



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**INCIDENCIA DE ENTEROVIRUS Y NOROVIRUS EN  
VIAJEROS QUE ARRIBAN A CULIACÁN, SINALOA**

---

Por:

**Roxana Alicia Cázares Olivas**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Roxana Alicia Cázares Olivas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

Dr. Osvaldo López Cuevas  
Director de Tesis



---

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz  
Integrante de comité de tesis

JOSE A. MEDRANO

Dr. José Andrés Medrano Félix  
Integrante de comité de tesis



---

Dra. Nohelia Castro del Campo  
Integrante de comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Incidencia de Enterovirus y Norovirus en Viajeros que Arriban a Culiacán, Sinaloa" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Roxana Alicia Cázares Olivas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado durante el posgrado. Sin este apoyo no hubiera sido posible lograrlo.

Doy un profundo agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) igualmente por el apoyo logrado, por aceptarme y abrirme las puertas del centro para realizar mi posgrado, a sus instalaciones y a sus investigadores por hacerme formar parte de esta gran familia.

Valoro el apoyo al proyecto que financió mi investigación, el mismo que está a cargo del Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz y todo el equipo de trabajo de LANIIA. Sin el financiamiento buscado por este equipo de trabajo, no hubiera sido posible lograr esta investigación.

Gracias a mis compañeros de trabajo y a mi comité, por siempre estar al lado de mí, sacando este proyecto adelante y haciéndome ver que soy capaz de lograr lo que me proponga.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada a mi familia, principalmente a mi madre y a mi abuelita, que desde siempre me han demostrado su apoyo incondicional, estando en las buenas y en las malas, apoyándome en todas mis decisiones. Una, que es mi ángel en el cielo y que sé que me acompaña a donde quiera que voy.

A mi esposo, Alejandro, por ser mi compañero de vida y mi soporte para lograr todo lo que me propongo, las decisiones que he tomado y por amarme sobre todas las cosas. Te amo.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Enfermedades Infecciosas .....	15
2.1.1 Norovirus .....	17
2.1.2 Enterovirus.....	18
2.1.3. Virus en Superficies y Áreas Confinadas de Transportes.....	19
2.2. Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR) .....	21
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos .....	27
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
5.1. Etapa 1. Toma, Manejo y Transporte de la Muestra .....	28
5.2. Etapa 2. Concentración de Partículas Virales.....	28
5.3. Etapa 3. Detección Molecular .....	29
5.3.1. Extracción de ARN Viral.....	29
5.3.2 Detección de Norovirus GI/GII y Enterovirus Humanos Mediante RT-PCR en Tiempo Real .....	30
5.3.2.1 Enterovirus .....	30
5.3.2.2 Norovirus GI y GII.....	31
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	32
6.1 Obtención, Selección y Procesamiento de la Muestra.....	32
6.2 Detección Molecular por RT-PCR .....	33
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	41
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pagina</b>
1	Muestras positivas de <i>Norovirus</i> .....	34
2	Muestras negativas de <i>Enterovirus</i> .....	37

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Enfermedades causadas por <i>Enterovirus</i> .....	19
2	Criterios de selección de las muestras.....	28
3	Controles de reacción del lote para la amplificación de <i>Enterovirus</i> mediante RT-PCR tiempo real.....	30
4	Condiciones del instrumento para la amplificación de <i>Enterovirus</i> por Amplisens®.....	31
5	Controles de reacción del lote para la amplificación de <i>Norovirus GI / GII</i> mediante RT-PCR tiempo real.....	31
6	Condiciones del instrumento para la amplificación de <i>Norovirus GI / GII</i> por Amplisens®.....	31
7	Muestras de aguas residuales concentradas.....	32
8	Detección de <i>Enterovirus</i> y <i>Norovirus</i> en aguas residuales.....	33

## RESUMEN

Las enfermedades infecciosas transmitidas por la ruta fecal-oral son la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Estas enfermedades son causadas principalmente por bacterias, parásitos y virus; estos últimos son los más frecuentes, pero menos documentados. México cada año reporta de 5 a 6 millones de casos de diarreas agudas; sin embargo, el 94% de los casos son clasificados como “mal definidas”; es decir, no se puede determinar el organismo causante de la enfermedad. Se ha sugerido que los viajeros nacionales e internacionales contribuyen con la propagación de las enfermedades infecciosas alrededor del mundo. Los dos principales grupos de virus que causan infecciones diarreicas agudas son los *Norovirus* y *Enterovirus* humanos. Éstos liberan sus viriones o material genético principalmente por la materia fecal, que posteriormente llegan al ambiente por medio de las aguas residuales. Estudiar la incidencia de virus entéricos en aguas residuales mediante la Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR) se considera una herramienta útil, ya que permite evaluar de manera indirecta la presencia de patógenos específicos en una población dada, y es un tema poco estudiado en México. El objetivo del presente estudio fue determinar la incidencia de *Enterovirus* y genogrupos I y II de *Norovirus* humanos en aguas residuales del municipio de Culiacán, Sinaloa. Se analizaron 16 muestras de aguas residuales de los reservorios de autobuses regionales y foráneos en la ciudad de Culiacán, Sinaloa con una frecuencia semanal durante los meses de febrero, marzo y abril de 2022. Las muestras se concentraron por precipitación con polietilenglicol 6000 y cloruro de sodio, seguido de la extracción de ARN total y determinación de la presencia de los virus por RT-PCR en tiempo real. De las 16 muestras de aguas residuales analizadas se encontró la presencia de *Norovirus* GII en dos de ellas, no obstante, *Enterovirus* no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos muestran que la EBAR es una herramienta útil para detectar a patógenos causantes de enfermedades diarreicas agudas en viajeros, tales como *Norovirus* en Culiacán, Sinaloa, México.

**Palabras clave:** Norovirus, Enterovirus, Aguas Residuales, Viajeros.

## ABSTRACT

Infectious diseases transmitted by the fecal-oral route are the leading cause of morbidity and mortality worldwide. These diseases are mainly caused by bacteria, parasites and viruses; The latter are the most frequent, but least documented. Mexico reports 5 to 6 million cases of acute diarrhea each year; However, 94% of cases are classified as “poorly defined”; That is, the organism causing the disease cannot be determined. It has been suggested that domestic and international travelers contribute to the spread of infectious diseases around the world. The two main groups of viruses that cause acute diarrheal infections are the human Norovirus and Enterovirus. These release their virions or genetic material mainly through fecal matter, which subsequently reach the environment through wastewater. Studying the incidence of enteric viruses in wastewater through Wastewater-Based Epidemiology (EBAR) is considered a useful tool, since it allows the indirect evaluation of the presence of specific pathogens in a given population, and is a poorly studied topic in Mexico. . . The objective of the present study was to determine the incidence of Enterovirus and genogroups I and II of human Norovirus in wastewater from the municipality of Culiacán, Sinaloa. 16 samples of wastewater from the reservoirs of regional and foreign buses in the city of Culiacán, Sinaloa were analyzed with a weekly frequency during the months of February, March and April 2022. The samples were concentrated by precipitation with polyethylene glycol 6000 and chloride sodium, followed by the extraction of total RNA and determination of the presence of the viruses by real-time RT-PCR. Of the 16 wastewater samples analyzed, the presence of Norovirus GII was found in two of them, however, Enterovirus was not detected in any of the samples analyzed. The results obtained show that EBAR is a useful tool to detect pathogens that cause acute diarrheal diseases in travelers, such as Norovirus in Culiacán, Sinaloa, Mexico.

**Keywords:** Norovirus, Enterovirus, Wastewater, Travelers.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades infecciosas que aquejan a los humanos, las enfermedades diarreicas agudas ocasionadas por el consumo de alimentos y agua contaminada son de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Sotelo-Coronado *et al.*, 2017; Leshem y Lopman, 2018; Kendra *et al.*, 2022). En México, cada año se reportan de 5 a 6 millones de casos de diarreas agudas; sin embargo, hasta el 94% de los casos se clasifican como “mal definidas”; es decir, sin que se determine el organismo causante de la enfermedad y solo se reporta la posible fuente de infección con base en el cuadro clínico del paciente (Olaiz-Fernández *et al.*, 2019). Además, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 842,000 personas mueren cada año por enfermedades diarreicas como consecuencia de consumir agua contaminada o por una mala higiene de manos (OMS, 2022). Estas enfermedades son causadas principalmente por bacterias, parásitos y virus; estos últimos son los más frecuentes, pero menos documentados (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004; Sotelo-Coronado *et al.*, 2017; Leshem y Lopman, 2018). La transmisión de virus en tales situaciones puede ser difícil de controlar debido a su baja dosis infectiva, a su capacidad de resistencia ambiental y múltiples rutas de transmisión incluyendo contacto persona -persona, así como a través de alimentos, agua y/o fómites contaminados (Sotelo-Coronado *et al.*, 2017; Lindsay *et al.*, 2018).

Las infecciones por virus pueden tener consecuencias muy graves para la salud de las personas, sobre todo para los niños, adultos mayores y para las personas inmunocomprometidas; y son motivo de gran preocupación debido a su baja dosis infecciosa, capacidad de mutar fácilmente, incapacidad para ser tratados con antibióticos, resistencia a la desinfección, fácil diseminación y a su alta capacidad de supervivencia en el ambiente (O’Bannon, 2020).

La transmisión de infecciones virales es marcadamente estacional en regiones templadas, pero la incidencia en áreas tropicales y subtropicales es muy alta y constante durante todo el año (Begier *et al.*, 2008). En este sentido, se presume que las personas que viajan desde y hacia estos destinos contribuyen significativamente a la propagación de los virus, pues son fuentes importantes de circulación global, acelerando la propagación de virus e introduciendo con ello nuevas cepas de

brotos en nuevas zonas geográficas (Apelt *et al.*, 2010; Lindsay *et al.*, 2018). Para los viajeros pertenecientes a países desarrollados que viajan a países en vías de desarrollo, el saneamiento deficiente del agua residual y las malas prácticas higiénicas durante el manejo y preparación de los alimentos dan como resultado la transmisión de patógenos entéricos, donde la fuente principal de propagación de los virus entéricos y respiratorios es la contaminación por materia fecal humana de personas infectadas, seguido de aerosoles derivados del estornudo o el vómito en espacios cerrados, superficies contaminadas, entre otros (Leone *et al.*, 2016; da Silva *et al.*, 2016; Lindsay *et al.*, 2018). Por costumbre social, normalmente la deposición de heces y vómitos tienen lugar en los baños, sugiriendo que estos espacios pueden ser una fuente importante de contaminación, sobre todo si existe una higiene poco frecuente o ineficaz, lo que contribuye en gran medida a la propagación de las infecciones virales por este medio (Begier *et al.*, 2008).

