirect* , 4326-4335.

Hilleman, M., & Werner, J. (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *BiolMed* , 354-360.

Hundesda, A., Bofill Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodríguez Manzano, J., Bach, A., Casas, M., et al. (2010). Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine. *Journal of Virological Methods* , 385-389.

Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Albinana Gimenez, N., Rodríguez Manzano, J., Bofill Mas, S., Suñen, E., et, al. (2009). Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *Journal of Virological Methods* , 130-135.

Jiang, M., J, A., Johnson, S., & Imperiale, M. (2009). The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* , 266-273.

Joseph, E.; Fry, S.; Brahman, S.; Burns, J. (1990). Strategies for linkind water and sanitation program to child survival. *Cab Direct-Miscellaneous.* , 75.

Kenney, S., Natarajan, V., Strika, V., Khoury, G., & Salzman, N. (1984). JC virus enhancer-promoter active in human brain cells. *Science* , 1337-1339.

Kott, Y., Ben Ari, H., & Vinour, L. (1978). Coliphages survial as viral indicator in various wasterwater quality effluents.*Pro WatTech*, 337-346.

Lashgari, M., Tada, H., Amini, S., & Khalili, K. (1989). Regulation on JCVL promoter function. transactivation of JCVL promoter by JCV and SV40 early proteins. *Virol* , 292-295.

Lucena, F., Divizia, M., Biziagos, E., Crance, J., & Deloince, R. (1991). Extraction et concentration des virus desmilieux hydriques. *Virologie des milieux hydriques* , 15-25.

Madigan, M., Martinku, J., y Vinour, L. (1997). *Biología de los microorganismos*.Madrid: Prentice-Hall.

Martín-Smith, M., Rudd, DR. (1990). *The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals*. Acta Pharm Jugosl. 7-19.

McFeteters, G. (1990). Drinking water microbiology.*International Journal of Food Microbiology*, 1548-1550.

Menino, T. (2006). Prevención de las enfermedades transmitidas por aguas recreativas (RWI). Recuperado el 30 de marzo de 2013 de http://www.bphc.org/programs/Fact%20Sheets/CDC/Infectious%20Diseases/Preventing%20Recreational%20Water%20Illnesses_SANISH_FINAL.pdf

(MSPAS), (2011). *Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social*. Guía de normas para la Disposición Final de Excretas y Aguas Residuales en zonas rurales de Guatemala. Recuperado el 30 de marzo de 2013 de http://www.mspas.gob.gt/images/stories/GENERAL/agua_saneamiento/guias_normas_APS/guia_de_disposicion_excretas_aguas_residuales_FIN.pdf

(MSPAS), (2012). *Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social*. Recuperado el 12 de Marzo de 2012 de http://portal.mspas.gob.gt/index.php?option=com_content&view=article&id=173:evite-el-rotavirus&catid=16:consejos-de-salud&Itemid=67

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2006). *Microbiología médica*. Madrid: ELSEVIER.

Mutz, R. (2004). Situación del Recurso Agua en Guatemala. Editorial, Servicios para el desarrollo, Quetzaltenango Guatemala.

Albinana-Gimenez N, Casaresa P, Calgua B, et. Al. Comparison of methods for concentrating Human Adenoviruses, Polyomavirus JC and Noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR, International Journal of Virological Methods. Elsevier.

Oliva, B. (2006). La Contaminación del Agua y su Impacto en la Salud en Guatemala, Guatemala, Guatemala. Recuperado el 20 de julio de 2012 de <http://teui.ice.ucdavis.edu/library/53>

(OMS), (2006). *Organización Mundial de la Salud*. Guías para la calidad del agua potable. España. Recuperado el 15 de Marzo de 2012 de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf

Ortiz, C. (2000). *Agua y desarrollo en Guatemala*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Escuintla.

Persing, D., Smith, T., Tenover, F., & White, T. (1993). Diagnostic molecular microbiology: Principles and application. *American Society of Microbiology*. Washington, D.C. 2735-2747.

Pina, S. (2001). *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona. Barcelona.

Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (1999). *Manual de suministros de agua comunitaria*. s.l.: s.n.

Primrose, S., Twyman, R., & Old, R. (2011). Principles of gene manipulation. *Blackwell Scientific* , 325-348.

Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., & Girones, R. (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Environ Microbiol* , 2963-2970.

Queipo de Llano, E. (2013). Calidad del Agua: Aguas Recreativas. Recuperado el 30 de marzo de 2013 de: <http://ebookbrowse.com/43-calidad-del-agua-aguas-recreativas-pdf-d367943884>

Raj, G., & Khalili, K. (1995). Transcriptional regulation: lessons from the human neurotropic polyomavirus, JCV. *Virology* , 283-291.

Rodríguez Mellado, J., y Marín Galvín, R. (1999). *Físico-Química de aguas*. s.l.:s.n.

