

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.

Concentración por Ultrafiltración de Virus Entéricos
en Agua del Complejo Lagunar Huizache
Caimanero, Sinaloa

Por:
Joane Hernández Morga

TESIS APROBADA POR LA

Unidad Culiacán del CIAD en Ciencia y Tecnología para productos
agrícolas de zonas tropicales y subtropicales

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Agosto de 2007

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

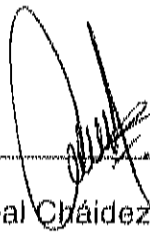
La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de tesis.

Dr. Alfonso Gardea Bejar

Director General

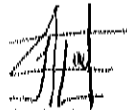
APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Joane Hernández Morga, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



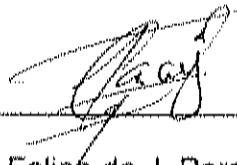
Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz

Director de tesis




Dra. Josefina León Félix

Asesor



Dr. Felipe de J. Peraza Garay

Asesor



Dr. Bruno Gómez Gil

Asesor

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Luis Hernández Rivera y Teresa Morga Gómez, por inculcarme el deseo de superación y ser un ejemplo claro de la fortaleza del ser humano, porque en las acciones están más que mil palabras, gracias.
- A mis hermanos, Luis, Carolina y Frida quienes complementan cada etapa de mi vida y me hacen ser más fuerte día con día, aprender de los errores y sacar el mejor provecho.
- Al Gobierno del Estado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber brindado el aporte económico para la realización del trabajo de mis estudios de posgrado.
- Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán, por haberme aceptado como miembro del programa de Maestría en Ciencias.
- A mi director de tesis el Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz, por haber aceptado mi participación como parte del equipo de trabajo del laboratorio de Microbiología y brindarme la oportunidad de obtener una de las satisfacciones y logros más importantes en mi vida profesional, el cual comparto con usted.

- A mi asesora la Dra. Josefina León Félix, por el soporte técnico y amistad brindada, representando la imagen de fortaleza de una mujer y que el camino que te lleva a lograr el éxito profesional y el familiar, no es opuesto.
- A mi asesor estadístico el Dr. Felipe Peraza Garay, por su tiempo, confianza, accesibilidad y las grandes palabras que llegaron en los momentos más oportunos contribuyendo a dar lo mejor de mí.
- A mi asesor el Dr. Bruno Gómez Gil por el soporte técnico brindado y la oportunidad de colaborar en el proyecto que hoy culmina con grandes satisfacciones.
- A los técnicos del laboratorio Célida Martínez, que con su experiencia transmite los conocimientos de una manera fácil y sencilla; Marcela Soto por el apoyo técnico, profesional e impulso a lo largo de mi estancia en CIAD, así como a Andrés Medrano por acompañarme en la ardua tarea los muestreos mes a mes, gracias porque juntos hacen del LMAA un área de trabajo exitosa.
- A mis maestros, Dr. Jorge Siller, Dr. Tomás Osuna, Dra. María D. Muy, Dr. Raymundo García, MC. Armando Carrillo, Dr. Miguel A. Angulo, Dr. Raúl Allende, Dr. José Basilio, Dr. José B. Valdez, Dra. Adriana Sañudo, por haber transmitido parte de sus conocimientos y por impulsarnos a dar lo mejor de nosotros mediante la reflexión y la duda.

- A los técnicos de laboratorio, MC. Verónica Pérez, MC. Rosabel Vélez, MC. Laura A. Contreras, Rosalva Contreras, MC. Eduardo Sánchez, IQ. Werner Rubio, IA. Isidro Márquez por la confianza para el uso de las instalaciones y material de los laboratorios, el soporte técnico brindado y los comentarios acertados.
- A LCPF. Mayra Ibarra, CP. Xiomara L. Urrea, IBQ. EVELIA Araiza, Víctor Arana y Leticia Santillán y por facilitar los trámites administrativos y hacer de CIAD una estancia agradable.
- A mis compañeros de maestría Generación 2005-2007, Aída Martínez, Ana C. Lerma, Jesús E. Paredes, Saúl Canizales, Domingo Félix y Ariel Ramírez, por su amistad y comprensión.
- A mis compañeros, MC. Yadira López, MC. Osvaldo Cuevas y MC. Juan P. Campos por sus críticas constructivas y apoyo que me permitieron desempeñarme en mi estancia.
- A los estudiantes de licenciatura, Roberto Guzmán, Carmen Sánchez y Karla Guiñonez que con su ayuda, facilitaron el trabajo de laboratorio.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la persona con quien comparto mi vida, que creyó en mí no solo como pareja, sino como profesionalista, dándome día a día su apoyo y compartiendo los momentos buenos y a veces no tanto; a mi esposo Victor Gómez, gracias, sé que el camino apenas comienza y con el mi dedicación, porque el mayor impulso que pude tener para culminar mis estudios, hoy lo veo casi venidero, y pronto si Dios nos lo permite, lo abrazaremos.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivos Particulares.....	11
HIPÓTESIS.....	12
MARCO TEÓRICO.....	13
Zonas Costeras de México.....	13
Complejo Lagunar Huizache Caimanero.....	15
Monitoreo de la Calidad del Agua en Zonas Costeras.....	17
Indicadores de contaminación fecal en agua.....	20
Virus Entéricos.....	24
Virus de Hepatitis A (VHA).....	26
Morfología.....	27
Genoma.....	27
Patogénesis y respuesta inmune.....	29

Período de incubación e infección	30
Persistencia	31
Costos de la enfermedad	31
Incidencia, morbilidad y mortalidad	32
Norovirus (NV)	32
Morfología	33
Genoma	33
Patogénesis y respuesta inmune	35
Período de incubación e infección	36
Persistencia	36
Detección de Virus en Agua	37
Toma de la Muestra	38
Concentración Viral	38
Adsorción-elución	39
Ultrafiltración	40
Identificación Viral	44
PCR	45
RT-PCR	45
PCR anidada y PCR semianidada	47
Electroforesis en gel de agarosa	47
Genotipificación Viral	48
Secuenciación	49
Análisis Filogenético	50
Eficiencia de Recuperación Viral	51

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	53
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	53
JUSTIFICACIÓN.....	54
META.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
Detección de los Virus de Hepatitis A y Norovirus.....	55
Toma de muestra.....	55
Concentración viral por ultrafiltración.....	57
Identificación de los VHA y NV.....	62
Extracción de ARN viral.....	62
RT-PCR.....	63
PCR anidada y semianidada.....	66
Electroforesis en gel de agarosa.....	68
Genotipificación.....	69
Secuenciación.....	69
Aislamiento de los productos de PCR.....	69
Electroforesis capilar.....	70
Análisis de las secuencias.....	70
Análisis filogenético.....	70
Alineamiento múltiple.....	70
Árbol filogenético.....	71
Eficiencia de Recuperación del Sistema de Ultrafiltración.....	72
Parámetros Físicoquímicos.....	75
Indicadores de Contaminación Fecal.....	76

Análisis Estadístico	78
ARTÍCULO CIENTÍFICO	80
ANEXOS	118
LITERATURA CITADA.....	135