La Gastroenteritis Aguda (GEA), generalmente manifestada por diarrea, sigue siendo el diagnóstico principal de los viajeros enfermos que regresan a su país de origen en busca de atención médica (Lindsay *et al.*, 2018). Si bien, la tasa de incidencia de enfermedades virales entre los viajeros no está fuertemente documentada, las estimaciones de prevalencia entre las personas con diarrea del viajero oscilan entre el 3 y el 65%, según factores como los métodos de diagnóstico utilizados, la carga viral del paciente y la población a la que éste pertenece; donde cabe señalar que en el caso de Estados Unidos, hasta el 83% de las muertes asociadas a diarrea ocurren en personas mayores de 65 años (Lindsay *et al.*, Sotelo-Coronado *et al.*, 2017). En este sentido, los *Norovirus* y *Enterovirus* humanos son los dos principales grupos de virus entéricos que causan enfermedades infecciosas gastrointestinales transmitidas por el agua y superficies (LoFranco, 2017).

Los *Norovirus* humanos (HuNoV) pertenecen al género *Norovirus*, de la familia *Caliciviridae* y son virus sin envoltura con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Las cepas de NoV se clasifican actualmente en siete genogrupos (G), que se subdividen en al menos treinta genotipos (da Silva *et al.*, 2016). Los *Norovirus* son considerados en muchos países como la principal causa viral de los brotes de gastroenteritis aguda (GEA) en adultos, y como el segundo agente viral más común en niños después de los rotavirus del grupo A (RVA) (da Silva *et al.*, 2016; Villicaña *et al.*, 2019). El genogrupo GII de NoV es el más común encontrado en casos de gastroenteritis humana y el mayormente distribuido en todo el mundo (Kendra *et al.*, 2022). Hoy

en día, se estima que los *Norovirus* causan alrededor de 685 millones de casos de infección cada año a nivel mundial, de los cuales aproximadamente 200 millones ocurren en niños menores de 5 años y se estima que causan la muerte de unos 50 000 niños cada año, principalmente en los países en desarrollo. Además, genera pérdidas económicas por alrededor de 60 000 millones de dólares en el mundo, por concepto de atención médica y pérdida de productividad (NCIRD, 2023a).

Por otro lado, los virus del género *Enterovirus* pertenecen a la familia *Picornaviridae* y consta de 15 especies, las cuales se dividen en: *Enterovirus* A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y L y *Rinovirus* A, B, y C. Actualmente, se sabe que los *Enterovirus* A, B, C, D y J son los únicos que causan enfermedades en los humanos (Zell, 2020). el grupo de los *Enterovirus* incluye además a los *Poliovirus*, los *Echovirus*, los *Coxsackievirus* y los *Enterovirus* humanos, que a su vez se subdividen en otras especies y serotipos (Zell, 2020). Los *Enterovirus* son pequeños, miden aproximadamente 25 a 30 nm de diámetro y son de forma icosaédrica. Son virus no envueltos y su estructura consiste en una cápside proteica que rodea a un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Los *Enterovirus* causan un amplio espectro de enfermedades, desde infecciones asintomáticas hasta encefalitis, y son la principal causa de meningitis aséptica en los países desarrollados (Begier *et al.*, 2008).

Investigaciones como la de Gerba y colaboradores (2013) y la de Zhang y colaboradores (2016), señalan que tanto el virión como el ARN viral (resultante de la ruptura del virus) se eliminan a través de las excretas corporales, principalmente a través de los aerosoles derivados de la tos o estornudos, vómito o la materia fecal de personas infectadas, que posteriormente se liberan al ambiente por medio de las aguas residuales. En este sentido, investigadores de todo el mundo han destacado que la presencia de ARN viral en aguas residuales urbanas brinda la oportunidad de poder utilizarlas como una herramienta de vigilancia para posibles brotes en una comunidad dada, ya que el genoma viral puede encontrarse en concentraciones altas, las cuales van desde  $10^2$  hasta  $10^{12}$  copias genómicas por litro, según sea el virus (Corpuz *et al.*, 2020; Pulicharla *et al.*, 2021). A este enfoque de detección de ARN viral en aguas residuales se le conoce como Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR), y nos puede dar información de gran importancia para la vigilancia de brotes y eventos pandémicos. Dicha información es útil para tomar las acciones correctivas y preventivas pertinentes en materia de salud pública, principalmente en lugares donde

no se tienen los recursos necesarios para la vigilancia clínica, o bien, donde no se lleva un control exhaustivo de los casos de enfermedades que ocurren en la comunidad (Sims *et al.*, 2020; Chacón *et al.*, 2021). Desafortunadamente, en México, muchos de los agentes etiológicos causantes de enfermedades como la diarrea u otras enfermedades infecciosas no están determinados (Olaiz-Fernández *et al.*, 2019). Además, el sólo lograr la detección efectiva del ARN viral en las aguas residuales es una de las etapas más complejas y críticas para el desarrollo de un modelo completo de predicción como lo es la EBAR, con lo cual es lo primero con lo que se debe comenzar (Xagorarakis, 2021; NCIRD, 2023b). Primeramente, se determina al organismo objetivo, posteriormente se diseña un efectivo plan de muestreo y almacenamiento, y se identifica al organismo mediante los métodos de prueba establecidos (Xagorarakis, 2021; NCIRD, 2023b). La etapa subsecuente es su análisis donde se determina la relación entre la presencia o concentraciones virales medidas en las aguas residuales y la incidencia de enfermedades virales en la comunidad, desarrollando así la EBAR (Xagorarakis, 2021).

En México, el sistema nacional de vigilancia epidemiológica (SINAVE) se centra en bacterias y parásitos. Son pocos los estudios que han indagado sobre la epidemiología molecular de virus (Félix-Valenzuela *et al.*, 2020). El estado de Sonora en México comparte frontera con el estado de Arizona de los EE. UU., y existe un flujo migratorio muy dinámico a través de la frontera hacia todo el territorio mexicano, mismo que también pasa por Sinaloa. Hasta la fecha, no hay datos disponibles sobre la prevalencia de *Norovirus* y *Enterovirus* humanos circulantes que incluyan estos dos países (Félix-Valenzuela *et al.*, 2020). El conocimiento de la epidemiología de virus entéricos asociadas con los viajeros provee de información a las autoridades de la salud global de los viajeros que arriban a una ciudad, y ofrece datos de valor para la detección temprana de enfermedades infecciosas, así como para establecer cercos sanitarios u otras medidas preventivas y correctivas cuando se presenta un brote o evento pandémico (Hellmér *et al.*, 2014; Sims *et al.*, 2020). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la incidencia de *Norovirus* y *Enterovirus* humanos en aguas residuales de autobuses foráneos con viajeros que arriban al municipio de Culiacán, Sinaloa, para de esta manera constituir las bases para utilizar una innovadora herramienta para la vigilancia de la propagación de enfermedades asociadas a virus patógenos a través de su estudio en las aguas residuales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Enfermedades Infecciosas

De las enfermedades infecciosas que afectan al ser humano, las enfermedades diarreicas agudas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo (Sotelo-Coronado *et al.*, 2017; Leshem y Lopman, 2018; Kendra *et al.*, 2022). Por definición, se le llama diarrea al aumento de la frecuencia, volumen y fluidez de las heces por alguna causa infecciosa, anomalías congénitas, deficiencias enzimáticas, factores mecánicos, endócrinos, inmunológicos, nutricionales y tóxicos; por su parte, la diarrea aguda infecciosa se presenta como un fenómeno aislado, de naturaleza exógena y normalmente su duración es inferior a 2 semanas, es considerada como uno de los problemas de salud más graves en los países en vías de desarrollo, donde supone la segunda causa de enfermedad y muerte infantil con 525 000 cada año (OMS, 2017; Leshem y Lopman, 2018). El mecanismo infeccioso de la diarrea puede ser de tipo invasivo, por colonización del tracto intestinal y/o toxigénico (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004).

La diarrea viral es invasiva, no inflamatoria y cursa de forma autolimitada, excepto en aquellas personas que se encuentran inmunocomprometidas (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004). Los virus son responsables del 70% de las enfermedades diarreicas infecciosas, y el *Norovirus*, o también conocido como virus Norwalk, se considera la causa más importante de brotes epidémicos de gastroenteritis no bacterianas que se presentan en escuelas, hospitales, centros geriátricos y seno familiar, y que afectan a adultos, niños y personas de edad avanzada (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004; Leshem y Lopman, 2018). Los *Enterovirus* (específicamente *Coxsackievirus A*, *B* y *Echovirus*) son también causantes de la gastroenteritis (LoFranco, 2017). Seguido de las enfermedades diarreicas infecciosas, tenemos también aquellas enfermedades respiratorias, cutáneas como la enfermedad de manos pies y boca, meningitis, miopericarditis, conjuntivitis, que son igualmente causadas por los virus del género *Enterovirus* (LoFranco, 2017; Nikonov *et al.*, 2017).

Los viajeros nacionales e internacionales contribuyen en gran medida con la propagación de las enfermedades infecciosas alrededor del mundo, pues van desde o hacia países donde comúnmente se encuentran virus como los *Norovirus* y los *Enterovirus*. Como ejemplo de ello, a un crucero británico se le cerraron las puertas de Grecia, Italia y España, al llevar a bordo pasajeros infectados por *Norovirus*, el cual es altamente contagioso (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004). Otro ejemplo, Fretz y colaboradores (2003) realizaron un estudio en donde un gran número de peregrinos (119 adultos mayores y 89 personal de cuidados) que regresaban a Suiza desde Lourdes, Francia y padecían de GEA, lo cual generó más de 380 casos secundarios de infecciones por *Norovirus*, incluyendo una muerte en una casa de adultos mayores. Además, el mismo brote ocasionó cuatro muertes en Francia, Holanda e Irlanda. En el estudio se confirmó la presencia de *Norovirus* en 9 de ellos (15.7 % de incidencia), donde GII predominó y que, según datos del autor, la causa probable fue la transmisión de persona a persona debido al ambiente contaminado por el número tan elevado de peregrinos que asistieron a la ciudad de Lourdes, Francia en esos días. En otro estudio, Chapin y colaboradores (2004), analizaron la presencia de *Norovirus* mediante un método sensible de RT-PCR en un total de 54 muestras provenientes de 35 pacientes con diarrea que viajaron de Estados Unidos de América hacia México y Guatemala. El virus se detectó en el 65% de las muestras analizadas, donde encontraron al genogrupo GI. Esto sugiere que las infecciones por *Norovirus* ocurren de manera frecuente entre viajeros que experimentan episodios de diarrea cuando visitan México o países como Guatemala. El estudio señala también que mientras más prolongada sea la estancia en el país destino, es mayor la probabilidad de encontrar la infección, siendo significativamente mayores después de los 7 días de estancia (Chapin et al., 2004).