Rojas, R. (1989). *Calidad del agua*. s.l.:s.n.

Roldán, G. (1992). *Fundamentos de limnología neotropical*. s.l.:s.n.

Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Madrid: Panamericana.

Ruchansky, D. (2013). Introducción a la virología. Recuperado el 30 de marzo de 2013 de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/bacto/introvir2011.pdf>

Ruíz A., Rojas F. (2009) Herramientas estadísticas “Comparación de dos muestras: t-test”
Recuperado el :26 de abril de 2014 de:
<http://web.cortland.edu/matresearch/comparacion.pdf>

Sabath, B., & Major, E. (2002). Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* , 180-186.

Safak, M., Barruco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., K, N., & Khalili, K. (2001). Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol* , 1476-1486.

Safak, M., Gallia, G., & Khalili, K. (1999). Reciprocal interaction between two cellular proteins, puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells. *Mol Cell Biol* , 12-23.

Sala, M., J, V., Kousignian, P., Delfraissy, J., Taoufik, Y., & Wain Hobson, S. (2001). Progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol* , 899-907.

Schwartzbrod, L. (1995). Effect of human viruses on public health associated with the use or wastewater and sludge in agriculture an aquaculture. *World Health Organization* , 5-14.

(SEGEPLAN), (2006). *Secretaria de Planificación y Programación de la Presidencia*. Estrategia para la gestión integrada de los recursos hídricos de Guatemala. Recuperado el 26 de Febrero de 2013 de http://www.marn.gob.gt/sub/portal_samya/docs/sdag.pdf

Sharp, I., & Wadell, G. (1995). Adenoviruses in: principles and practice of clinical virology. *ScienceDirect* , 265-295.

Solórzano Ponce, R. (2005). *Determinación de la calidad del agua para consumo humano y uso industrial proveniente de la plata de tratamiento "La Carbonera", municipio de Sanarate, departamento El Progreso, Guatemala*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. El Progreso.

Spillman, T., Waite, L., Webster, T., Alas, H. y Buckalew, J. (2000). Evaluación de Recursos de Agua de Guatemala. Recuperado el 30 de marzo de 2013 de http://www.infoiarna.org.gt/media/file/areas/agua/documentos/nac/%285%29%20Evaluacion_recursos_agua_Guatemala.pdf

Torres, A. y Baca, B. (1995). Reacción en la cadena de la polimerasa. *Elemento*. Mexico, D.F. 16-21.

van Heerden, J., Ehlers, M., Vivier, J., & Grabow, W. (2005). Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *Journal of Applied Microbiology* , 926-933.

van Regenmortel, M., Fauquet, C., Bishop, D., Carstens, E., Estes, M., & Lemon, S. (2000). *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. New York: ACADEMIC PRESS.

Walker, D., & Frisque, R. (1986). The biology and molecular biology of JC virus. *Plenum Publishing C* , 327-377.

Walker, D., Padgett, B., ZuRhein, G., Albert, A., & Marsh, R. (1973). Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science* , 674-676.

Weber, T., & Major, E. (1997). Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* , 98-111.

Wildy, P. (1971). Classification and nomenclature of viruses. First report of International Committee on Nomenclature of Viruses. *Ibero-Latinoamericana de parasitología*, 1025-1035.

Yates, M. (1992). *Biomonitoring of environmental contamination* .New York: s.n.

Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., & Hara, K. (1990). Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* , 3139-3143.

XIII. ANEXOS

Anexo 1.

Preparación de la leche descremada pre-floculada 1%

A 1L de agua de grifo esterilizada en autoclave se agrega 10g de leche descremada (Difco ref. 232100) y 33.33g de sales marinas artificiales para alcanzar una conductividad mayor a 1.5 mS(Bofill Mas, et al., 2011; Calgua, 2012).

Posteriormente se acidifica la leche con HCl 1N hasta obtener un pH de 3.5 (-0.2), esto con la finalidad de obtener la formación de flóculos de la leche (separación de la proteína)(Bofill Mas, et al., 2011; Calgua, 2012).

Anexo 2.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad y precisión del método, utilizando como matriz el agua de mar. Se observa que en 6/10 (60%) de las muestras se detectó la presencia de HAdV, obteniendo en la qPCR concentraciones diferentes en copias genómicas por mililitro.