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
Cuadro 1	Contaminantes comunes e impactos asociados con el uso de áreas costeras	19
Cuadro 2	Clasificación microbiológica de agua para cría de productos de mar	23
Cuadro 3	Componentes para la reacción de RT-PCR	64
Cuadro 4	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y PCR anidada de los virus de hepatitis A (VHA)	65
Cuadro 5	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y PCR semianidada de norovirus (NV)	65
Cuadro 6	Condiciones de amplificación para la RT-PCR	66
Cuadro 7	Componentes para la reacción de PCR	67
Cuadro 8	Condiciones de amplificación para la PCR anidada y semianidada	67
Cuadro 9	Secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple de los VHA	71
Cuadro 10	Secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple de NV	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
Figura 1	Diagrama esquemático del genoma del virus de hepatitis A	28
Figura 2	Localización de los aminoácidos en la superficie de la cápside del VHA	29
Figura 3	Estructura tridimensional de norovirus	34
Figura 4	Representación esquemática del genoma de norovirus	35
Figura 5	Esquema representativo de la estrategia de trabajo general	55
Figura 6	Ubicación geográfica de los puntos de toma de muestra en el Complejo Lagunar Huizache Caimanero	56
Figura 7	Toma de muestra y prefiltrado por tamices de acero inoxidable	57
Figura 8	Representación esquemática del sistema de ultrafiltración (SUF) de fibra hueca	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Nombre	Página
Anexo 1	Preparación de soluciones	118
Anexo 2	Preparación de medios	120
Anexo 3	Contenido de los kits	122
Anexo 4	Abreviaturas	124
Anexo 5	Datos sin procesar	129
Anexo 6	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los virus detectados	133
Anexo 7	Alineamiento múltiple de los VHA y la cepa control HM17518f	134

RESUMEN

El Complejo Lagunar Huizache Caimanero (CLHC), Sinaloa, es uno de los sistemas costeros de mayor extensión y productividad en el Pacífico mexicano. El CLHC es utilizado para el cultivo y comercialización de camarón y otras especies marinas. El consumo de camarón crudo proveniente del CLHC se ha asociado a enfermedades diarreicas. Es bien documentado que los productos de mar, pueden actuar como vectores de transferencia de patógenos al encontrarse en aguas contaminadas. En México, no existen estándares de carácter legal para determinar la calidad microbiológica del agua en zonas costeras, sin embargo, se hace referencia a los Criterios Ecológicos establecidos por el Instituto Nacional de Ecología, que contemplan una concentración límite de 230 unidades formadoras de colonia de coliformes fecales por cada cien mililitros de agua (UFC/100 mL) de cría de productos de mar. La evaluación microbiológica del agua del CLHC, está dirigida a la cuantificación de indicadores de contaminación fecal, que no siempre reflejan la presencia de patógenos comúnmente asociados a enfermedades transmitidas por productos de mar, como los virus de hepatitis A y norovirus. Debido a que los virus se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente acuático es necesario concentrarlos, para identificarlos. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental, el método estándar de concentración viral es el de adsorción-elución, cuya eficiencia de recuperación depende de la calidad fisicoquímica del agua y el tipo de virus a concentrar. Una alternativa a éste método es la ultrafiltración, el cual concentra por exclusión de tamaño, donde un flujo presurizado se pasa a través de

una membrana semipermeable, dividiendo la muestra en dos fluidos, el permeado que contiene iones y agua, y el retenido que contiene a los microorganismos de interés.

El objetivo del presente trabajo, fue identificar y caracterizar molecularmente los VHA y NV presentes en agua estuarina del CLHC mediante el sistema de ultrafiltración (SUF), acoplado a métodos de RT-PCR y relacionar la presencia de los virus con los parámetros fisicoquímicos e indicadores de contaminación fecal.

De septiembre 2006 a abril 2007, se tomaron y procesaron 40 muestras de agua estuarina del CLHC. Para ello, 20 L de agua estuarina se concentraron a 320 mL mediante el SUF, y se precipitó con polietilenglicol (PEG) 8000 al 12% y NaCl 0.8. La muestra concentrada se trató con cloroformo butanol para eliminar inhibidores. La fase acuosa obtenida, se utilizó para la extracción de ARN viral, el cual se empleó en la identificación mediante RT-PCR, PCR anidada y semianidada de los VHA y NV. Los productos amplificados en 200 pb y 316 pb para los VHA y NV, respectivamente, se purificaron para su secuenciación. Para conocer la identidad de las secuencias, éstas se analizaron con secuencias ya reportadas en la base de datos y se alinearon usando el software BioEdit y se importaron al software Mega 3.1 para la construcción del árbol filogenético y deducción del genotipo y/o genotipo, usando el método Neighbor-Joining y el modelo de dos parámetros de Kimura. Para conocer la eficiencia de recuperación del sistema de ultrafiltración, se realizaron seis inoculaciones del fago MS2 a 20 L de agua proveniente del Complejo Lagunar. La cuantificación del fago se realizó mediante la técnica de doble agar. Se cuantificó la presencia de *E. coli* y coliformes fecales en cada una de las muestras

analizadas, mediante la técnica de filtración por membrana y agar cromogénico. Los parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, turbidez y salinidad se evaluaron en cada una de las muestras analizadas.

La media del porcentaje de recuperación viral fue de 95.8%. Los VHA y NV se detectaron en el 80 y 70% de las muestras analizadas, respectivamente. La detección de ambos virus se observó en el 57.5% de las muestras. Ambos virus, se aislaron con mayor frecuencia durante primavera ($P < 0.05$) que durante otros periodos de muestreo. El análisis filogenético mostró la presencia del sub genotipo IB para las cepas de los VHA y el GI1 (GI1.4 and probable a new genotype) para NV. Los coliformes fecales se aislaron en el 48.57% de las muestras, mientras que *E. coli* se encontró en el 34.28%. El análisis de regresión logística binaria mostró que el pH ($P = 0.03$) se asoció positivamente con la presencia de los VHA, con una Razón de Momios (RM) de 14.31. No se encontró relación ($P < 0.05$) entre la presencia de los virus respecto a los coliformes fecales y *E. coli* en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos, muestran que el agua del CLHC es impactada por desechos contaminados con heces humanas y representan una evidencia más de la insuficiente predictividad viral de los indicadores de contaminación fecal comúnmente utilizados para determinar la calidad microbiológica del agua de cría de productos de mar. Finalmente, los resultados sugieren la importancia del uso de métodos rápidos y eficientes para la concentración de microorganismo de ambientes acuáticos para minimizar el riesgo de infección viral por el consumo de productos de mar.

SUMMARY

The Huizache Caimanero Sinaloa Lagunary Complex (HCLC) is one of coastal systems which has the biggest extension and productivity in the Mexican Pacific. The HCLC is used for the farming and commercial use for shrimp and other species. The HCLC shrimp raw's consumption has been associated with diarrhea. It is well documented that sea products can act as transference vectors of pathogens being found in polluted water. In Mexico there aren't any legal standards to determine the water's microbiological quality in coastal zones. However some criteria "Criterios Ecológicos" by the Instituto Nacional de Ecología are referenced and used, which contemplate a limit concentration of 230 colony forming units of fecal coliforms per 100 mL of shellfish harvesting water (100 CFU/100 mL). The evaluation of water in the microbiological approach of the HCLC is aimed at the quantification of the fecal indicators that not always reflect pathogens presence commonly associated with disease transmitted by sea products like hepatitis A virus (HAV) and norovirus (NV). Because the viruses are found in low concentrations in the aquatic environment, it's necessary to concentrate them to identify them. According to the Environmental Protection Agency, the standard method for the viral concentration is the adsorption-elution which recovery efficiency is depending of the physicochemical quality of the water and the virus type. An alternative to this method is the ultrafiltration which concentrates by size exclusion, where a pressure fluid are passed through a semipermeable membrane, dividing the sample into two fluids, the

permeate which has water and ions, and the retentate which has the microorganisms of concern.