Aunque el riesgo de poliomielitis entre los viajeros no inmunizados en países tropicales en desarrollo está bien documentado, no se han informado con tanta frecuencia otras enfermedades por *Enterovirus* relacionadas con los viajes, probablemente debido a las bajas tasas de ataque clínico y los síntomas inespecíficos; o bien, que los casos no son reportados y bien documentados. Begier y colaboradores (2008), reportaron un brote de enfermedad EV no polio entre viajeros a México. El 30 de junio de 2004, el director del Laboratorio de Virología Clínica del Hospital Yale-New Haven, se puso en contacto con el Departamento de Salud Pública de Connecticut para informar sobre 2 estudiantes de secundaria hospitalizados con meningitis EV después de un viaje

religioso a México. El Departamento de Salud Pública de Connecticut realizó una investigación en la cual determinaron que 20/28 estudiantes tenían infección por *Enterovirus* (71.4%), de los cuales, 4 tenían echovirus 30, 11 tenían coxsackievirus (CV) A1, 4 tenían echovirus 30 y CVA1, y 1 tenía solamente coxsackievirus (CV) A5.

Hasta el 2024, no existe ningún sistema de vigilancia que monitoree las infecciones entéricas a nivel global, aunque muchos países, incluido Estados Unidos, cuentan con sistemas nacionales de vigilancia de enfermedades entéricas bastante actualizados. De hecho, investigadores de distintos países como Suecia y Finlandia han utilizado en el pasado los datos de vigilancia nacional de Estados Unidos para examinar enfermedades entéricas en viajeros. Sin embargo, la Red Mundial de Vigilancia “GeoSentinel” supervisa y alerta sobre aquellas enfermedades relacionadas con los viajeros en distintos sitios en todo el mundo. Estos sistemas brindan información útil sobre la distribución mundial de infecciones entéricas que causan enfermedades en los viajeros, pero hay poca o nula información disponible sobre el riesgo entre los viajeros mexicanos (Kendall *et al.*, 2012).

### **2.1.1 *Norovirus***

En 1972, se descubrió el *Norovirus* (NoV) como el agente causante de un brote de gastroenteritis en 1968 en una escuela primaria en Norwalk, Ohio, la identificación se llevó a cabo mediante microscopía inmunoeléctrica (LoFranco, 2017). Los NoV pertenecen al género *Norovirus*, familia *Caliciviridae*. Actualmente están clasificados en siete genogrupos (G), que a su vez se subdividen en al menos treinta genotipos. Los virus pertenecientes a GI, GII y GIV infectan a humanos, mientras que GIII, GV, GVI y GVII se han encontrado en animales. Sólo los genogrupos GII y GIV comparten infección humano-animal (GII para porcinos y GIV para caninos y felinos), además de ser el genogrupo GII el más predominante en humanos por dos décadas seguidas (da Silva *et al.*, 2016; Kendra *et al.*, 2022). Estructuralmente, los *Norovirus* son virus sin envoltura, con cápside icosaédrica, pequeños (~38 nm de diámetro) y se constituyen por un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo que contiene tres marcos de lectura abierta (ORF1, ORF2 y

ORF3), los cuales codifican proteínas estructurales y no estructurales (da Silva *et al.*, 2016; LoFranco, 2017).

Se ha estimado que la dosis infecciosa de *Norovirus* es tan baja como 18 viriones durante los ensayos de alimentación con humanos (Lindsay *et al.*, 2018). Se ha informado que los *Norovirus* se eliminan en las heces de humanos por hasta dos semanas después de la infección (NCIRD, 2023a). Se ha informado también que los *Norovirus* se excretan en las heces infectadas en concentraciones de hasta 100 000 millones de copias genómicas virales por gramo de heces y son capaces de persistir en el medio ambiente (LoFranco, 2017).

Los *Norovirus* se caracterizan por causar infecciones muy difundidas, benignas y autolimitadas, que aparecen durante todo el año, siendo las estaciones otoño e invierno las más frecuentes. Se transmiten por vía fecal-oral, a partir de una fuente común, como el agua, alimentos y baños. Producen gastroenteritis y se caracterizan por tener un período de incubación de 24 horas, seguido de cefalgia, náuseas, vómitos y diarreas (se observa un predominio de los vómitos en niños y de diarreas en adultos). Afectan al intestino delgado, en el que se observa un acortamiento y ensanchamiento de las vellosidades intestinales (Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2004). Se calcula que los *Norovirus* causan alrededor de 685 millones de casos de infección cada año en el mundo, donde 200 millones ocurren en niños menores de 5 años y se estima que causan la muerte de unos 50 000 niños cada año (NCIRD, 2023a).

### **2.1.2 Enterovirus**

El descubrimiento de este grupo de virus fue consecuente al estudio de los casos de poliomielitis en la década de 1940. El trabajo de Paul y Trask identificó poliovirus en heces, lo que generó el desarrollo de métodos para investigar a los virus de origen entérico (Paul y Trask, 1942).

Actualmente hay más de 200 virus que se encuentran dentro de la familia *Picornaviridae*. Estos virus son pequeños, varían de 20 a 30 nm de diámetro y poseen un material genético conformado por ARN monocatenario de sentido positivo, no poseen envoltura en su estructura icosaédrica. El

genoma tiene aproximadamente 7 500 nucleótidos y contiene un solo marco de lectura abierto que codifica una poliproteína que luego se procesa para producir las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP4 y las no estructurales (LoFranco, 2017).

Los diferentes tipos de *Enterovirus* pueden también causar un amplio espectro de enfermedades en humanos y presentar una amplia gama de síntomas (Cuadro 1). La dosis infecciosa de *Enterovirus*, los períodos de incubación y los síntomas de la enfermedad dependerán en gran medida de la especie que esté causando la enfermedad y, al igual que los *Norovirus*, también se transmiten a través de aguas contaminadas con aguas residuales (LoFranco, 2017; Nikonov *et al.*, 2017).

**Cuadro 1.** Enfermedades causadas por *Enterovirus*.

<i>Género</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Enfermedad asociada</i>
<i>Enterovirus</i>	Coxsackievirus A, B	Gastroenteritis, enfermedad de mano-pie y boca, enfermedad respiratoria, fiebre, anomalías cardíacas, meningitis, síndrome de Guillain-barré.
	Echovirus	Gastroenteritis, fiebre, enfermedad respiratoria, meningitis.
	Poliovirus	Parálisis, meningitis y fiebre.

### 2.1.3. Virus en Superficies y Áreas Confinadas de Transportes

Las infecciones virales causadas por *Norovirus* y *Enterovirus* son un importante problema de salud pública alrededor del mundo. Estos virus son altamente contagiosos y pueden transmitirse a través del contacto con superficies contaminadas en baños, espacios cerrados y entornos de viaje por personas infectadas (Apelt *et al.*, 2010; Leone *et al.*, 2016; Begier *et al.*, 2008). En los baños, las superficies que se contaminan con mayor frecuencia incluyen lavabos, inodoros, manijas de puertas y grifos, las cuales pueden albergar diferentes microorganismos, incluyendo partículas virales debido a su contacto y manipulación por personas enfermas, favoreciendo el contagio de nuevas personas al entrar en contacto con estas superficies contaminadas. Además, los virus también pueden transmitirse por el aire cuando una persona infectada tira de la cadena del inodoro o abre

un grifo, lo que provoca la propagación del virus en el aire. Esto convierte a los baños en un área de alto riesgo para la transmisión de estos virus (Begier *et al.*, 2008).

Los espacios cerrados como aviones, autobuses y cruceros también representan un riesgo significativo para la transmisión de *Norovirus* y *Enterovirus*. En estos entornos, los virus pueden propagarse fácilmente debido a la proximidad entre los pasajeros, lo cual propicia un mayor contacto. Los espacios reducidos en estos modos de transporte también dificultan el mantenimiento de una higiene adecuada, lo que aumenta el riesgo de transmisión (Leone *et al.*, 2016; Begier *et al.*, 2008). Los viajeros corren un mayor riesgo de contraer enfermedades diarreicas virales, incluidas las causadas por *Norovirus* y *Enterovirus*, debido a que viajar expone a las personas a nuevos entornos, nuevos alimentos y nuevas personas, lo que aumenta la probabilidad de exposición a estos virus. Además, es más probable que los viajeros adopten comportamientos de alto riesgo, como comer en restaurantes con higiene deficiente o no lavarse las manos con frecuencia, lo que aumenta el riesgo de infección (Leone *et al.*, 2016; Begier *et al.*, 2008).

Holmes y Simmons (2009), realizaron un estudio de caso de un brote de enfermedad gastrointestinal que ocurrió en un vuelo de larga distancia, seguido de un viaje en crucero por 14 días más. El estudio involucró un vuelo del Reino Unido a los EE. UU., donde 52/224 pasajeros (23.2 %) desarrollaron enfermedades gastrointestinales durante el vuelo o dentro de las 72 horas posteriores. Los síntomas incluyeron vómito y diarrea, y se identificó a *Norovirus* como el agente causal de la infección. El estudio encontró que la infección probablemente se propagó a través del contacto con superficies contaminadas en el avión, incluidos los baños, cinturones de seguridad, reposabrazos y bandejas. El estudio destacó claramente el potencial de transmisión de enfermedades durante los viajes aéreos y la necesidad de medidas adecuadas de prevención y control. También se realiza un énfasis en la importancia de una comunicación efectiva entre las agencias de salud pública y la industria de las aerolíneas y la necesidad de una mayor conciencia sobre los riesgos de transmisión de enfermedades en los viajes aéreos. Otro estudio similar fue el de Kirking y colaboradores (2010), quienes estudiaron un brote en un vuelo transatlántico en octubre de 2008, donde 17 de los 54 pasajeros y miembros de la tripulación (31.5%) desarrollaron síntomas de infección por *Norovirus*. Los autores realizaron una investigación epidemiológica y recolectaron muestras de heces de las personas infectadas para confirmar el diagnóstico. El estudio

encontró que el caso índice, un pasajero que había viajado recientemente a un área con un brote de *Norovirus*, era la fuente probable de infección para los demás pasajeros y miembros de la tripulación. Así mismo, se encontró evidencia de transmisión directa de persona a persona a través del contacto cercano con el caso índice. Además, el estudio encontró evidencia de transmisión a través del contacto con superficies contaminadas, como los bolsillos de los respaldos de los asientos y las manijas de los lavabos. Los autores señalaron que estas superficies se tocan con frecuencia y es posible que no se limpien ni desinfecten de manera efectiva entre vuelos.

## 2.2. Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR)

Los *Enterovirus* y *Norovirus* humanos se transmiten por la ruta fecal-oral y sus viriones (material genético) se eliminan principalmente a través de las excretas corporales como el vómito, estornudos, el esputo y las heces, que posteriormente se liberan al ambiente por medio de las aguas residuales (Gerba *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, casi cualquier virus que infecte a humanos se puede encontrar en estos ambientes e identificarlos mediante técnicas moleculares, a lo que también se le conoce como Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR) (Gerba *et al.*, 2013).