Tabla No. 1. Precisión del Método de Concentración de Partículas Vírica en muestras de mar (n=10)

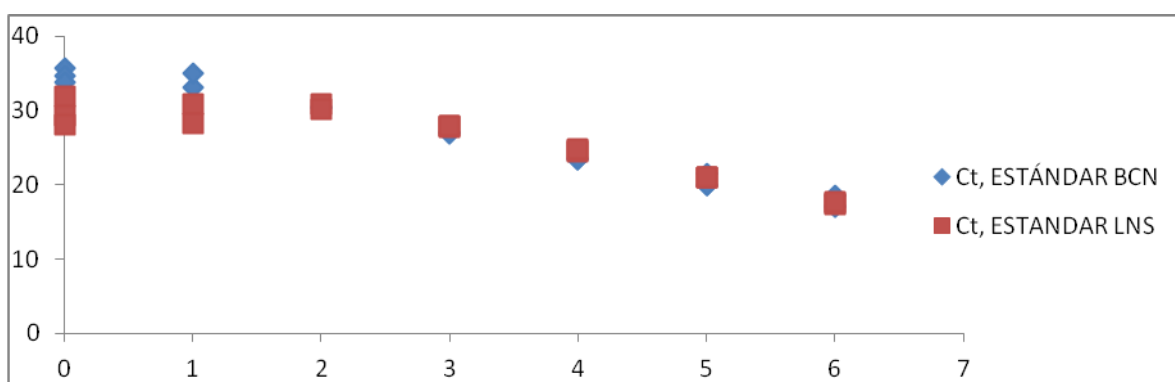
Muestra	Mar 1	Mar 2	Mar 3	Mar 4	Mar 5	Mar 6	Mar 7	Mar 8	Mar 9	Mar 10
Copias genómicas víricas/ml	1.590	0.000	0.120	0.000	0.000	1.103	0.400	0.000	1.646	3.664

Fuente: Datos experimentales, área de virología UCREVE/LNS.

Anexo 3.

El gráfico No.1 representa la comparación del método de cuantificación viral medido en el Laboratorio Nacional de Salud y el Laboratorio de virus contaminantes de agua y alimentos de la Univerisidad de Barcelona, España. En el mismo se expresa una buena presición y exactitud, en seis de las siete mediciones realizadas.

Gráfica No. 1 Comparación del método de qPCR entre el Laboratorio Nacional de Salud y el Laboratorio de Virus contaminantes de alimentos y ambiente de la Universidad de Barcelona



Fuente: Datos experimentales, Laboratorio Nacional de Salud y Laboratorio UB 2013

Anexo 4.

En la tabla No. 2 se observan los resultados obtenidos en la evaluación del método de detección y cuantificación viral (qPCR). Para poder hacer una comparación de éste método se corrieron al mismo tiempo siete diluciones de un estándar vírico, tanto en la Universidad de Barcelona como en el Laboratorio Nacional de Salud. Dichos valores fueron expresados a nivel de Ct, (ciclo en el que la señal de fluorescencia alcanza su máximo umbral). Como se observa en la tabla no existe una diferencia significativa entre la corrida de qPCR de la Universidad de Barcelona y la del Laboratorio Nacional de Salud.

Tabla No. 2. Comparación del método de cuantificación viral entre el Laboratorio Nacional de Salud y el Laboratorio de Virus Contaminantes de Aguas y Alimentos de la Universidad de Barcelona.

Dilución	Ct*, Estándar BCN	Ct, Estándar LNS	Dif Std BCN*-Std LNS*
0	35.72	31.85	3.87
0	34.71	29.3	5.41
0	33.81	28.03	5.78
1	33.08	30.94	2.14
1	35.09	28.2	6.89
2	30.58	30.91	-0.33
2	30.42	30.2	0.22
3	26.87	27.7	-0.83
3	26.98	28.01	-1.03
3	27.13	27.95	-0.82
4	23.43	24.55	-1.12
4	23.46	24.63	-1.17
4	23.56	24.73	-1.17
5	20	21.08	-1.08
5	21.54	21.02	0.52
5	19.96	21.05	-1.09
6	18.53	17.53	1
6	16.97	17.43	-0.46
6	17.25	17.63	-0.38

Fuente: Datos experimentales, Virología Laboratorio Nacional de Salud y Laboratorio de Aguas UB 2013
 *Dif Std BCN: Estandar cuantificado en la Universidad de Barcelona; ; *Dif Std LNS: Estándar cuantificado en el Laboratorio Nacional de Salud; *Ct: Ciclo de emisión de máximo umbral de fluorescencia.

Anexo 5.

Procedimientos Operativos Estándares (POE'S)

Concentración de Virus en Agua de Lago por el Método de Flocculación Orgánica.

1. Objetivo y Campo de Aplicación

a. Objetivo

Dar los lineamientos para la concentración de virus presentes en 10 L de agua de lago y/o cuerpos de agua dulce con poca materia orgánica a un volumen final de 10 ml de fosfato amortiguador.

b. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a muestras de agua de lago y/o cuerpos de agua dulce con poca materia orgánica.

2. Referencias

- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68: 4523-33.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983. 166: 557-580.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A, Calvo, M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72: 7894-7896.