The aims of the study were to identify and molecular characterize HAV and NV present in estuarine water from the HCLC by the Ultrafiltration systems (UFS) – RT-PCR integrated methods; and to relate the presence of viral organisms with physicochemical and fecal.

Forty 20 – liter estuarine water samples were monthly collected from five fishing sites at the HCLC between September 2006 and April 2007. Twenty- liter water samples were concentrated, by UFS to approximately 320 mL and overnight (4°C) precipitated with polyethylene glycol (PEG) 8,000 (12%) and NaCl (0.8 M). The concentrated sample was treated with butanol-chloroform to eliminate inhibitors. The upper phase obtained was used for viral RNA extraction and used for RT-PCR identification, as a nested and seminested PCR for HAV and NV, respectively. The amplified fragments at 200 bp and 316 bp for HAV and NV, respectively were purified and used for sequence analysis. The nucleotide sequences for NV and HAV were BLAST analyzed to identify the virus genotype or genogroup. The sequences were aligned with the aid of BioEdit system and alignments were imported to Mega 3.1 for phylogenetic tree constructions by using the Neighbor-Joining method and Kimura's two parameters model. To know the recovery efficiency of UFS, six estuarine 20 L- water samples were spiked with known concentration of MS2 bacteriophage. The MS2 bacteriophage was measured by the double agar technique. Fecal coliforms and *E. coli* were identified and enumerated in each of the 20 L estuarine sample with

membrane filtration method using chromogenic agar. Physicochemical parameter, like pH, temperature, turbidity and salinity were measured in each water sample.

Recovery efficiency of virus spiked estuarine water was 95.8%. Overall, 57.5% of estuarine water samples were positive for both hepatitis A virus and Noroviruses; 80% were positive for HAV and 70% contained NV. Both viruses were more frequently isolated during spring ($P < 0.05$) than any other sampling periods. Phylogenetic analysis showed the presence of sub genotype IB for HAV and GI.4 for NV (GI.4 and probably a new genotype). Fecal coliforms were isolated in 48.57% of the samples, while *E. coli* were found in 34.28%. Binary logistic regression analysis showed that pH ($P = 0.03$) was positively associated with HAV presence with 14.31 odds ratio. There were no significant relationships between the concentration or presence of fecal coliforms and *E. coli* and the viruses in the analyzed samples. Results indicated that HCLC water is impacted by human and non-human fecal pollution. Also, the results showed that the actual microbial indicators prove not to be useful for predicting viral contamination. Finally, results suggest the importance of rapid methods for concentrating water with efficient viral recovery to minimize the risk of viral infection by shellfish consumption.

INTRODUCCIÓN

La pesca es una actividad importante que en México muestra múltiples efectos favorables a la economía regional y nacional, ya que genera una importante demanda de servicios e insumos, incluyendo sesenta mil empleos directos (SAGARPA, 2003). Actualmente, México ocupa el quinto lugar en la producción mundial de camarón, donde el 98% de ésta se exporta a Estados Unidos y en menor volumen a los mercados de China, Japón, España, Italia y Corea del sur (SEMARNAP, 2007). De acuerdo con el Anuario Estadístico de Pesca, para el año 2003, la captura nacional de camarón fue de 460 749 t, de las cuales 355 073 t se obtuvieron del litoral del Pacífico, ocupando el primer lugar en volumen y valor de las exportaciones (SAGARPA, 2003).

En el Pacífico mexicano, también se localiza un gran número de sistemas lagunares-estuarinos, donde la actividad pesquera es intensa y dirigida principalmente al camarón (*Penaeus spp*). En Mazatlán, Sinaloa, se localiza el Complejo Lagunar Huizache Caimanero; el cual presenta condiciones estuarinas que lo hacen uno de los sistemas costeros de mayor extensión y productividad en el Pacífico mexicano (Instituto Nacional de la Pesca, 1999).

En las cercanías del CLHC, se localizan una gran cantidad de granjas camaroneras que se abastecen de agua del CLHC y que sus descargas regresan al

mismo; lo cual lo sitúa como área prioritaria en cuanto a la necesidad de estudios de evaluación microbiológica.

Los estudios microbiológicos realizados en agua y sedimento del CLHC están dirigidos a la identificación y cuantificación de indicadores de contaminación fecal, pero no así de microorganismos patógenos (Galindo *et al.*, 1997). A finales del 2004, el consumo de camarón crudo contaminado con la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* provocó un brote epidemiológico de gastroenteritis que afectó a más de 1230 habitantes de las cercanías del Complejo Lagunar (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006); afectando socioeconómicamente a la población, ya que las autoridades de salud decomisaron más de 170 t de camarón, quedando sin empleo los pobladores dedicados a la comercialización del crustáceo.

Debido al impacto socioeconómico que la veda causó aunado al interés de las autoridades de sanidad, se decide implementar un estudio para el monitoreo de la calidad fisicoquímica y microbiológica del Complejo Lagunar Huizache Calmanero, con el financiamiento económico del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del estado de Sinaloa, Convocatoria 2005.

En México, no se cuenta con valores de referencia sobre la calidad del agua, que tenga un sustento legal y que aplique en zonas costeras, por lo que se utilizan los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua, según su uso (SAGARPA, 2006).

Estos Criterios Ecológicos, contemplan como límite permisible 230 UFC/100 mL de coliformes fecales para agua de cría de productos de mar (CE-CCA-001/89).

En la Unión Europea, la regulación de los aspectos microbiológicos para los productos de mar, está dirigida a la cuantificación de coliformes fecales y *Escherichia coli*, con límites permisibles de 300 y 230 UFC/100 mL, respectivamente (Anonymous, 1979). Los indicadores de contaminación fecal se utilizan para evaluar la calidad microbiológica del agua, sin embargo su indeficiente predictividad viral está ampliamente documentada (Guyader *et al.*, 1996; Griffin *et al.*, 1999; Romalde *et al.*, 2001).

Los virus de hepatitis A y norovirus, son los principales causantes de enfermedades diarreicas de etiología viral. Su relación con el consumo de productos de mar está bien documentada. Los virus ingresan al agua y se diluyen rápidamente, sin embargo, a pesar de que se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente acuático, la dosis infectiva es muy baja (<10 partículas virales) y los productos de mar pueden concentrar de 100 a 1000 veces más microorganismos que el agua en donde se encuentran (Pérez *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2002; Atmar *et al.*, 1995).