La EBAR es un sistema de vigilancia de la salud pública que implica el análisis de muestras de aguas residuales para detectar la presencia de patógenos o biomarcadores que puedan proporcionar información sobre la salud de las personas en una comunidad dada (NCIRD, 2023b). En términos generales, la EBAR puede consistir en cinco importantes pasos:

- 1) Deposición de virus.
- 2) Transporte por la red de alcantarillado.
- 3) Muestreo y almacenamiento.
- 4) Análisis de la concentración de ARN.
- 5) Estimación retrospectiva.

Hay múltiples métodos utilizados para el tercer, cuarto y quinto paso, pero hasta el momento, no

existen métodos estándar o claramente óptimos y a menudo se seleccionan con base en la revisión de la literatura, la familiaridad del autor con el método y el equipo y/o el presupuesto (LaTurner *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

La detección efectiva del ARN viral en las aguas residuales es una de las etapas más complejas y críticas en el desarrollo de un modelo completo de predicción. Puesto que principalmente se debe determinar si existe la presencia del organismo objetivo, seguido de diseñar un plan efectivo de muestreo (que incluya la frecuencia y el número de muestras a analizar) y el almacenamiento, llevar a cabo la identificación mediante los métodos de prueba que darán como resultado la información cualitativa o cuantitativa que se busca (Xagorarakis, 2021; NCIRD, 2023b). La etapa subsecuente es su análisis donde se determina la relación entre la presencia o concentraciones virales medidas en las aguas residuales y la incidencia de enfermedades virales en la comunidad, desarrollando así la EBAR (Xagorarakis, 2021).

Chacón y colaboradores (2021), mencionan que este enfoque EBAR se ha utilizado desde la vigilancia de la poliomielitis como parte de la Iniciativa de Erradicación Global de la Poliomielitis, realizada por la Asamblea Mundial de la Salud desde 1988 y ha ganado una atención significativa desde inicios de la pandemia de COVID-19 como una herramienta para monitorear la propagación del virus en las comunidades (Sims *et al.*, 2020). La muestra de agua residual se puede recolectar de las plantas de tratamiento de aguas residuales, en varios puntos de la red de alcantarillado, o bien, depósitos que recolecten los desechos orgánicos de las personas, y entonces, poder ser analizadas para detectar la presencia de ARN viral u otros indicadores de infección. Posteriormente, los datos pueden ser utilizados para estimar la incidencia, prevalencia, u otras enfermedades en una población determinada, incluidas las personas asintomáticas que pueden no haber sido identificadas a través de las pruebas tradicionales (Gerba *et al.*, 2013; Sims *et al.*, 2020).

Existen estudios que corroboran que la EBAR puede brindar información sobre el comportamiento de un virus como resultado de un brote o evento pandémico. No obstante, las concentraciones en las que se puede encontrar la partícula viral o su material genético suelen ser muy bajas debido al efecto de dilución por los grandes volúmenes de agua que se manejan en estos ambientes, por lo que es necesario concentrarlos en volúmenes más pequeños para que puedan ser detectados con la

precisión y exactitud que se requiere (Lu *et al.*, 2020; Sims *et al.*, 2020). Wang y colaboradores (2005), por medio de un método basado en filtración electropositiva de partículas y RT-PCR, lograron concentrar al virus envuelto conocido como SARS-CoV de muestras desinfectadas y no desinfectadas de aguas residuales de dos hospitales en Beijing, China que recibía a pacientes con SARS en la pandemia del 2002-2003 (309th Hospital y Xiao Tang Shan Hospital). Ellos encontraron que los ácidos nucleicos provenientes del virus SARS-CoV estaban presentes en las muestras sin desinfectar a concentraciones muy bajas para ser cuantificadas por los métodos moleculares utilizados (PCR), además el virus en su estado infectivo no se encontró presente en ambos hospitales. El estudio destaca la importancia de continuar la investigación en esta área, ya que monitorear las aguas residuales para detectar la presencia de patógenos virales puede ser una forma efectiva de detectar brotes de enfermedades infecciosas antes de que se generalicen en la población.

En la actualidad, diversos estudios han informado de la presencia de ARN del SARS-CoV-2 en las aguas residuales de varios países incluyendo a México. Carrillo-Reyes y colaboradores (2020), monitorearon la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales (influyente, efluente y lodos secundarios) de cinco plantas de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Querétaro, México, basándose en el análisis de genes RdRP, S y N mediante RT-PCR. Al menos uno de los genes evaluados del virus del SARS-CoV-2 fue detectado en el 36% de las muestras de influyente, y 45% para los lodos secundarios. En cuanto a las muestras de efluente, ninguna resultó positiva para los genes SARSCoV-2 analizados. Los autores observaron que la concentración de ARN viral en las muestras se correlacionó positivamente con la incidencia de casos de COVID-19 en la población local de ese momento (12 Log<sub>10</sub> copias/mL del gen RdRP con los 3.2 Log<sub>10</sub> casos acumulados), sugiriendo que el monitoreo de aguas residuales podría ser una herramienta útil para la detección temprana de brotes de enfermedades como COVID-19, así como para monitorear la efectividad de las medidas de control. También señalan que el monitoreo de aguas residuales podría ser muy valioso en áreas que cuentan con recursos limitados para pruebas clínicas, ya que proporciona una forma de monitorear la propagación del virus en la población.

Un estudio similar utilizado para concentrar 8 tipos de virus patógenos (*Norovirus*, *Astrovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Aichi Virus*, *Parechovirus*, Virus de la Hepatitis A y Hepatitis E) fue el de Hellmér y colaboradores (2014), en Gotemburgo Suecia, mediante la metodología de

concentración basada en la precipitación con leche desnatada y el método molecular de RT-PCR. A las muestras de aguas residuales recolectadas cada 2 semanas durante el periodo de enero-mayo del 2013 se les cuantificó la cantidad de copias genómicas de virus por litro de aguas residuales de cada virus, y a pesar de la gran pérdida de partículas virales en el proceso de extracción (alrededor del 10% de recuperación de la cantidad original de virus detectado) todos los virus, excepto los *Parechovirus*, pudieron identificarse en las muestras. La concentración más alta de *Norovirus* logró detectarse en las aguas residuales de 2 a 3 semanas antes de que en un hospital cercano acudieran pacientes a los que se les diagnosticara la infección por este mismo virus; es decir, la metodología fue capaz de predecir con anticipación de 15 días el brote de infección. El virus de la Hepatitis A (HAV) se detectó entre las semanas 5 y 13, y mediante la secuenciación de la proteína VP1 estructural se identificaron tres cepas diferentes. Dos de ellas involucradas en un brote en Escandinavia y en muestras de pacientes con hepatitis A aguda en Gotemburgo durante la primavera de 2013. Por lo tanto, el método utilizado resultó útil y concluyeron que puede ser una herramienta para detectar brotes virales incipientes en una comunidad dada y así brindar una alerta temprana antes de que los patógenos causantes sean detectados por la manifestación de la enfermedad.

En Costa Rica, Chacón y colaboradores (2021), emplearon la EBAR como herramienta para detección temprana de enfermedades infecciosas; se analizaron 60 muestras del influente de cinco plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) para detectar la presencia de virus entéricos por medio de filtración y precipitación con PEG 8000 y RT-PCR. A partir de 60 muestras, 59 se analizaron para enterovirus (EV) y virus de la hepatitis A (HAV), 38 muestras para norovirus GI y GII (NV GI; NV GII) y rotavirus A (RV). El *Rotavirus* presentó la positividad más alta (44%), seguido por el *Norovirus* GI/GII (34%), el *Enterovirus* (22%) y el virus de la Hepatitis A en solo el 8% de las muestras. Este estudio encontró que la concentración de virus entéricos en las muestras de aguas residuales se correlacionó positivamente con la incidencia de enfermedades gastrointestinales agudas en la población local. Al igual que el estudio de Hellmér y colaboradores (2014), los autores pudieron detectar la carga viral en las muestras de aguas residuales varias semanas antes del inicio de los casos notificados de estas infecciones en la población, concluyendo que este enfoque podría ser útil para identificar las fuentes de los brotes, así como para monitorear la efectividad de las medidas de control.

Por último, se tienen tres estudios con resultados muy similares; Lizasoain y colaboradores (2021), estudiaron la diversidad y presencia de *Enterovirus* en Uruguay en el 2011-2012 y 2017-2018, a partir de concentrados de aguas residuales. 50/84 muestras de aguas residuales fueron positivas para *Enterovirus* (59.52%). Las especies encontradas corresponden a *Enterovirus* A (CVA2-A6, A10, A16, EV-A71, A90), *Enterovirus* B (CVA9, B1-B5, E1, E6, E11, E14, E21, E30) y *Enterovirus* C (CVA1, A13, A19, A22, A24, EV-C99). Faleye y colaboradores (2021) en Maricopa, Arizona, E.E.U.U., analizaron 48 muestras de aguas residuales mediante RT-PCR anidada, dando como resultado un total de 20 muestras positivas, que equivale alrededor del 52%, los resultados sugerían la presencia de *Enterovirus*, por lo que posteriormente realizaron el estudio de secuenciación en donde detectaron posteriormente nueve genotipos de *Enterovirus* de tres especies (enterovirus A (CVA4, EV-A76, EV-A90)), enterovirus B (E14) y enterovirus C (CVA1, CVA11, CVA13, CVA19 y CVA24)). Por último, Hoque y colaboradores (2023) en Japón, realizaron análisis de RT-PCR a un total de 39 muestras de aguas residuales recolectadas mensualmente de agosto 2018 a marzo del 2022, con el fin de detectar la presencia de *Rotavirus* (RV), *Norovirus* (NoV), *Adenovirus* (AdV), *Astrovirus* (AstV), *Sapovirus* (SV), *Enterovirus* (EV) y el SARS-CoV-2. Como resultado, 58.97% de las muestras fueron positivas para *Norovirus*, genogrupo GI, mientras que el 56.41% fueron positivas para *Norovirus* GII; mientras que *Enterovirus* tuvo una positividad del 49%. En resumen, los diversos estudios realizados, independientemente del tipo de virus a analizar, las diferentes muestras de agua residual en cada área de estudio presentaron alrededor del 50-60% de positividad.

Debido a que se desconoce la incidencia de virus entéricos en viajeros que arriban a la ciudad de Culiacán, Sinaloa, esta investigación tuvo como objetivo abordar la primera fase de la Epidemiología Basada en Aguas Residuales, que es identificar la presencia de *Norovirus* humanos y *Enterovirus* como patógenos entéricos de dispersión global.