3. Responsabilidades

a. Supervisor del Área de Ambiente y Salud

Supervisa el cumplimiento y utilización del procedimiento aquí descrito.

b. Analista encargado

Utiliza el procedimiento para la realización del análisis.

4. Descripción del procedimiento

a. Principio

Diez litros de agua de lago y/o cuerpos de agua dulce con poca materia orgánica son acidificados antes de agregar 100ml de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogénea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500ml) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10ml de fosfato amortiguador a pH 7.5.

b. Equipo

- Centrífuga de alta velocidad (8000 xg) con capacidad de 500ml
- Potenciómetro
- Termómetro
- Conductímetro

c. Materiales

- Tubos plásticos de 100 – 200cm de longitud
- Pipetas graduadas, desechables y esterilizadas
- Tubos plásticos esterilizados de 1.5 y 10 – 15ml (Eppendorf, Falcons, etc)
- Recipiente para centrífuga (500ml)
- Revolvedores magnéticos e imanes
- Recipientes plásticos o de vidrio con base plana que permitan el uso de revolvedores magnéticos
- Bomba peristáltica para remover la supernata
- Controlador de tiempo

d. Reactivos

- Ácido hidroclicóric (1N y 0,1N)
- Hidróxido de sodio (4% w/v = 1M)
- Leche descremada (SM), (Difco Ref. 232100)
- Fosfato amortiguador pH 7.5
- Agua marina artificial y sales marinas (Sigma Ref. S9883)

5. Preparación de reactivos

a. Ácido hidroclicóric (1N)

A un balón de 500ml, agregar 400ml de agua desionizada, luego, agregar lentamente 34.4ml de Ácido hidroclicóric concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable

de la preparación el volumen de ácido hidroclicórico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

b. Hidróxido de sodio (1 M/4%)

En un balón de 500ml esterilizado disolver 40g de hidróxido de sodio en 400ml de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

c. Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V)

Disolver en un balón de 500ml usando un revolador magnético 1g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100ml de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

d. Fosfato amortiguador

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

e. Agua marina artificial

En un balón de 1L aforar con agua de grifo declorada. Agregar 33,33g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

6. Procedimiento de análisis

a. Preparación de PSM (1%)

- Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario.
- Por cada muestra de agua de lago y/o cualquier otro cuerpo de agua dulce con poca materia orgánica prepare 100ml de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 (\pm 0,1).
- No autoclavear.

b. Condicionamiento de agua y coagulación

- Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.
- Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.

- Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.
- La conductividad deber ser mayor a 1200 μ s. Ajustar conductividad con sales artificiales.
- Ajustar el pH de la muestra de agua de río a 3.5 (\pm 0,1) mediante la adición de HCl 1N.
- Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.
- Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.
- Agregar 100ml de PSM 1% a la muestra de agua de lago y/o cualquier otro tipo de agua dulce con poca cantidad de materia orgánica.
- Para muestras germinadas: agregar 1ml de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.
- Revolver las muestras durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grupo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.
- Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

c. Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación

- Remover la supernata usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras germinadas la supernata debería ser recogida dentro de una botella desinfectada. En todos los casos tener cuidado de no molestar los grumos.
- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500ml) dentro de una botella centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugación.

d. Suspensión de grumos

- Muy gentilmente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7ml de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.
- Una vez los grupos de grumos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10ml.

7. Puntos Críticos

a. Limpieza de los artículos plásticos

Limpiar y esterilizar el material de acuerdo a los procedimientos locales. Es recomendado tener los materiales especiales separados (botellas, tubos, etc.). Para muestras germinadas siempre desinfecte el electrodo de medidor de pH con solución de hipoclorito fresco.

8. Aspectos de bioseguridad

a. Manejo de muestras y reactivos

Utilizar en todo momento del análisis, bata de manga larga, guantes, mascarilla y lentes en el momento de utilizar HCl, para evitar quemaduras e inhalación de gases que irritan las mucosas.

b. Manejo de desechos

Neutralización de desechos ácidos.

Concentración de Virus en Agua de Mar por el Método de Floculación Orgánica

1. Objetivo y campo de aplicación

a. Objetivo

Dar los lineamientos para la concentración de virus presentes en 10L de agua marina a un volumen final de 10ml de fosfato capaz de mantener la relativa concentración de hidrógeno e iones hidroxilo en una solución neutra.

b. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a muestras de agua de mar.

2. Referencias

- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68: 4523-33.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983. 166: 557-580.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A, Calvo, M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72: 7894-7896.

3. Responsabilidades

a. Supervisor del Área de Ambiente y Salud

Supervisa el cumplimiento y utilización del procedimiento aquí descrito.

b. Analista encargado

Utiliza el procedimiento para la realización del análisis.