Es por ello que la identificación viral en ambientes acuáticos requiere de un proceso de concentración. El método estándar (adsorción-elución) para la concentración de virus en muestras de agua, se basa en manipular el pH de la

muestra y de la superficie viral, razón por la que el método presenta variabilidad en la recuperación según sea el tipo de virus y la calidad fisicoquímica del agua, dificultando su aplicación en aguas que se encuentran en continuo cambio, como las de carácter estuarino (APHA, 1998).

Una alternativa al método de adsorción-elución es la ultrafiltración, cuya eficiencia de recuperación se ha demostrado ampliamente *in vitro*, alcanzando porcentajes de recuperación mayores del 60% para bacterias, protozoarios y virus. El método concentra por exclusión de tamaño, utilizando filtros de poro de 0.02 a 0.1 μm , donde un flujo presurizado se pasa a través de una membrana semipermeable, dividiendo la muestra en filtrado (permeado) que contiene iones y agua; y concentrado (retenido) que contiene a los microorganismos de interés (Hill *et al.*, 2005; Olsewisky *et al.*, 2005; Morales-Morales *et al.*, 2003).

La estandarización interna de metodologías es importante y necesaria para establecer programas de monitoreo en ambientes acuáticos, por lo que, en el presente trabajo se determinó la eficiencia de recuperación viral del sistema de ultrafiltración a nivel laboratorio, y se acopló a RT-PCR para su aplicación en la concentración e identificación de los virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar Huizache Calmanero. Se estimó el riesgo de presencia de los patógenos en relación a la calidad fisicoquímica del agua e indicadores de contaminación fecal, mediante regresión logística binaria.

OBJETIVOS

11

Objetivo General

Evaluar la eficiencia de recuperación viral mediante el sistema de ultrafiltración para su aplicación y optimización acoplado con métodos moleculares para la identificación de los virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar Huizache Caimanero; así como estimar el riesgo de presencia de los patógenos en relación a la calidad físicoquímica del agua e indicadores de contaminación fecal.

Objetivos Particulares

1. Evaluar la eficiencia de recuperación de virus, utilizando el sistema de ultrafiltración, mediante la inoculación del bacteriófago MS2.
2. Concentrar los virus de hepatitis A y norovirus a partir de muestras de agua del Complejo Lagunar Huizache Caimanero, Sinaloa por ultrafiltración.
3. Identificar los virus de hepatitis A y norovirus mediante RT-PCR.
4. Genotipificar los virus detectados, mediante secuenciación y análisis filogenéticos.
5. Determinar la asociación de los patógenos en relación a los indicadores de contaminación fecal y los parámetros físicoquímicos: pH, temperatura, turbidez y salinidad, mediante regresión logística binaria.

HIPÓTESIS

1. El método de ultrafiltración es capaz de concentrar y recuperar >60% de los virus inoculados.
2. Existe la presencia de virus de hepatitis A y norovirus en agua estuarina del Complejo Lagunar Huizache Caímanero.
3. El análisis filogenético, muestra la presencia de los genotipos I, II, III y/o VII de los virus de hepatitis A y genogrupos I y/o II de norovirus, de origen humano.
4. La presencia de los virus de hepatitis A y norovirus, no está asociada a la presencia de los coliformes fecales y *E. coli*, pero se ve afectada por los parámetros fisicoquímicos.

MARCO TEÓRICO

Zonas Costeras de México

México está formado por 32 estados; 17 con límites costeros, 11 en el Océano Pacífico y Golfo de California (Baja California norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas); cinco en el Golfo de México (Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán) y uno en el mar Caribe (Quintana Roo) (SEMARNAP, 2007).

La costa mexicana se extiende por 11,122.5 km, 68% corresponden al Océano Pacífico incluyendo al Mar de Cortés, 32% al Golfo de México y Mar Caribe en el Océano Atlántico (INEGI, 1998). En el Golfo de México se ubican lagunas costeras de mayor actividad ostrícola, mientras que en el Pacífico el mayor recurso es el camarón con el 60.5% de la producción total nacional (FAO, 1993).

La zona marítima mexicana cuenta con 500,000 km² de plataforma continental, 16,000 km² de superficie estuarina y 12,000 km² de lagunas costeras (INEGI, 1998). La zona costera del país comprende numerosos ecosistemas entre los que destacan playas de arena, sistema de manglar, pantanos, marismas, humedales, bahías, estuarios, praderas de pastos marinos, arrecifes de coral y lagunas (SEMARNAP, 2007).

Las lagunas costeras son cuerpos acuáticos litorales que tienen comunicación permanente o intermitente con el mar, característica general de los estuarios, por lo que se reconoce que las lagunas costeras tienen características estuarinas (Romero, 2007). Las lagunas costeras o estuarios son zonas transicionales que comprenden una gran variedad de ambientes, se forman cuando las aguas dulces provenientes de ríos y arroyos fluyen hacia el océano y se mezclan con el agua salada de mar (EPAA, 1998), de ésta manera, son el resultado de tres características fundamentales: aporte de nutrientes de los ríos, penetración de organismos por el mar y el suministro de materia orgánica por los manglares (Contreras, 1996).

Aunque influenciados por las mareas, las lagunas costeras están protegidas de las olas, vientos y tormentas marítimas por manglares o arrecifes, islas que actúan como barreras o franjas de terreno, lodo o arena que definen la frontera de la laguna (EPAA, 1998), ofreciendo un excelente hábitat y crecimiento para un número significativo de especies (peces, crustáceos y moluscos) de importancia comercial, cuyo ciclo de vida comprende fases estuarinas y marinas (De la Lanza, 1991).

En México sobresalen por sus dimensiones y productividad las lagunas de Escuinapa y Yavaros en Sonora; Agua Brava-Teacapán en Nayarit; Superior e Inferior en Oaxaca; Mar Muerto en Oaxaca y Chiapas; Madre en Tamaulipas; Tamiahua, Mandigna, Alvarado y Sontecomapan en Veracruz; Carmen-Machona,

Mecoacán en Tabasco; Términos en Campeche; Celestún en Yucatán y Huizache-Caimanero en Sinaloa (SEMARNAP, 2007).

Complejo Lagunar Huizache Caimanero

El Complejo Lagunar Huizache Caimanero está ubicado al noroeste de México, al sur de la Ciudad de Mazatlán, Sinaloa, a los 22°52' y 123°06' latitud norte y 106° y 106°13' longitud oeste, entre los ríos Presidio al norte y Baluarte al sur. Corrientes pequeñas fluyen hacia la laguna y sólo se activan durante la época de lluvia. El sistema se comunica de manera indirecta e intermitente con el mar, a través del estero El Ostial al norte del complejo, dándole condiciones estuarinas que lo caracterizan como uno de los cuerpos lagunares más productivos del noroeste del país (DUMAC, 2005).

El Complejo Lagunar está formado por la marisma Huizache y la laguna Caimanero, ambas separadas por un estrecho angostamiento denominado Tapo Pozo de la Hacienda, que es dragado año con año. El complejo lagunar tiene un área superficial de 175 km², reducido a 65 km² en época de sequía y profundidad media de 0.85 m. El Huizache con una superficie de 72 km² y profundidad media de 0.70 m; El Caimanero con superficie de 134 km² y profundidad de 1.30 m (Macías-Regalado, 1981).