### 3. HIPÓTESIS

1. En el 15-50% de las muestras existe incidencia de Norovirus de los genogrupos I y II, mientras que en al menos el 50% se encontrará *Enterovirus*.
2. El genogrupo GII de *Norovirus* será el que predomine en los viajeros que arriben a la Central de autobuses de Culiacán, Sinaloa, México, durante el periodo de febrero-abril del 2022.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Determinar la incidencia de *Enterovirus* y genogrupos de *Norovirus* humanos en aguas residuales de autobuses que arriban a Culiacán, Sinaloa.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de *Enterovirus* en aguas residuales de autobuses foráneos e internacionales que arriban a Culiacán, Sinaloa.
2. Determinar la presencia de *Norovirus* en aguas residuales de autobuses foráneos e internacionales que arriban a Culiacán, Sinaloa.
3. Identificar el genogrupo de *Norovirus* (GI-GII) más predominante en aguas residuales.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Etapa 1. Toma, Manejo y Transporte de la Muestra

Se recolectaron muestras de aguas residuales tomadas de depósitos de autobuses que arribaron a la central internacional de autobuses de la ciudad de Culiacán Sinaloa, provenientes de distintos estados de la República Mexicana y de los Estados Unidos de América, con base en los criterios de selección de las muestras (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Criterios de selección de las muestras.

<b>NÚMERO</b>	<b>CRITERIO DE SELECCIÓN</b>
<b>1</b>	Sólidos orgánicos presentes en la muestra (presencia abundante de heces)
<b>2</b>	Ausencia de neutralizantes, desinfectantes o aromatizantes
<b>3</b>	Sin descarga de depósito previa

El agua residual se recolectó en un frasco de polipropileno con capacidad de 500 mL. Posteriormente se etiquetó con la fecha, lugar de procedencia y la línea de autobús, se colocó en refrigeración a 4 °C y se trasladó a las instalaciones del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), coordinación regional Culiacán, para ser procesada dentro de las primeras 24 horas. La frecuencia de los muestreos fue semanal durante los meses de febrero, marzo y abril del año 2022.

### 5.2. Etapa 2. Concentración de Partículas Virales

La concentración de partículas virales se llevó a cabo mediante el método de precipitación con polietilenglicol 6000. Se depositaron 500 mL de muestra distribuidos en dos frascos de centrífuga

de 250 mL (Nalgene®, EE. UU.) y se centrifugaron a 10 000 ×g durante 10 minutos a 4 °C (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 40, EE. UU.), se recuperó el sobrenadante en un recipiente limpio y estéril. Se filtró el sobrenadante mediante un sistema de filtración al vacío por etapas (filtración secuencial) utilizando membranas de 0.80, 0.65, 0.45 y 0.22 µm (Millipore™, Alemania). A 200 mL de la muestra filtrada, se le agregaron 50 mL de una solución de polietilenglicol (PEG) 6000 adicionada con 20% de NaCl 2.5 M en un frasco de centrífuga de 250 mL (Nalgene®, EE. UU.), se mezcló por inversión manual suave durante un min. y se dejó en refrigeración a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 11 000 ×g durante 20 min a 4 °C (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 40, EE. UU.) y se decantó el sobrenadante para volver a centrifugar a 11 000 ×g durante 3 min. a 4 °C y decantar nuevamente el resto del líquido. Se resuspendió el pellet con 1 mL de buffer de elución TACO™ DNA/RNA Extraction Kit (GENEReach) y se transfirió el líquido a un microtubo de 1.5 mL (Eppendorf™, Alemania). Se centrifugó a 14 000 ×g durante 10 min a 4 °C (Thermo Scientific™ Sorvall™ Leyend Micro 21, EE. UU.). Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL y posteriormente se almacenó a -20 °C para su posterior extracción de ARN y amplificación mediante RT-PCR (Barril *et al.*, 2021; Sapula *et al.*, 2021).

### 5.3. Etapa 3. Detección Molecular

#### 5.3.1. Extracción de ARN Viral

Se llevó a cabo la extracción del material genético con el sistema de extracción TACO™ DNA/RNA Extraction Kit (GENEReach), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cargó la placa de extracción de 48 pocillos, a la cual se le añadió 200 µL de muestra la columna #1; 50 µL de Magnetic Bead a la columna #2; 200 µL de la muestra previamente de etanol 95% y 500 µL de Buffer de lisis a la columna #1; 750 µL de Washing Buffer A, a la columna #2 y #3; 750 µL de Washing Buffer B, a la columna #4 y #5; 60 µL de Eluting Buffer a concentrada con PEG 20% NaCl 2.5 M en la columna #1 y 10 µL de Internal Control-FL (IC) a cada una de las muestras (Amplisens®, República Checa). Se colocó la placa de extracción de 48 pocillos en el instrumento

TACO™, seguido de la colocación del peine de mezclado. Después de finalizado el proceso de extracción (46 minutos aproximadamente), se sacó la placa de extracción y se recuperó un volumen de 60 µL de muestra contenida en la columna #6 en un microtubo de 1.5 mL (Eppendorf™, Alemania) nuevo y previamente rotulado. Se almacenó el material extraído a -80 °C hasta el momento de su amplificación mediante RT-PCR.

### 5.3.2. Detección de Norovirus GI/GII y Enterovirus Humanos Mediante RT-PCR en Tiempo Real

La detección de los virus del género *Enterovirus* se realizó mediante el uso del kit Amplisens® *Human enterovirus*-FRT PCR kit; para el caso de los virus del género *Norovirus* GI/GII se utilizó el kit Amplisens® *Norovirus* GI / GII-FRT PCR kit. Cabe señalar que no fue necesario algún procesamiento adicional de la muestra de ARN extraída previamente por taco™.

5.3.2.1 Enterovirus. Para cada una de las reacciones de RT-PCR tiempo real se utilizaron los siguientes volúmenes: 10 µL de PCR-mix-FL Enterovirus; 5 µL de PCR-buffer-C; 0.5 µL de Polymerase (TaqF); 0.25 µL TM-Revertase (MMIv); 0.25 µL de RT-G-mix-2 y 10 µL de muestra de ARN extraída. El volumen total fue de aproximadamente 25 µL. Los controles de reacción que se utilizaron se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Controles de reacción del lote para la amplificación de *Enterovirus* mediante RT-PCR tiempo real.

C+	10 µL	C+ <i>Enterovirus</i> (Control positivo de amplificación)
NCA	10 µL	TE-Buffer (Control negativo de amplificación)
C-	10 µL	Muestra extraída con el Control Negativo (C-)

Se utilizó el equipo CFX96® de BioRad® con las condiciones de termociclado que se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Condiciones del instrumento para la amplificación de *Enterovirus* por Amplisens®.

PASO	TEMP. °C	TIEMPO	SEÑAL DE DETECCIÓN FLUORESCENTE	CICLOS
1	50	15 min	-	1
2	95	15 min	-	1
3	95	10 s	-	45
	60	20 s	FAM, HEX	

5.3.2.2 Norovirus GI y GII. Para cada una de las reacciones de RT-PCR tiempo real se utilizaron los siguientes volúmenes: 10 µL de PCR-mix-FL Norovirus GI / GII; 5 µL de PCR-buffer-C; 0.5 µL de Polymerase (TaqF); 0.25 µL TM-Revertase (MMIv); 0.25 µL de RT-G-mix-2 y 10 µL de muestra de ARN extraída. El volumen total fue de aproximadamente 25 µL. Los controles de reacción, que se utilizaron se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Controles de reacción del lote para la amplificación de *Norovirus GI / GII* mediante RT-PCR tiempo real.

C+	10 µL	C+ <i>Norovirus GI / GII</i> (Control positivo de amplificación)
NCA	10 µL	TE-Buffer (Control negativo de amplificación)
C-	10 µL	Muestra extraída con el Control Negativo (C-)

Se utilizó el equipo CFX96® de BioRad® con las condiciones que se muestran en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Condiciones del instrumento para la amplificación de *Norovirus GI / GII* por Amplisens®.

PASO	TEMP. °C	TIEMPO	SEÑAL DE DETECCIÓN FLUORESCENTE	CICLOS
1	50	15 min	-	1
2	95	15 min	-	1
3	95	10 s	-	45
	60	20 s	FAM, HEX, ROX	

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención, Selección y Procesamiento de la Muestra

Se obtuvieron un total de 32 muestras de aguas residuales provenientes de depósitos de camiones nacionales e internacionales (Estados Unidos de América), de las cuales fueron seleccionadas 16 para su análisis con base en los criterios enlistados en el Cuadro 2.

Las 16 muestras fueron concentradas mediante Polietilenglicol 6000 adicionado con 20% de NaCl 2.5 M. Las muestras se tomaron con una frecuencia semanal durante los meses de febrero, marzo y abril del 2022. La información de las mismas se muestra en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Muestras de aguas residuales concentradas.

<b>CÓDIGO</b>	<b>FECHA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>LUGAR</b>
<b>PAR0083</b>	2022-02-10	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0105</b>	2022-02-18	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0106</b>	2022-02-18	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0120</b>	2022-02-25	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0124</b>	2022-03-04	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0125</b>	2022-03-04	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0126</b>	2022-03-04	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0139</b>	2022-03-18	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0146</b>	2022-03-25	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0147</b>	2022-03-25	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0148</b>	2022-03-25	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0153</b>	2022-04-01	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0156</b>	2022-04-08	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0158</b>	2022-04-08	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0159</b>	2022-04-08	Depósito camión	Central de autobuses
<b>PAR0164</b>	2022-04-22	Depósito camión	Central de autobuses

Todas las muestras seleccionadas fueron de la central de autobuses del municipio de Culiacán, Sinaloa, México, abarcando el periodo mencionado de febrero-abril del año 2022, además de todas proceder de depósitos de camiones, dejando fuera las muestras de drenaje de la propia central.

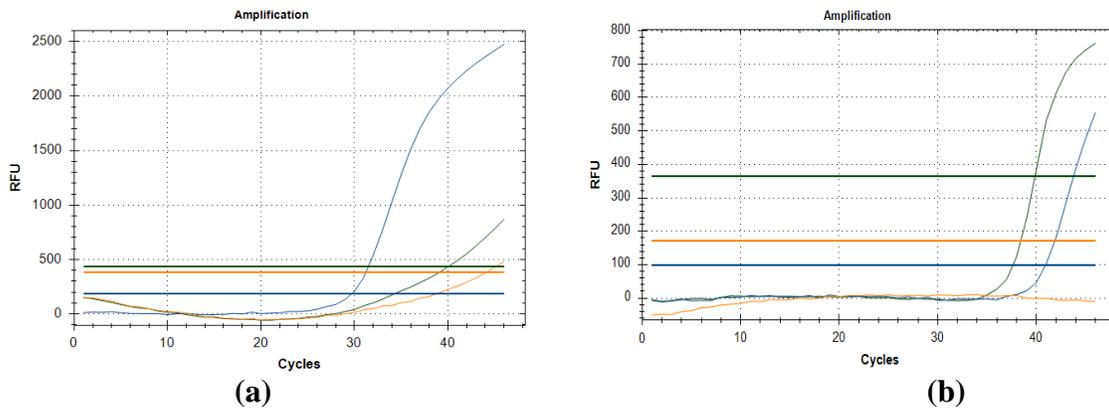
## 6.2 Detección Molecular por RT-PCR

Durante el periodo de febrero-abril del 2022, se detectó el genogrupo GII de *Norovirus* en dos de las 16 muestras analizadas (Cuadro 8; Figura 1), dando como resultado un 12.5% de muestras positivas.