4. Descripción del procedimiento

a. Principio

10 L de agua marina es acidificados antes de agregar 100ml de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogenea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500ml) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10ml de fosfato amortiguador a pH 7.5.

b. Equipo

- Centrífuga de alta velocidad (8000 xg) con capacidad de 500ml
- Potenciómetro
- Termómetro
- Conductímetro

c. Materiales

- Tubos plásticos de 100 – 200cm de longitud
- Pipetas graduadas, desechables y esterilizadas
- Tubos plásticos esterilizados de 1.5 y 10 – 15ml (Eppendorf, Falcons, etc)
- Recipiente para centrífuga (500ml)
- Revolvedores magnéticos e imanes
- Recipientes plásticos o de vidrio con base plana que permitan el uso de revolvedores magnéticos
- Bomba peristáltica para remover la supernata
- Controlador de tiempo

d. Reactivos

- Ácido hidroclicórico (1N)
- Hidróxido de sodio (4% p/v = 1M)
- Leche descremada (SM), (Difco Ref. 232100)
- Fosfato amortiguador pH 7.5

- Sales marinas (Sigma Ref. S9883)

5. Preparación de reactivos

a. Ácido hidroclicrico (1N)

A un balón de 500ml, agregar 400ml de agua desionizada, luego, agregar lentamente 34.4 mL de Ácido hidroclicrico concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidroclicrico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

b. Hidróxido de sodio (1 M/4%)

En un balón de 500ml esterilizado disolver 4 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

c. Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V)

Disolver en un balón de 500ml usando un revolvedor magnético 1 g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100ml de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

d. Fosfato amortiguador

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

c. Agua marina artificial

En un balón de 1L aforar con agua de grifo declorada. Agregar 33,33g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

6. Procedimiento de análisis:

a. Preparación de PSM (1%)

- Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario.
- Por cada muestra de agua marina prepare 100ml de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 ($\pm 0,1$).
- No autoclavear. El PSM deberá ser preparado justo antes del proceso.

b. Condicionamiento de agua y coagulación

- Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.
- Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.
- Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.
- Ajustar el pH de la muestra de agua de mar a 3.5 ($\pm 0,1$) mediante la adición de HCl 1N. Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.
- Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.
- Agregar 100ml de PSM 1% a la muestra de agua marina.
- Para muestras germinadas: agregar ml de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.
- Revolver las muestras despaciosamente durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grumo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.
- Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

c. Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación

- Remover la supernata usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras germinadas la supernata debería ser recogida dentro de una botella desinfectada. En todos los casos tener cuidado de no afectar los grumos.
- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500ml) dentro de una botella centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugadora.

d. Suspensión de grumos

- Muy cuidadosamente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7ml de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.

- Una vez los grupos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10ml.
- Homogenizar el concentrado viral girándolo rápidamente, distribuya 10ml en tubos eppendorf los cuales deben ser guardados para futuro análisis.

7. Puntos Críticos

a. Limpieza de los artículos plásticos

Limpiar y esterilizar el material de acuerdo a los procedimientos locales. Es recomendado tener los materiales especiales separados (botellas, tubos, etc.). Para muestras pinchadas: siempre desinfecte el electrodo de medidor de pH con solución de hipoclorito fresco.

8. Aspectos de bioseguridad

a. Manejo de muestras y reactivos

Utilizar en todo momento del análisis, bata de manga larga, guantes, mascarilla y lentes en el momento de utilizar HCl, para evitar quemaduras e inhalación de gases que irritan las mucosas.

b. Manejo de desechos

Neutralización de desechos ácidos.

Concentración de Virus en Agua de Río por el Método de Floculación Orgánica

1. Objetivo y campo de aplicación

a. Objetivo

Dar los lineamientos para la concentración de virus presentes en 10l de agua de río a un volumen final de 10ml de fosfato amortiguador.

b. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a muestras de agua de río.

2. Referencias

- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68: 4523-33.

- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 1983. 166: 557-580.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A, Calvo, M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. Appl. Environ. Microbiol. 2006. 72: 7894-7896.

3. Responsabilidades

a. Supervisor del Área de Ambiente y Salud

Supervisa el cumplimiento y utilización del procedimiento aquí descrito.

b. Analista encargado

Utiliza el procedimiento para la realización del análisis.