El Complejo Lagunar Huizache Caimanero es uno de los sistemas costeros más extensos y de importancia tanto biológica como comercial en el Pacífico mexicano. Está considerado sitio de importancia Internacional, de acuerdo a la clasificación de la Red Hemisférica de Reservas para Aves Playeras (WHSRN, por sus siglas en inglés). Es sitio de crianza de cuatro especies de camarón, *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*, *P. californiensis* y *P. brevirostris*, lo que hace al Complejo Lagunar un sitio de importancia para la producción acuícola para consumo nacional e internacional (DUMAC, 2005).

Diversos estudios de carácter biológico-pesquero; geológicos y microbiológicos se han realizado en el Complejo Lagunar, sin embargo no existe un programa de monitoreo permanente para evaluar la calidad microbiológica del agua y subsecuentemente la de los productos de mar que en ésta se encuentran, que permita asegurar la calidad del producto y el bienestar del consumidor. Como consecuencia, el consumo de camarón procedente del Complejo Lagunar se ha asociado a enfermedades diarreicas esporádicas por varios años en verano, incluso a la enfermedad le apodan "el gaste", debido al debilitamiento que le ocasiona al cuerpo (Boletín, CIAD 2005).

A finales de septiembre de 2004, el consumo de camarón crudo contaminado con la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, provocó un brote epidemiológico de gastroenteritis en la comunidad del Walamo, Sindicatura localizada en las proximidades del Complejo Lagunar. Dicho brote se extendió hasta finales del mes

de octubre afectando a más de 1,250 personas. La bacteria se aisló de heces de personas infectadas, camarón y agua proveniente del Complejo Lagunar (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006). A consecuencia de esto, en octubre del mismo año, la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), declaró una veda sanitaria en el Complejo Lagunar, decomisando 170 t de camarón, lo cual impactó la economía y estabilidad social de los habitantes de la región.

Lo anterior muestra que el agua puede actuar como vehículo de transmisión de patógenos, al contaminar a los productos de mar que en ésta se encuentran, y enfermar a quienes los consumen. Esto hace necesario el monitoreo de la calidad microbiológica del agua de zonas costeras, principalmente aquellas dedicadas al cultivo y comercialización de especies marinas.

Monitoreo de la Calidad del Agua en Zonas Costeras

Las lagunas costeras son receptores de diversas fuentes de contaminación, y el impacto de ello puede ser severo. Las actividades humanas promueven el riesgo de contaminación del agua, afectando la calidad física, química y microbiológica de ésta. En el Cuadro 1, se presentan la contaminación más común en los estuarios o lagunas costeras y su posible fuente de contaminación (EPA, 2006).

El evaluar la calidad del agua, incluye hacer uso de referencias de parámetros físicos, químicos y biológicos, con respecto a que se considera admisible y que está definido por ciertos estándares o criterios. Los parámetros físicos no son índices absolutos de contaminación, y un solo parámetro no da idea del grado de contaminación que prevalece o la extensión del área afectada (SEMARNAP, 2007).

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental, las variables de calidad que se monitorean en los estuarios o lagunas costeras son salinidad, que es la concentración de sales en el agua y varía con la profundidad y cantidad de agua dulce presente; el oxígeno disuelto, que es crítico para mantener la vida en los ecosistemas acuáticos y disminuye al incrementar la salinidad; la turbidez, impactada por la presencia de sólidos en el agua, como el fitoplancton, presencia de sedimentos resuspendidos del fondo, descargas de efluentes, entre otros; la temperatura, que es crítica para la sobrevivencia de las especies; el pH, que es el logaritmo negativo de los iones hidrógeno y puede ser un indicador de las descargas de aguas residuales o bien, de residuos químicos. En el aspecto microbiológico, El Programa Nacional sobre Sanitización de Mariscos (NSSP, por sus siglas en inglés) menciona a los coliformes fecales como indicadores (EPAb, 1998).

Cuadro 1. Contaminantes comunes e impactos asociados con el uso de áreas costeras

Fuente	Contaminación	Posible Impacto
Tierras para cultivos y pastoreo	Sedimentos, nutrientes, pesticidas	Reducen la claridad del agua, toxicidad en los organismos, excesivo crecimiento de algas, reduce el oxígeno disuelto, cambios en la temperatura del agua, introducción de patógenos
Descargas comerciales e industriales	Sedimentos, toxinas	Reduce la claridad del agua, impacta el pH y alcalinidad, toxicidad a los organismos
Plantas tratadoras de agua	Nutrientes, sólidos suspendidos, bacterias fecales	Reduce la claridad del agua, excesivo crecimiento de algas, reduce el oxígeno disuelto, cambios en pH y temperatura, posible introducción de patógenos
Descargas urbanas	Sedimentos, metales, nutrientes, petróleo, bacterias	Reduce la claridad del agua, excesivo crecimiento de algas, reduce el oxígeno disuelto, cambios en la temperatura, toxicidad a los organismos, posible introducción de patógenos
Sistemas sépticos	Bacterias fecales, nutrientes	Excesivo crecimiento de algas, reduce oxígeno disuelto, cambios en la temperatura, posible introducción de patógenos

EPA, 2006

México no cuenta con valores de referencia de calidad del agua con carácter legal, para evaluar el estado del ambiente en zonas costeras, sin embargo existen antecedentes del empleo de Los criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89 (D.O.F. 13 de diciembre 1989), para precisar los niveles permisibles de los parámetros y de las sustancias que se encuentran en el agua o sus efectos como son color, olor, sabor y pH. Los límites permisibles dependen del uso del agua, ya

sea como fuente de abastecimiento de agua potable, actividades recreativas con contacto primario, riego agrícola, uso pecuario, uso en la acuicultura o bien para el desarrollo y conservación de la vida acuática (SEMARNAP, 2007).

Indicadores de contaminación fecal en agua

La contaminación del agua con residuos fecales humanos es fuente de una amplia variedad de enfermedades víricas, bacterianas y protozoarias. Actualmente, se prefiere el uso de los organismos indicadores como un marcador de contaminación posible del agua por agentes patógenos humanos (Prescott *et al.*, 2002).

Los coliformes, incluyendo *E. coli*, son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias constituyen el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales, y se utilizan ampliamente como organismos indicadores. El grupo de coliformes incluye *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Los coliformes se definen como bacterias anaeróbicas facultativas, Gram negativas, no esporulantes, con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 h a 35°C. Debido a que los coliformes comprenden una amplia variedad de bacterias cuyo origen natural puede no ser el tracto intestinal, se han desarrollado pruebas para detectar la presencia de coliformes fecales. Estos coliformes proceden del intestino de los

animales de sangre caliente, y parte de su detección diferencial se basa en que pueden crecer a una temperatura más restrictiva de 44.5°C (Prescott *et al.*, 2002).

Algunas de las características que debe reunir un indicador de contaminación fecal son ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos; presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación; fácil de aislar e identificar; no debe ser patógeno; ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales y estar presente cuando los microorganismos patógenos lo están (Maier *et al.*, 2002).

Las desventajas de usar a los coliformes fecales y otros indicadores tradicionales, es que pueden estar presentes tanto en heces de humanos como de animales; pueden multiplicarse en el ambiente después de ser excretados por los hospederos y son menos resistentes a los procesos normales de desinfección (Springthorpe *et al.*, 1993).