**Cuadro 8.** Detección de *Enterovirus* y *Norovirus* en aguas residuales.

<b>CÓDIGO</b>	<b>FECHA DE MUESTREO</b>	<b>ENTEROVIRUS</b>	<b>NOROVIRUS</b>
<b>PAR0083</b>	2022-02-10	No detectado	Detectado
<b>PAR0105</b>	2022-02-18	No detectado	No detectado
<b>PAR0106</b>	2022-02-18	No detectado	No detectado
<b>PAR0120</b>	2022-02-25	No detectado	No detectado
<b>PAR0124</b>	2022-03-04	No detectado	No detectado
<b>PAR0125</b>	2022-03-04	No detectado	No detectado
<b>PAR0126</b>	2022-03-04	No detectado	No detectado
<b>PAR0139</b>	2022-03-18	No detectado	No detectado
<b>PAR0146</b>	2022-03-25	No detectado	No detectado
<b>PAR0147</b>	2022-03-25	No detectado	Detectado
<b>PAR0148</b>	2022-03-25	No detectado	No detectado
<b>PAR0153</b>	2022-04-01	No detectado	No detectado
<b>PAR0156</b>	2022-04-08	No detectado	No detectado
<b>PAR0158</b>	2022-04-08	No detectado	No detectado
<b>PAR0159</b>	2022-04-08	No detectado	No detectado
<b>PAR0164</b>	2022-04-22	No detectado	No detectado

Resultados expresados en Detectado/No detectado.



**Figura 1. Muestras positivas de *Norovirus*.** (a) Muestra PAR0083 positiva para el genogrupo II de *Norovirus*. (b) Muestra PAR0147 positiva para el genogrupo II de *Norovirus*.

Diversos investigadores argumentan que la ruta de transmisión fecal-oral de *Enterovirus* y *Norovirus* ha sido un tema estudiado ampliamente a lo largo de los años debido a que la materia fecal humana de personas infectadas es la principal fuente de propagación de estos virus, los cuales pueden encontrarse en concentraciones de hasta  $10^{12}$  CG/L, seguido de los aerosoles derivados del vómito y estornudos y superficies contaminadas (da Silva *et al.*, 2016; Lindsay *et al.*, 2018). Estas deposiciones se dan principalmente en los baños, lugares en donde hay más contacto con estas excretas corporales y menos higiene, exponiendo así a la persona que se encuentre en estos ambientes (Begier *et al.*, 2008). Se atribuye a que los viajeros nacionales e internacionales son una fuente importante de propagación global de virus (Apelt *et al.*, 2010; Lindsay *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, se decidió estudiar las aguas residuales de transportes nacionales e internacionales para la detección de *Enterovirus* y genogrupos de *Norovirus*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto al porcentaje de detección son comparables a los de Apelt y colaboradores (2010), ellos realizaron un estudio en 104 pacientes que recientemente habían viajado en el año 2006-2008. Un total de 104 muestras fueron procesadas mediante centrifugación y analizadas mediante RT-qPCR; 10 muestras resultaron positivas (9.6%), de las cuales nueve correspondían a muestras de pacientes con diarrea (15.7%). El genogrupo de *Norovirus* más predominante en las muestras positivas resultó GII (9/10). Otro estudio similar fue el de Zhang y colaboradores (2021), quienes detectaron *Norovirus* en 83 de 533 muestras analizadas (15.6%) que correspondían a exudados faríngeos de personas sintomáticas, donde el genogrupo GII fue de nuevo el más predominante. Por último, Ko y colaboradores (2005), determinaron la frecuencia con la que *Norovirus* causan diarrea del viajero en 124 estudiantes

estadounidenses que tuvieron una estadía en México. En dicho estudio, 21 muestras de pacientes (17%) dieron positivo para NoV según el análisis de RT-PCR realizado, a diferencia de nuestros resultados y a los de Apelt y colaboradores (2010) y Zhang y colaboradores (2021), el genogrupo GI fue más predominante que GII. Como se mencionó al principio, los resultados de los estudios anteriores son similares al presente estudio, a pesar de provenir de una muestra directa de heces de pacientes. Sin embargo, estudios como el de Ham y colaboradores (2021), que analizaron el agua residual proveniente de tanques sépticos de 7 diferentes villas costeras de la Bahía de Jaran, Corea del Sur en el 2017, en busca de Norovirus GI y GII; de 100 muestras de aguas residuales que fueron concentradas previamente por centrifugación y analizadas mediante RT-PCR, 22 fueron positivas para el genogrupo GI, mientras 24 para el genogrupo GII (incidencia del 24%). Esta ligera diferencia puede deberse a la gran cantidad de muestras analizadas (100 muestras) a diferencia de nosotros que fueron 16. Otro estudio interesante que puede explicar la incidencia tan baja es el de Ahmed y colaboradores en el (2020), quienes evaluaron la presencia del virus SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales de depósitos de aviones y cruceros como potencial uso en materia de salud pública durante la pandemia COVID-19. Ellos analizaron 21 muestras a través de dos diferentes métodos de concentración y analizadas mediante RT-qPCR y RT-ddPCR. 14/21 muestras resultaron positivas (67%). A pesar de tener una incidencia alta, los autores destacan que las amplificaciones no fueron consistentes para todas las réplicas de RT-qPCR, pues los valores de Cq de las muestras positivas se encontraron en un rango de 37.0 a 40.0 ciclos, al igual que los resultados de nosotros. Los autores mencionan que esto podría solucionarse al mejorar el método de concentración que garantice porcentajes de recuperación altos (>50%), o bien, utilizando PCR digital que, según se ha informado, es de uno a dos log más sensible que las plataformas qPCR convencionales.

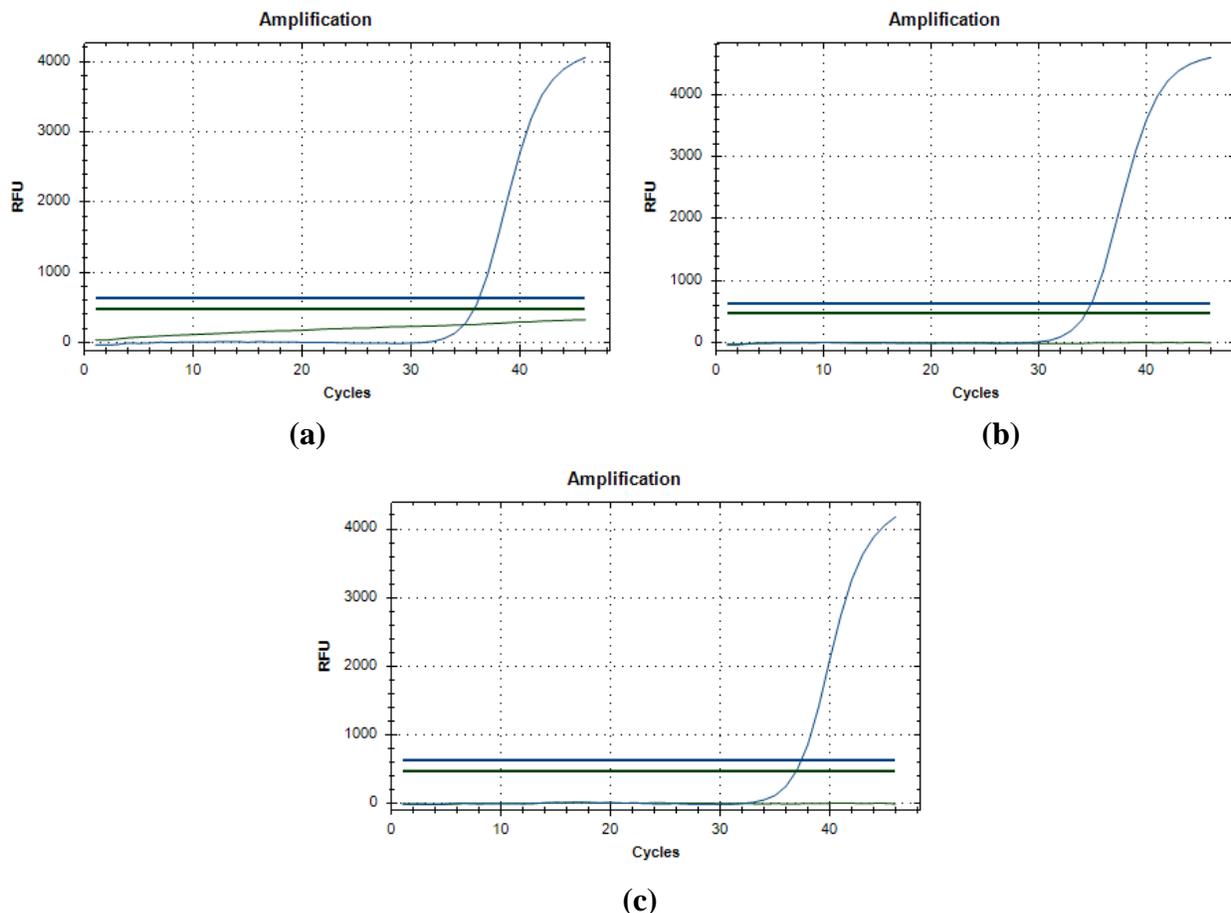
Existen otros estudios con resultados distintos a los encontrados en este trabajo. Tal es caso de Chacón y colaboradores (2021), donde analizaron 60 muestras del influente de cinco plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) para detectar la presencia de virus entéricos por medio de filtración y precipitación con PEG 8000 y RT-PCR. De un total de 60 muestras, 38 muestras se analizaron para norovirus GI y GII (NV GI; NV GII) obteniendo un 34% de positividad. Adicionalmente, Chapin y colaboradores (2005), encontraron que en personas de Estados Unidos que pasaron una estadía en Guatemala y México y presentaron la conocida diarrea del viajero (DT

por sus siglas en inglés), con un total de muestras de heces positivas del 48% (26/54) para *Norovirus*, encontrando también que el genogrupo GI fue el único encontrado. Otro estudio es el de Santiso-Bellón y colaboradores (2020), quienes a través de un estudio que duró un año (de septiembre 2016 a septiembre 2017), recolectaron un total de 46 muestras de agua residual de la ciudad de Valencia, España. Se encontró al genogrupo GI de *Norovirus* en un 69.6% de las muestras y al genogrupo GII en un 76%. Por último, Hoque y colaboradores (2023), estudiaron las aguas residuales de una planta tratadora de aguas residuales de la ciudad de Kansai, Japón. 39 muestras del efluente fueron recolectadas desde agosto del 2018 a marzo del 2022. Al igual que nuestro estudio, las muestras fueron concentradas mediante precipitación por PEG 6000 + NaCl y detectadas mediante RT-PCR. 23/39 muestras resultaron positivas para *Norovirus* GI (58.97% de positividad), mientras que 22/39 muestras fueron positivas para *Norovirus* GII (56.41% de positividad) y siendo entonces, el *Norovirus* GI el que predominó en las muestras positivas.