4. Descripción del procedimiento

a. Principio

10L de agua de río son acidificados antes de agregar 100ml de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogenea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500ml) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10ml de fosfato amortiguador a pH 7.5.

b. Equipo

- Centrífuga de alta velocidad (8000 xg) con capacidad de 500ml
- Potenciómetro
- Termómetro
- Conductímetro

c. Materiales

- Tubos plásticos de 100 – 200cm de longitud
- Pipetas graduadas, desechables y esterilizadas
- Tubos plásticos esterilizados de 1.5 y 10 – 15ml (Eppendorf, Falcons, etc)
- Recipiente para centrífuga (500ml)
- Revolvedores magnéticos e imanes
- Recipientes plásticos o de vidrio con base plana que permitan el uso de revolvedores magnéticos
- Bomba peristáltica para remover la supernata
- Controlador de tiempo

d. Reactivos

- Ácido hidroclicrico (1N y 0,1N)
- Hidróxido de sodio (4% w/v = 1M)
- Leche descremada (SM), (Difco Ref. 232100)
- Fosfato amortiguador pH 7.5
- Agua marina artificial y sales marinas (Sigma Ref. S9883)

5. Preparación de reactivos

a. Áhidroclicrico (1N)

A un balón de 500ml, agregar 400ml de agua desionizada, luego, agregar lentamente 34.4ml de Ácido hidroclicrico concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidroclicrico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

b. Hidróxido de sodio (1 M/4%)

En un balón de 500ml esterilizado disolver 40g de hidróxido de sodio en 400ml de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

c. Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V)

Disolver en un balón de 500ml usando un revolvedor magnético 1g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100ml de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

d. Fosfato amortiguador

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

e. Agua marina artificial

En un balón de 1L aforar con agua de grifo declorada. Agregar 33,33g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

6. Procedimiento de análisis

a. Preparación de PSM (1%)

- Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario.
- Por cada muestra de agua de río prepare 100ml de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 ($\pm 0,1$).
- No autoclavar.

b. Condicionamiento de agua y coagulación

- Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.
- Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.
- Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.
- La conductividad deber ser mayor a 1200 μ s. Ajustar conductividad con sales artificiales.
- Ajustar el pH de la muestra de agua de río a 3.5 ($\pm 0,1$) mediante la adición de HCl 1N. Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.
- Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.
- Agregar 100ml de PSM 1% a la muestra de agua de río.
- Para muestras germinadas: agregar 1ml de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.
- Revolver las muestras durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grupo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.
- Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

c. Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación

- Remover la supernata usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras germinadas la supernata debería ser recogida dentro de una botella desinfectada. En todos los casos tener cuidado de no molestar los grumos.

- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500ml) dentro de una botella centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugación.

d. Suspensión de grumos

- Muy gentilmente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7 ml de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.
- Una vez los grupos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10ml.

7. Puntos Críticos

e. Limpieza de los artículos plásticos

Limpiar y esterilizar el material de acuerdo a los procedimientos locales. Es recomendado tener los materiales especiales separados (botellas, tubos, etc.). Para muestras pinchadas: siempre desinfecte el electrodo de medidor de pH con solución de hipoclorito fresco.

8. Aspectos de bioseguridad

a. Manejo de muestras y reactivos

Utilizar en todo momento del análisis, bata de manga larga, guantes, mascarilla y lentes en el momento de utilizar HCl, para evitar quemaduras e inhalación de gases que irritan las mucosas.

b. Manejo de desechos

Neutralización de desechos ácidos.

PCR Cuantitativo para Adenovirus Humano

1. Objetivos y campo de aplicación

a. Objetivo

Dar los lineamientos para la detección y amplificación de segmentos de ADN para la identificación y cuantificación de Adenovirus humano a partir de la extracción de ADN de muestras de agua concentradas a fosfato amortiguador.

b. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a muestras de agua desinfectada y otras aguas potables destinadas al uso y/o consumo humano.

2. Referencias

- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68: 4523-33.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983. 166: 557-580.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A, Calvo, M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72: 7894-7896.

3. Responsabilidades

a. Supervisor del Área de Ambiente y Salud

Supervisa el cumplimiento y utilización del procedimiento aquí descrito.

b. Analista encargado

Utiliza el procedimiento para la realización del análisis.

4. Descripción del procedimiento

a. Principio

Consiste en la amplificación de fragmento de ADN que han sido obtenidos luego de la extracción, y ser detectados y cuantificados por la técnica de qPCR o PCR cuantitativa, la especificidad del método se logra utilizando el reactivo TaqMan que posee una sonda fluorogénica que permite la detección de productos o fragmentos de ADN detectados durante toda la reacción.

b. Equipo

- Vortex
- Cabina de bioseguridad
- Campana de flujo laminar
- Congelador a -20 °C
- Congelador a -80 °C
- Centrífuga