En México, los Criterios Ecológicos establecen como límite permisible 230 UFC/100 mL de coliformes fecales para el agua dedicada al cultivo de especies marinas (CE-CCA-001/89). En Estados Unidos de América, la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) ha sugerido utilizar 126 UFC/100 mL de *E. coli* para agua dulce y 35 UFC/100 mL de *enterococos* para agua marina por 5 muestras tomadas en 30 días (Dufour *et al.*, 1986).

Por otra parte, los estándares de la Unión Europea (UE), también emplean indicadores bacterianos para evaluar la calidad microbiológica del agua de almacenamiento de productos de mar. Existen diferentes categorías dependiendo de los niveles de contaminación fecal (Cuadro 2). Cuando el agua donde se encuentran almacenados los productos de mar, está altamente contaminada (clase D), éstos no deben ser usados para el consumo humano, mientras que en los niveles intermedios, los productos de mar pueden ser regresados a aguas limpias, aplicar tratamiento térmico o bien, una depuración antes de ser consumidos (clase B y C). La depuración es un proceso en el que, los productos de mar son colocados en un tanque de recirculación, donde el agua es pasada a través de los productos y éstos son desinfectados por tratamientos UV y reciclados (EC directive 91/492).

Los estudios microbiológicos realizados en el agua y sedimento del Complejo Lagunar, se mantienen en un programa de vigilancia microbiológica basado en la cuantificación de coliformes fecales y *E. coli*, el problema con ello, es que diversos estudios, muestran inconsistencia sobre la eficacia de los microorganismos indicadores respecto a la presencia de virus entéricos en agua y productos de mar. Maunula *et al.* (2005), rastrearon la fuente de contaminación de brotes gastrointestinales provocados por el agua de consumo en Finlandia, encontrando la presencia de norovirus en el 75% de los brotes analizados, donde sólo en el 56% de éstas fueron muestras positivas para coliformes.

Borchardt *et al.* (2004), encontraron la presencia de virus entéricos (enterovirus, rotavirus, virus de hepatitis A y norovirus) en el 50% de las muestras de agua analizadas, mientras que los indicadores de contaminación fecal (colifagos somáticos, coliformes totales, *E. coli* y *enterococos*) estuvieron ausentes en todas las muestras.

Cuadro 2. Clasificación microbiológica de agua para cría de productos de mar.

Clase	Estándar (UFC/100 mL agua)	Requerimientos para el comercio y consumo humano
Clase A	<230 <i>E. coli</i> ó 300 coliformes fecales	Probablemente pueden ser consumidos directamente
Clase B	<4600 <i>E. coli</i> y 600 coliformes fecales	Depuración o llevar hasta los niveles de clase A, o bien, aplicar tratamiento térmico
Clase C	<60,000 coliformes fecales	Regresar por 2 meses para alcanzar la clase A o aplicar tratamiento térmico si se alcanza la clase B
Prohibido	>60,000 coliformes fecales	Prohibido

EC directive 91/492

Horman *et al.* (2003), utilizaron un modelo de regresión logística binaria para relacionar la presencia de los indicadores de contaminación fecal y virus entéricos. La relación entre los patógenos analizados (*Campylobacter spp.*, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.* y norovirus) y los indicadores fecales tradicionales (coliformes termotolerantes y *E. coli*) fue nula.

Romalde *et al.* (2001), no encontraron relación estadística (χ^2 -cuadrada) entre la contaminación viral y bacteriana presente en moluscos bivalvos tomados en la costa de Galicia; reforzando el fundamento de que los estándares bacteriológicos son ineficientes para predecir la contaminación viral.

Virus Entéricos

Los virus entéricos representan una amenaza a la salud pública en ambientes acuáticos y se transmiten por la ruta fecal-oral. Dentro de los principales virus entéricos que se asocian a enfermedades transmitidas por alimentos y agua, se encuentran adenovirus, astrovirus, hepatitis E, rotavirus, picornavirus, virus de hepatitis A y norovirus (Carter, 2005). Estos dos últimos, son los más asociados a brotes de enfermedades causados por el consumo de productos de mar.

Los productos de mar como moluscos, particularmente bivalvos como ostiones, ostras y almejas; se alimentan a través de la continua filtración del agua donde se encuentran, concentrando y almacenando 100 ó 1000 veces más cantidades de virus que las encontradas en los ambientes acuáticos (Carter, 2005). Éste almacenamiento de los virus en los productos de mar, se da principalmente en periodos de bajas temperaturas (11.5 y 21.5°C), ocasionando una alta incidencia de gastroenteritis viral en humanos en épocas de invierno (Burkhardt *et al.*, 1992).

Las infecciones causadas por los virus entéricos, pueden ser más severas en las personas inmunocomprometidas; infantes y adultos mayores, embarazadas, en terapias contra el cáncer, consumidores de drogas, enfermas con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con diabetes, entre otros (Gerba *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 2000).

El principal sitio para la infección y replicación de los virus entéricos es el tracto intestinal. Se estima que la dosis de infección de virus entéricos está en el rango de 10 a 100 partículas y para norovirus, posiblemente sea menor la cantidad. Una vez que los virus entran al organismo, se replican y destruyen la cubierta del enterocito maduro del tercio superior del vello intestinal (protección en forma de dedos de la mucosa intestinal), el cual se encuentra en las células epiteliales del intestino. Las células inmaduras no resisten la replicación del virus, por lo que se entorpece la reabsorción del agua en el intestino y la diarrea continua (Carter, 2005). Las partículas virales son excretadas en las heces a concentraciones mayores que 10^{10} partículas virales por gramo de heces para rotavirus, 10^6 para enterovirus y 10^8 para el virus de hepatitis A (Feachem *et al.*, 1993; Gerba, 2000; Yates and Yates, 1988).

Una vez que los virus son excretados por las heces, llegan a las descargas de aguas residuales, cuyo rango es de 1.82×10^2 a 9.2×10^4 partículas virales por litro en desechos no tratados y de 1.0×10^{-3} a 1.0×10^2 partículas virales en desechos tratados (Rose, 1986; Rose *et al.*, 1996).

Los tratamientos de aguas convencionales como la cloración y la filtración para la eliminación de los indicadores, muchas veces no es suficiente para la eliminación de los virus entéricos. Incluso, en el ambiente los virus entéricos pueden sobrevivir bajo un amplio rango de pH (3-10) y por periodos extendidos a bajas temperaturas (<23°C) (Maier *et al.*, 2000). Se ha reportado la sobrevivencia y persistencia de virus por arriba de 120 y 130 días en agua dulce y salada, respectivamente. En suelo, la sobrevivencia se observó por arriba de 100 días en un rango de temperaturas de 20 a 30°C (USEPA, 1992).

A pesar de la persistencia de los virus entéricos en ambientes acuáticos, la estabilidad de éstos es fundamental para su transmisión. Algunos virus entéricos, como hepatitis A y norovirus, poseen como material genético ARN, el cual, es sensible, hidrolizado tanto por pH alcalinos como básicos y son destruidos por procesos enzimáticos y de radiación (Carter *et al.*, 2005).