Las discrepancias en los resultados de algunos de los autores pueden deberse principalmente a que depende en gran medida que las muestras analizadas sean de pacientes que tengan una gastroenteritis activa que resulta de una posible infección vírica y que conlleva así, una mayor descarga de materia fecal con el virus de interés, también que no en todos los casos se realizó el mismo proceso de extracción, ya que en algunos casos fue por PEG, otros por simple dilución o bien, por medio de centrifugación.

Otro factor importante es el número de muestras analizadas, ya que, en los estudios mencionados, es mucho mayor el número de muestras que en el presente trabajo (al menos el doble) como es el caso de Chacón y colaboradores (2021) con 60 muestras estudiadas, Chapin y colaboradores (2005) con 50 y Hoque y colaboradores (2023) con 39. Además, los periodos de muestreo fueron más largos, pudieron ellos abarcar un posible brote que pudo reflejarse en más resultados positivos; a diferencia de nosotros, que solo muestreamos por 3 meses y con una menor posibilidad de abarcar un brote que pudiera estar ocurriendo en ese momento (Santiso-Bellón, *et al.*, 2020). También la naturaleza de la muestra, ya que en estudios donde se toma directamente la materia fecal de las personas infectadas sin pasar por ningún otro proceso, aumenta en gran medida las posibilidades de encontrarse con mayores concentraciones del virus, en comparación con lo encontrado en esta investigación, en donde la materia fecal era una muestra combinada de varias personas, creando así un efecto de dilución entre personas infectadas y no infectadas.

Para el caso de *Enterovirus*, este no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas en el presente trabajo (Cuadro 8; Figura 2).



**Figura 2. Muestras negativas de *Enterovirus*.** (a) Muestra PAR0105 negativa para *Enterovirus*. (b) Muestra PAR0106 negativa para *Enterovirus*. (c) Muestra PAR0147 negativa para *Enterovirus*.

Existen estudios donde fue posible detectar *Enterovirus* humanos en muestras de heces de pacientes. Begier y colaboradores (2008) a raíz de un brote de meningitis en Connecticut, Estados Unidos, estudiaron muestras de 28 personas que recientemente habían tenido un viaje escolar a México, en 20 de 28 personas (71.4%) fue posible detectar *Enterovirus* humanos, tales como *Echovirus 30*, *Coxsackievirus A1* y *Coxsackievirus A5*. Otro estudio de importancia fue el de Gobbi y colaboradores (2010), derivado de un brote de meningitis en Turin, Italia, después de un viaje en un pueblo cerca de Calcuta, India, en el año 2006, decidieron estudiar el fluido cerebroespinal,

exudado faríngeo y las heces de las personas involucradas para detectar el agente causante de dicha enfermedad; todas las muestras de fluido cerebroespinal fueron positivas para *Enterovirus*, mientras que 4/6 (66%) de las muestras de heces resultaron positivas para *Enterovirus*. Tan solo 1/6 muestras (16.7%) de exudado faríngeo fue positiva para *Enterovirus*. Las principales diferencias de los estudios de Gobbi y colaboradores (2010) y el de Begier y colaboradores (2008) con el presente trabajo es que ambos realizaron sus respectivos estudios derivados de casos ya existentes; es decir, derivados de un brote de meningitis y el estudio fue dirigido a esas personas que ya presentaban síntomas después del viaje. En cambio, nuestro estudio no fue dirigido a personas que específicamente presentaban síntomas ni tampoco derivado de algún brote existente, sino a personas que compartieron espacio al viajar en un autobús. Por otro lado, estudios como el de Faleye y colaboradores (2021) son un poco más acorde a las condiciones del presente estudio. Ellos realizaron un estudio en Maricopa County, Arizona, Estados Unidos, donde analizaron 48 muestras de aguas residuales durante un periodo de junio a octubre del año 2020 en búsqueda de *Enterovirus*. De las 48 muestras analizadas, 25 resultaron con amplicones que sugerían la presencia de *Enterovirus* (52.08%). Otro estudio similar fue el de Hoque y colaboradores (2023), quienes estudiaron 39 muestras de aguas residuales provenientes del efluente de una planta tratadora de aguas residuales de la ciudad de Kansai, Japón desde agosto del 2018 a marzo del 2022. Al igual que nuestro estudio, las muestras fueron concentradas mediante precipitación por PEG 6000 + NaCl y detectadas mediante RT-PCR. 19/39 de las muestras resultaron positivas para *Enterovirus*, dando una positividad del 48.72%. Los dos estudios anteriores mostraron resultados similares, las muestras positivas rondan alrededor del 50%. Caso contrario a los resultados de nuestro estudio, como se mencionó anteriormente, ninguna de las muestras analizadas resultó positiva para *Enterovirus* humanos.

Estudios como el de Tafuri y colaboradores (2012) son los que se acercan un poco a nuestros resultados. Ellos evaluaron la prevalencia y circulación del poliovirus entre los refugiados que residían en Italia en el periodo de 2008-2011 y que provenían de lugares donde el virus de la polio seguía activo. Por medio de PCR anidada fueron analizadas 152 muestras de heces y desechos líquidos extraídos de los sistemas de alcantarillado de las viviendas de migrantes. Ninguna de las muestras resultó positiva para poliovirus, sin embargo, una muestra resultó positiva para Coxsackievirus B5.

Por último, una posible causa para el alto número de muestras negativas, tanto para *Norovirus* como *Enterovirus* podría deberse a que éste estudio se realizó en tiempos de pandemia por COVID-19, pues se vio el uso indiscriminado de desinfectantes. Aunque la desinfección de las aguas residuales procedentes de los hogares, hospitales, oficinas, espacios públicos y otras instalaciones, como hoteles y unidades de procesamiento, era fundamental para minimizar la probabilidad de propagación del virus SARS-CoV-2, la aplicación de estos desinfectantes pudo haber causado un desequilibrio a los organismos presentes en el agua residual a donde iban a parar estos productos y por ende, haber tenido efecto en la degradación del virión y/o el genoma de *Norovirus* como *Enterovirus* (Dhama *et al.*, 2021).

## 7. CONCLUSIONES

La presencia de *Norovirus* en 2 de las 16 muestras analizadas (12.5%) provee de información útil de la incidencia de estos virus en la población que viaja a Culiacán Sinaloa, y que con base en ello se puede implementar la Epidemiología Basada en Aguas Residuales (EBAR) como un método de detección temprana de patógenos de interés. Además, el genogrupo GII de *Norovirus* fue el que predominó en las muestras analizadas, lo cual nos indica que dicho genogrupo es el que predomina en la población viajera que arriba a Culiacán, Sinaloa

No se detectó la presencia de *Enterovirus* en las muestras analizadas.

## **8. RECOMENDACIONES**

Este trabajo aportó la primera fase de la Epidemiología Basada en Aguas Residuales, demostrando la presencia de virus entéricos, por lo que se recomienda continuar con esta investigación para implementar un esquema más profundo de número de muestras y temporalidad. Se recomienda también realizar muestreos de las superficies de los baños de los autobuses, áreas de contacto común como pasamanos, reposabrazos, lavabos, agarraderas y pisos.

## 9. REFERENCIAS

- Ahmed, W., Bertsch, P. M., Angel, N., Bibby, K., Bivins, A., Dierens, L., Edson, J., Ehret, J., Gyawali, P., Hamilton, K. A., Hosegood, I., Hugenholtz, P., Jiang, G., Kitajima, M., Sichani, H. T., Shi, J., Shimko, K. M., Simpson, S. L., Smith, W. J. M., Symonds, E. M., ... Mueller, J. F. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers. *Journal of travel medicine*, 27(5), taaa116. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>
- Apelt, N., Hartberger, C., Campe, H., & Löscher, T. (2010). The Prevalence of Norovirus in returning international travelers with diarrhea. *BMC infectious diseases*, 10, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-131>
- Barril, P., Pianciola, L., Mazzeo, M., Ousset, M., Jaureguiberry, M., & Alessandrello, M. *et al.* (2021). Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Science Of The Total Environment*, 756, 144105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105>
- Begier, E. M., Oberste, M. S., Landry, M. L., Brennan, T., Mlynarski, D., Mshar, P. A., Frenette, K., Rabatsky-Ehr, T., Purviance, K., Nepaul, A., Nix, W. A., Pallansch, M. A., Ferguson, D., Cartter, M. L., & Hadler, J. L. (2008). An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(5), 616–623. <https://doi.org/10.1086/590562>
- Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M., & Buitrón, G. (2021). Surveillance of SARS-CoV-2 in sewage and wastewater treatment plants in Mexico. *Journal Of Water Process Engineering*, 40, 101815. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101815>
- Chacón, L., Morales, E., Valiente, C., Reyes, L., & Barrantes, K. (2021). Wastewater-Based Epidemiology of Enteric Viruses and Surveillance of Acute Gastrointestinal Illness Outbreaks in a Resource-Limited Region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 105(4), 1004–1012. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0050>
- Chapin, A. R., Carpenter, C. M., Dudley, W. C., Gibson, L. C., Pratdesaba, R., Torres, O., Sanchez, D., Belkind-Gerson, J., Nyquist, I., Kärnell, A., Gustafsson, B., Halpern, J. L., Bourgeois, A. L., & Schwab, K. J. (2005). Prevalence of norovirus among visitors from the United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1112–1117. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1112-1117.2005>
- Corpuz, M., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Jr, Campiglia, P., Belgiorno, V., Korshin, G., & Naddeo, V. (2020). Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *The Science of the total environment*, 745, 140910. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>
- da Silva Poló, T., Peiró, J. R., Mendes, L. C., Ludwig, L. F., de Oliveira-Filho, E. F., Bucardo, F., Huynen, P., Melin, P., Thiry, E., & Mauroy, A. (2016). Human norovirus infection in Latin America. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 78, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.016>