- Centrífuga para placar RT-PCR
- Cubetas para extracción de ADN
- Criobiales
- Criobox
- Incubadora a 37 °C
- Microcentrífuga
- Real Time PCR applied Biosystem

c. Materiales

- Pipetas automáticas de 1 a 10µl
- Pipetas automáticas de 5 a 50µl
- Pipetas automáticas de 10 a 100µl
- Pipetas automáticas de 10 a 200µl
- Pipetas automáticas de 100 a 1000µl
- Puntas para pipetas de 1 a 10µl
- Puntas para pipetas de 5 a 50µl y de 10 a 100µl
- Puntas para pipetas de 100 a 1000µl
- Viales de almacenamiento de 1.5ml

d. Reactivos

- Reactivo para extracción de ADN
- Buffer de lisis para la purificación de ácido nucleico viral (AVL)
- Buffer para la desnaturalización de proteínas en la muestra (AW1)
- Buffer para la purificación de ADN (AW2)
- Buffer para la dilución de carrier ARN (AVE)
- TaqMan Enviromental Master Mix 2.0
- Sonda de ADN de adenovirus humano AdP1 (5´-FAMCCGGGCTCAGGTA-CT-CCGAGGCGTCCT-TAMRA-3´) a una concentración final de 0.225µM.
- Primers de ADN de adenovirus humano Adf (5´-CWTACATGCACATGKCSGG-3´) y AdR (5´-CRCGGCARAAYTGCACCG-3´) a una concentración final de 0.9µM.

5. Preparación de Reactivos

a. Solución de Trabajo

Diluir los primers y las sondas, que se encuentran en una solución de 100 µM, a 10µl del primers se agregan 34,44µl de agua, para obtener una concentración final de 22,50 µM y a 10µl de la sonda se agregan 78,89µl de agua, para alcanzar una concentración final de 11,25 µM.

b. Master Mix

Agregar 12,5µl de Mix 2x, 1µl de primer 1, 1µl de primer 2 y 0,5µl de la sonda.

6. Procedimiento de análisis

a. Extracción de ADN viral

- Pipetear 560µl de buffer AVL, y colocarlo en un tubo para microcentrífuga de 1,5ml.
- Agregar 140µl de la muestra, e incubar a temperatura ambiente (15 – 25 °C) por 10 minutos.
- Mezclar en un vortex por 15 segundos y volver a centrifugar para remover excesos o gotas de la tapa.
- Agregar 560µl de etanol (96 – 100%), mezclar en el vortex por 15 segundos.
- Pipetear 630µl de la mezcla anterior y servirlos en una columna.
- Pipetear 560µl de buffer AVL y centrifugar por 1 minuto a 8000 xg.
- Repetir agregando 500µl de buffer AW1 a la columna y centrifugar 1 minuto a 8000 xg.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo nuevo.
- Agregar 500µl de buffer AW2 a la columna y centrifugar por 3 minutos a 14000 xg.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo para microcentrífuga de 1,5ml.
- Agregar a la columna 40µl de buffer AVE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugar por 1 minuto a 8000 xg. Repetir el paso anterior, agregando otros 40µl de buffer AVE.

b. Reacción final

- Agregar 15µl de Master Mix a cada pozo de la placa.
- Agregar 10µl de muestra en los respectivos pozos y 10µl de agua purificada (duplicado) para los controles negativos.
- Agregar 10µl del estándar de las diluciones 10^0 a 10^6 / 10µl por triplicado, utilizando una pipeta exclusiva para ADN estándar.
- Centrifugar a 3000 xg durante 3 minutos.
- Desarrollar el qPCR dentro de un adecuado sistema, seleccionando los parámetros apropiados (considerando el uso de la cubierta con adhesivo y el volumen total en cada recipiente, etc.). Siguiendo la activación del AmpliTaq Gold por 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos (15 a 95 °C y 1 minuto a 60 °C) son desarrollados.
- La cantidad de ADN será definida como la mediana de la información obtenida después de corregir el factor de diluciones cuando sea necesario.

7. Puntos Críticos

a. Equipo para qPCR

Todo equipo utilizado debe de ser estéril y apto para biología molecular.

8. Aspectos de bioseguridad

a. Manejo de muestras y reactivos

Utilizar en todo momento del análisis, bata de manga larga, guantes, mascarilla y lentes en el momento de utilizar reactivos, para evitar contaminación hacia las muestras.

b. Manejo de desechos

Los desechos son manejados conforme los lineamientos establecidos.

PCR Cuantitativo para JC Poliomavirus Humano

1. Objetivo y campo de aplicación

a. Objetivo

Dar los lineamientos para la detección y amplificación de segmentos de ADN para la identificación y cuantificación de JC Poliomavirus humano a partir de la extracción de ADN de muestras de agua concentradas en fosfato amortiguador.

b. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a muestras de agua desinfectada y otras aguas potables destinadas al uso y/o consumo humano.

2. Referencias

- Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM. Real-time PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods.* 2006 Jul 135(1):32-42.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A, Calvo, M, Girones R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72: 7894-7896.

3. Responsabilidades

a. Supervisor del Área de Ambiente y Salud

Supervisa el cumplimiento y utilización del procedimiento aquí descrito.

b. Analista encargado

Utiliza el procedimiento para la realización del análisis.