Virus de Hepatitis A (VHA)

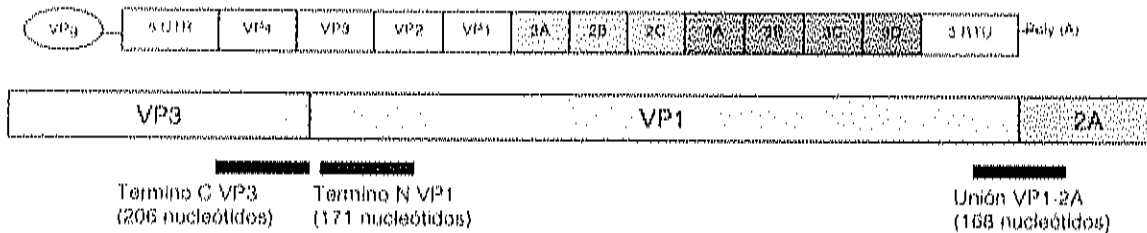
La hepatitis endémica se ha presentado desde años atrás, sin embargo el agente causal fue identificado hasta en 1972 cuando la técnica desarrollada de microscopía electrónica permitió la identificación de las partículas virales (Kapikian *et al.*, 1972). La cepa HM-175 del VHA, fue la primera aislada de un brote en Australia (Gust *et al.*, 1985).

Morfología. Este agente fue inicialmente clasificado como miembro del género *Enterovirus*, sin embargo, existen diferencias de nucleótidos y secuencias de los aminoácidos que clasificaron al virus como único miembro del género *Hepatovirus* y familia *Picornaviridae* (Prescott *et al.*, 2002). En contraste con todos los miembros de la familia *Picornaviridae*, el VHA se replica muy despacio en cultivo de tejidos (Hollinger and Emerson, 2001).

El VHA, está formado por un genoma lineal de ácido ribonucleico de cadena sencilla (ARNcs) de polaridad positiva (en sentido del ARN mensajero), de 27 nm de diámetro (Maier *et al.*, 2000); es un virus icosaédrico que carece de envoltura, y puede replicarse en líneas celulares (Prescott *et al.*, 2002).

Genoma. Como todos los picornavirus, el genoma puede ser definido dentro de tres regiones distintas (Figura 1). La 5' UTR (región no traducida), contiene una estructura secundaria larga requerida para la traducción independiente de cap y está covalentemente unida a la proteína viral VPg. Sólo un marco de lectura abierto (ORF) codifica para todas las proteínas virales (Figura 2). La región P1 codifica para proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3 y probablemente VP4) y las regiones P2 y P3 codifican para proteínas no estructurales asociadas con la replicación. Finalmente, existe una región corta 3' UTR en el tramo poly(A) (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

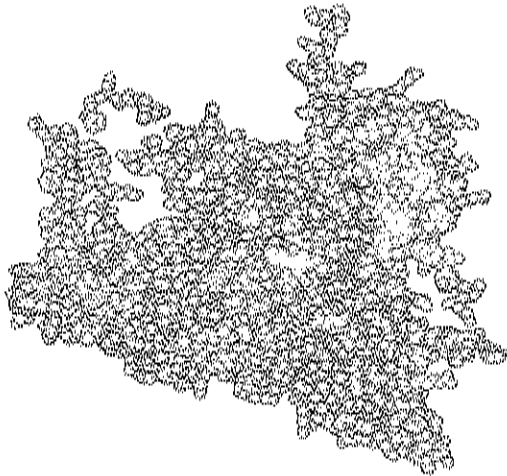
Figura 1. Diagrama esquemático del genoma del virus de hepatitis A



Costa-Mattioli *et al.*, 2003

Brown *et al.* (1989), revelaron que VP1 y la región 5' UTR son las regiones con mayor variabilidad genética y más conservadas, respectivamente. Para 1992, los análisis genéticos mostraron que de 152 cadenas de VHA recuperadas alrededor de todo el mundo, existían 7 genotipos de VHA (I-VII). Los virus de 4 genotipos (I, II, III y VII) fueron aislados de casos humanos con VHA, mientras que los otros 3 genotipos (IV, V y VI) fueron aislados sólo de una única especie de simio que desarrolló la enfermedad del VHA durante cautiverio (Nainan *et al.*, 1991; Tsarev *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1992). Los genotipos I y II fueron subdivididos dentro de dos grupos (subgenotipos), los cuales difieren en cuanto a secuencia en no más de 5-7 % de la posición de las bases. Estudios han demostrado la baja variabilidad genética del VHA, lo cual, se refleja con la existencia de un solo serotipo (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

Figura 2. Localización de los aminoácidos en la superficie de la cápside del VHA



El color verde, rosa y azul se refiere a los residuos VP2, VP3 y VP1 respectivamente, el color amarillo corresponde a residuos implicados en sitios antigénicos (Sánchez *et al.*, 2002)

Patogénesis y respuesta inmune. La transmisión del VHA, ocurre mediante la ruta fecal–oral, donde una sanitización insuficiente o condiciones de pobre higiene personal favorecen la contaminación de agua y alimentos, especialmente productos de mar (Hadler *et al.*, 1980). Una vez que el virus entra a las células del cuerpo humano, se lleva a cabo la adsorción en la superficie de la célula mediante reconocimiento de proteínas Alfa₂-macroglobulina de la superficie celular, atravesando la membrana plasmática de la célula huésped hasta la penetración (Maier *et al.*, 2000). Habitualmente, sólo provoca síntomas intestinales leves. Ocasionalmente, se produce viremia (presencia de virus en la sangre) y los virus se propagan al hígado, entran en la bilis y son liberados en el intestino delgado. Esto explica porque las heces son tan infecciosas (Prescott *et al.*, 2002).

Los síntomas de la enfermedad comprenden anorexia, malestar general, náuseas, diarrea, fiebre, fatiga y escalofríos. Si se infecta el hígado se produce ictericia (Ross and Anderson, 1991).

La respuesta inmunológica es desarrollada de 2-3 semanas después de la infección, y conduce a un ataque inmunológico en las células del hígado infectadas. Generalmente, la respuesta inmunológica elimina todas las células infectadas (y por lo tanto, al virus) del cuerpo. La convalecencia puede ser prolongada (8-10 semanas) y alrededor del 15% de los casos de VHA pueden volver a recaer en un período de 12 meses o más (Carter, 2005).

Los cambios en la edad incrementan la severidad de la infección, es decir, la infección está asociada con la edad. En menores de 3 años, la infección por VHA es subclínica, pero la infección sintomática predomina a los 5 años y ésta es peor con la edad (Hadler *et al.*, 1980).

Período de incubación e infección. El período medio de incubación del VHA es aproximadamente de 28 días, con un rango de 15 a 50 días, el cual está asociado con la dosis. El mayor daño de propagación de la enfermedad ocurre durante la mitad del período de incubación, o bien, antes de presentar los síntomas (Maier *et al.*, 2000). Este virus es arrojado en las heces de personas infectadas, pudiendo ser detectado en la sangre y orina del enfermo (Tortora *et al.*, 1994, Bitton, 1994).

Los virus son excretados durante los siguientes 10 a 14 días del período de incubación, pudiendo esto ser una importante fuente de contaminación y subsecuente propagación de la enfermedad a través de las comunidades (Sair *et al.*, 2002).