- Dhama, K., Patel, S. K., Kumar, R., Masand, R., Rana, J., Yattoo, M. I., Tiwari, R., Sharun, K., Mohapatra, R. K., Natesan, S., Dhawan, M., Ahmad, T., Emran, T. B., Malik, Y. S., & Harapan, H. (2021). The role of disinfectants and sanitizers during COVID-19 pandemic: advantages and deleterious effects on humans and the environment. *Environmental science and pollution research international*, 28(26), 34211–34228. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14429-w>
- Faleye, T. O. C., Bowes, D. A., Driver, E. M., Adhikari, S., Adams, D., Varsani, A., Halden, R. U., & Scotch, M. (2021). Wastewater-Based Epidemiology and Long-Read Sequencing to Identify Enterovirus Circulation in Three Municipalities in Maricopa County, Arizona, Southwest United States between June and October 2020. *Viruses*, 13(9), 1803. <https://doi.org/10.3390/v13091803>
- Félix-Valenzuela, L., Molina-Chavarria, A., Enríquez-Hernández, C. I., Bolado-Martínez, E., Durazo-Arvizu, M., Dórame-Castillo, R., Cano-Rangel, M. A., & Mata-Haro, V. (2020). Molecular Characterization of Norovirus Circulating in Northwest Mexico During 2013-2014. *Food and environmental virology*, 12(4), 355–360. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09446-w>
- Fretz, R., Schmid, H., Kayser, U., Svoboda, P., Tanner, M., & Baumgartner, A. (2003). Rapid propagation of norovirus gastrointestinal illness through multiple nursing homes following a pilgrimage. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 22(10), 625–627. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-1006-3>
- Gerba, C., Kitajima, M., & Iker, B. (2013). Viral presence in waste water and sewage and control methods. *Viruses In Food And Water*, 293-315. <https://doi.org/10.1533/9780857098870.3.293>
- Gobbi, F., Calleri, G., Spezia, C., Lipani, F., Balbiano, R., De Agostini, M., Milia, M. G., & Caramello, P. (2010). Echovirus-4 meningitis outbreak imported from India. *Journal of travel medicine*, 17(1), 66–68. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2009.00375.x>
- Ham IT, Kim BR, Park YJ, Jung YJ, Park K, Kwon JY, Mok JS, Yu H. Detection and phylogenetic analysis of norovirus from individual septic tanks in the drainage basin of the coastal area located in the Jaran Bay of Korea. *Fish Aquat Sci* 2021, 24(1):10-18. <https://doi.org/10.47853/FAS.2021.e2>
- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnus, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T., & Norder, H. (2014). Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), 6771–6781. <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>
- Holmes, J. D., & Simmons, G. C. (2009). Gastrointestinal illness associated with a long-haul flight. *Epidemiology and infection*, 137(3), 441–447. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001027>
- Hoque, S. A., Kotaki, T., Pham, N. T. K., Onda, Y., Okitsu, S., Sato, S., Yuki, Y., Kobayashi, T., Maneekarn, N., Kiyono, H., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2023). Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. *Food and environmental virology*, 15(2), 176–191. <https://doi.org/10.1007/s12560-023-09553-4>

- Kendall, M. E., Crim, S., Fullerton, K., Han, P. V., Cronquist, A. B., Shiferaw, B., Ingram, L. A., Rounds, J., Mintz, E. D., & Mahon, B. E. (2012). Travel-associated enteric infections diagnosed after return to the United States, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54 Suppl 5, S480–S487. <https://doi.org/10.1093/cid/cis052>
- Kendra, J. A., Tohma, K., & Parra, G. I. (2022). Global and regional circulation trends of norovirus genotypes and recombinants, 1995-2019: A comprehensive review of sequences from public databases. *Reviews in medical virology*, 32(5), e2354. <https://doi.org/10.1002/rmv.2354>
- Kirking, H. L., Cortes, J., Burrer, S., Hall, A. J., Cohen, N. J., Lipman, H., Kim, C., Daly, E. R., & Fishbein, D. B. (2010). Likely transmission of norovirus on an airplane, October 2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(9), 1216–1221. <https://doi.org/10.1086/651597>
- Ko, G., Garcia, C., Jiang, Z. D., Okhuysen, P. C., Belkind-Gerson, J., Glass, R. I., & DuPont, H. L. (2005). Noroviruses as a cause of traveler's diarrhea among students from the United States visiting Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), 6126–6129. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6126-6129.2005>
- LaTurner, Z. W., Zong, D. M., Kalvapalle, P., Gamas, K. R., Terwilliger, A., Crosby, T., Ali, P., Avadhanula, V., Santos, H. H., Weesner, K., Hopkins, L., Piedra, P. A., Maresso, A. W., & Stadler, L. B. (2021). Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. *Water research*, 197, 117043. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117043>
- Leone, C. M., Tang, C., Sharp, J., Jiang, X., & Fraser, A. (2016). Presence of human noroviruses on bathroom surfaces: a review of the literature. *International journal of environmental health research*, 26(4), 420–432. <https://doi.org/10.1080/09603123.2015.1135312>
- Leshem, E., & Lopman, B. A. (2018). Viral Gastroenteritis. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 383–387.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00056-6>
- Li, X., Zhang, S., Shi, J., Luby, S. P., & Jiang, G. (2021). Uncertainties in estimating SARS-CoV-2 prevalence by wastewater-based epidemiology. *Chemical engineering journal (Lausanne, Switzerland : 1996)*, 415, 129039. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129039>
- Lindsay, L., DuPont, H. L., Moe, C. L., Alberer, M., Hatz, C., Kirby, A. E., Wu, H. M., Verstraeten, T., & Steffen, R. (2018). Estimating the incidence of norovirus acute gastroenteritis among US and European international travelers to areas of moderate to high risk of traveler's diarrhea: a prospective cohort study protocol. *BMC infectious diseases*, 18(1), 605. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3461-6>
- Lizasoain, A., Mir, D., Salvo, M., Bortagaray, V., Masachessi, G., Farías, A., Rodríguez-Osorio, N., Nates, S., Victoria, M., & Colina, R. (2021). First evidence of enterovirus A71 and echovirus 30 in Uruguay and genetic relationship with strains circulating in the South American region. *PloS one*, 16(8), e0255846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846>
- LoFranco, D. C. (2017). *Occurrence of Human Norovirus GII and Human Enterovirus in Ontario Source Waters* [Tesis de maestría, The University of Guelph] <http://hdl.handle.net/10214/11950>
- Lu, D., Huang, Z., Luo, J., Zhang, X., & Sha, S. (2020). Primary concentration - The critical step

in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *The Science of the total environment*, 747, 141245. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>

National Center for Immunization and Respiratory Diseases. (8 de mayo del 2023a). *Los norovirus en el mundo, Tendencias globales*. Centers for disease control and prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide-sp.html>

National Center for Immunization and Respiratory Diseases. *National Wastewater Surveillance System (NWSS)* (10 de marzo del 2023b). Centers for disease control and prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/nwss/wastewater-surveillance.html>

Nikonov, O. S., Chernykh, E. S., Garber, M. B., & Nikonova, E. Y. (2017). Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs. *Biochemistry. Biokhimiia*, 82(13), 1615–1631. <https://doi.org/10.1134/S0006297917130041>

O'Bannon, D. J. (Ed.). (2020). *Women in Water Quality. Women in Engineering and Science*. doi:10.1007/978-3-030-17819-2

Olaiz-Fernández, G. A., Gómez-Peña, E. G., Juárez-Flores, A., Vicuña-de Anda, F. J., Morales-Ríos, J. E., & Carrasco, O. F. (2019). Panorama histórico de la enfermedad diarreica aguda en México y el futuro de su prevención. *Salud Pública De México*, 62(1, ene-feb), 25-35. <https://doi.org/10.21149/10002>

Organización Mundial de la Salud. (21 de marzo del 2022). *Agua*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>.

Organización Mundial de la Salud (02 de mayo del 2017). *Enfermedades diarreicas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

Paredes-Salido, F., & Roca-Fernández, J. (2004). Infecciones gastrointestinales. *O F F A R M*, 23(5), 100-106. Retrieved 30 March 2022, from <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-infecciones-gastrointestinales-13061801>.

Paul, J. R., & Trask, J. D. (1942). Occurrence and Recovery of the Virus of Infantile Paralysis from Sewage. *American journal of public health and the nation's health*, 32(3), 235–239. <https://doi.org/10.2105/ajph.32.3.235>

Pulicharla, R., Kaur, G., & Brar, S. K. (2021). A year into the COVID-19 pandemic: Rethinking of wastewater monitoring as a preemptive approach. *Journal of environmental chemical engineering*, 9(5), 106063. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106063>

Santiso-Bellón, C., Randazzo, W., Pérez-Cataluña, A., Vila-Vicent, S., Gozalbo-Rovira, R., Muñoz, C., Buesa, J., Sanchez, G., & Rodríguez Díaz, J. (2020). Epidemiological Surveillance of Norovirus and Rotavirus in Sewage (2016-2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms*, 8(3), 458. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030458>

Sapula, S. A., Whittall, J. J., Pandopulos, A. J., Gerber, C., & Venter, H. (2021). An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in wastewater. *The Science of the total environment*, 785, 147270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147270>

Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment*

*international*, 139, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>

- Sotelo-Coronado, J. I., Flores-Aréchiga, A., Llaca-Díaz, J., Pérez-Chávez, F., Lozano-Quintanilla, S., & Casillas-Vega, N. (2017). Associated microorganisms to gastrointestinal infections. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(4), 206-210.
- Tafuri, S., Chironna, M., Martinelli, D., Sallustio, A., Prato, R., & Germinario, C. (2012). Surveillance of poliovirus circulation among refugees in Italy, 2008-2011. *Journal of travel medicine*, 19(1), 61–63. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2011.00571.x>
- Villicaña, C., Amarillas, L., Cota-Álvarez, A., León-Félix, J., & Gómez-Gil, B. (2019). Environmental surveillance of norovirus and hepatitis A virus in raw oysters at seafood retailers in Sinaloa, Mexico: detection of GII.P13 norovirus genotype. <https://doi.org/10.21203/rs.2.10614/v1>
- Wang, X., Li, J., Guo, T., Zhen, B., Kong, Q., & Yi, B. *et al.* (2005). Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital. *Journal Of Virological Methods*, 128(1-2), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.03.022>
- Xagorarakis, I. (2020). Can We Predict Viral Outbreaks Using Wastewater Surveillance? *Journal of Environmental Engineering*, 146(11), 01820003. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.000183](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.000183)
- Zell, R. (2020). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae*. [Talk.ictvonline.org](https://talk.ictvonline.org). Recuperado el 27 de marzo de 2022, de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus).
- Zhang, C. M., Xu, L. M., Xu, P. C., & Wang, X. C. (2016). Elimination of viruses from domestic wastewater: requirements and technologies. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(4), 69. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2018-3>
- Zhang, Z., Liu, D., Li, S., Zhang, Z., Hou, J., Wang, D., Wu, Q., Jiang, Y., & Tian, Z. (2021). Imported human norovirus in travelers, Shanghai port, China 2018: An epidemiological and whole genome sequencing study. *Travel medicine and infectious disease*, 43, 102140. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102140>