4. Descripción del procedimiento

a. Principio

Consiste en la amplificación de fragmento de ADN que han sido obtenidos luego de la extracción, y ser detectados y cuantificados por la técnica de qPCR o PCR cuantitativa, la especificidad del método se logra utilizando el reactivo TaqMan que posee una sonda fluorogénica que permite la detección de productos o fragmentos de ADN detectados durante toda la reacción.

b. Equipo

- Vortex
- Cabina de bioseguridad
- Campana de flujo laminar
- Congelador a -20 °C
- Congelador a -80 °C
- Centrífuga
- Centrífuga para placar RT-PCR
- Cubetas para extracción de ADN
- Criobiales
- Criobox
- Incubadora a 37 °C
- Microcentrífuga
- Real Time PCR applied Biosystem

c. Materiales

- Pipetas automáticas de 1 a 10µl
- Pipetas automáticas de 5 a 50µl
- Pipetas automáticas de 10 a 100µl
- Pipetas automáticas de 10 a 200µl
- Pipetas automáticas de 100 a 1000µl
- Puntas para pipetas de 1 a 10µl
- Puntas para pipetas de 5 a 50µl y de 10 a 100µl

- Puntas para pipetas de 100 a 1000µl
- Viales de almacenamiento de 1.5ml

d. Reactivos

- Reactivo para extracción de ADN
- Buffer de lisis para la purificación de ácido nucleico viral (AVL)
- Buffer para la desnaturalización de proteínas en la muestra (AW1)
- Buffer para la purificación de ADN (AW2)
- Buffer para la dilución de carrier ARN (AVE)
- TaqMan Enviromental Master Mix 2.0
- Sonda de ADN de JC Poliomavirus humano JE3P (5'-6-FAMAGGATCCCAACAC TCTACCCACCTAAAAAGA-BHQ1-3').
- Primer de ADN de JC Poliomavirus humano JE3F (5' ATGTTTGCCAGTGATGAT GAAAA-3') y JE3R (5'-GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT-3').

5. Preparación de Reactivos

a. Solución de Trabajo

Diluir los primers y las sondas, que se encuentran en una solución de 100µM, a 10µl del primers se agregan 34,44µl de agua, para obtener una concentración final de 22,50µM y a 10µl de la sonda se agregan 78,89µl de agua, para alcanzar una concentración final de 11,25µM.

b. Master Mix

Agregar 12,5µl de Mix 2x, 1µl de primer 1, 1µl de primer 2 y 0,5µl de la sonda.

6. Procedimiento de análisis

a. Extracción de ADN viral

- Pipetear 560µl de buffer AVL, y colocarlo en un tubo para microcentrífuga de 1,5ml.
- Agregar 140µl de la muestra, e incubar a temperatura ambiente (15 – 25 °C) por 10 minutos.
- Mezclar en un vortex por 15 segundos y volver a centrifugar para remover excesos o gotas de la tapa.
- Agregar 560µl de etanol (96 – 100%), mezclar en el vortex por 15 segundos.
- Pipetear 630µl de la mezcla anterior y servirlos en una columna.
- Pipetear 560µl de buffer AVL y centrifugar por 1 minuto a 8000 xg.
- Repetir agregando 500µl de buffer AW1 a la columna y centrifugar 1 minuto a 8000 xg.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo nuevo.

- Agregar 500µl de buffer AW2 a la columna y centrifugar por 3 minutos a 14000 xg.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y colocar la columna en un tubo para microcentrifuga de 1,5ml.
- Agregar a la columna 40µl de buffer AVE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugar por 1 minuto a 8000 xg. Repetir el paso anterior, agregando otros 40µl de buffer AVE.

b. Reacción final

- Agregar 15µl de Master Mix a cada pozo de la placa.
- Agregar 10µl de muestra en los respectivos pozos y 10µl de agua purificada (duplicado) para los controles negativos.
- Agregar 10µl del estándar de las diluciones 10^0 a 10^6 / 10µl por triplicado, utilizando una pipeta exclusiva para ADN estándar.
- Centrifugar a 3000 xg durante 3 minutos.
- Desarrollar el qPCR dentro de un adecuado sistema, seleccionando los parámetros apropiados (considerando el uso de la cubierta con adhesivo y el volumen total en cada recipiente, etc.). Siguiendo la activación del AmpliTaq Gold por 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos (15 a 95 °C y 1 minuto a 60 °C) son desarrollados.
- La cantidad de ADN será definida como la mediana de la información obtenida después de corregir el factor de diluciones cuando sea necesario.

7. Puntos Críticos

a. Equipo para qPCR

Todo equipo utilizado debe de ser estéril y apto para biología molecular.

8. Manejo de muestras y reactivos

Utilizar en todo momento del análisis, bata de manga larga, guantes, mascarilla y lentes en el momento de utilizar reactivos, para evitar contaminación hacia las muestras.

a. Manejo de desechos:

Los desechos son manejados conforme los lineamientos establecidos.