Persistencia. El VHA es relativamente estable al tratamiento con éter al 20%, con ácido (pH 1 durante 2 h) y con calor, pudiendo sobrevivir a temperaturas de 60°C por 1 hora, temperaturas arriba de 85 a 95°C son requeridas para su inactivación en productos de mar, aunque otros autores manejan que temperaturas de los 100°C son necesarias (Crocì *et al.*, 1999, Brooks, 2005). La infectividad del VHA se puede conservar al menos durante un mes después de secarlo y almacenarlo a 25°C y 42% de humedad relativa o durante años a -20°C. El virus se destruye en autoclave (121°C por 20 min), por ebullición de agua durante 5 min, por calor seco (180°C por 1 h), por radiación ultravioleta (1 min a 1.1 watts), por tratamiento con formol (1:4000 durante 3 días a 37°C), o por un tratamiento con cloro (10 a 15 ppm por 30 min) (Brooks *et al.*, 2005).

Costos de la enfermedad. El costo de los brotes ocasionados por virus ha sido reportado. Un simple brote de hepatitis A (VHA), que involucró más de 5000 personas en Colorado, generó un costo de 50,000 dólares sólo en tratamientos médicos, mientras que, el costo para controlar dicho brote fue por arriba de medio millón de dólares (Dalton *et al.*, 1996). En Francia, se estiman costos de una hepatitis A no complicada cerca de 300 euros (existiendo de 30,000 y 50,000

nuevos casos por año), mientras que, los casos fulminantes son de 6000 euros, reportándose de 50 a 60 casos cada año (Germinario *et al.*, 2000).

Incidencia, morbilidad y mortalidad. Afortunadamente, la mortalidad ocasionada por el VHA es baja (inferior al 1%). En Canadá, entre 1000 y 3000 casos de hepatitis son reportados cada año, donde hepatitis A es responsable del 25-40% de todos los casos hepatitis aguda. Uno de cada cuatro casos requiere de hospitalización y el rango de mortalidad entre los adultos hospitalizados ha sido estimado entre el 0-15% (Costa-Mattioli *et al.*, 2003). En Estados Unidos en el período de 1980 al 2001, se registraron alrededor de 25,000 casos cada año (CDC, 2002).

Estudios epidemiológicos indican que el rango de morbilidad y mortalidad de hepatitis A entre viajeros es 500 veces más alto que para el cólera, 150 veces más que la poliomelitis, 10 veces más que la fiebre tifoidea y 3 veces más que hepatitis B (Lenfant, 1994).

Norovirus (NV)

Debido a que las relaciones antigénicas entre los calicivirus (género al cual pertenece norovirus), permanecen aún muy poco claras, la mayoría de ellos han sido denominados según la localidad geográfica de su primer aislamiento. Así, el prototipo Norwalk debe su nomenclatura a los hallazgos correspondientes durante un brote de gastroenteritis aguda en el año 1968 en una escuela primaria de

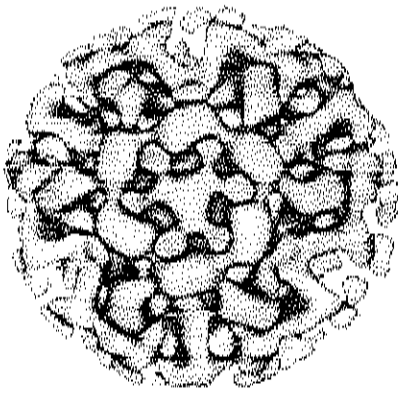
Norwalk, Ohio, Estados Unidos; sin embargo, los virus no fueron claramente identificados hasta 1972 por microscopía electrónica (Kapikian *et al.*, 1972).

Morfología. Visualizados por microscopía electrónica, son virus pequeños, entre 30 a 35 nm de diámetro, en forma icosaédrica (Figura 3) con un genoma ARN de cadena sencilla (ARNcs) y polaridad positiva de 7-7.5 kb (Jiang *et al.*, 1996).

Datos de microscopía electrónica muestran que la envoltura de la proteína de la cápside viral, se divide en dos dominios mayores, dominio S (esqueleto N-terminal) y P (protuberancia C-terminal). El dominio S forma la cubierta interior, mientras que el dominio P se muestra como una protuberancia que forma esqueleto. Estudios morfológicos muestran que el dominio S contiene elementos requeridos para el ensamblamiento de la cápside, donde hace contacto intermolecular entre subunidades diméricas con el dominio P incrementando la estabilidad de la cápside (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2002). El dominio P, a su vez, es dividido en los dominios P1 y P2, donde P2 está localizado en la superficie más exterior de la cápside.

Genoma. El genoma de norovirus (Figura 5) codifica para una gran proteína de la cápside estructural (VP1) de 56 kDa, una proteína menor de la cápside (VP2) en el extremo 3' del genoma, y el extremo 5' del genoma codifica para una poliproteína grande que es procesada post-traduccionalmente dentro de proteínas no estructurales (NS) incluyendo un ARN polimerasa (POL) dependiente de ARN (Green *et al.*, 2001).

Figura 3. Estructura tridimensional de norovirus

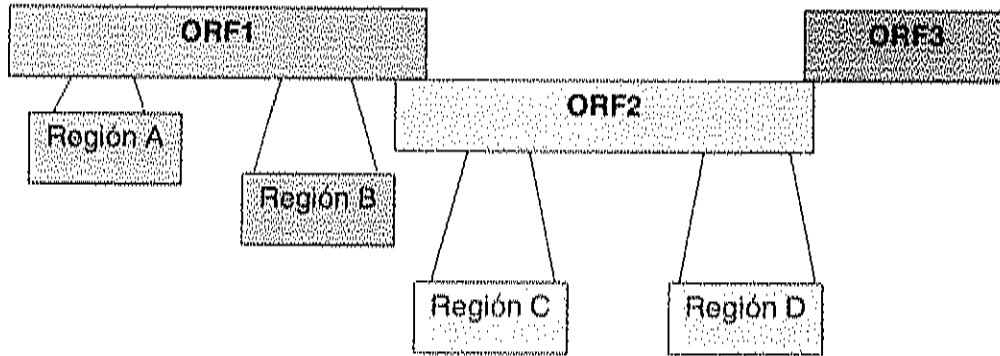


Resolución determinada por técnicas de microscopía electrónica (cryo-EM), a lo largo del eje tridimensional icosaédrico (Prasad *et al.*, 1999)

Las cápsides están compuestas de 180 copias de una sola proteína estructural mayor (Jiang *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 1993). Los 180 monómeros de las proteínas de la cápside están organizadas en 90 capsómeros diméricos que forman un T=3 icosaedro (Prasad *et al.*, 1999).

Basados en la información de la secuencia obtenida del gen POL (ORF1) o el gen VP1 (ORF2), norovirus puede ser subdividido en cinco grupos genéticos separados o genogrupos (GI, GII, GIII, GIV y GV) (Ando *et al.*, 2000; Koopsmans *et al.*, 2002). Las cepas de norovirus que infectan al humano, han sido clasificadas dentro de los genogrupos, GI y GII (Green *et al.*, 2000) y un posible GIV (Vinjé and Koopmans, 2000). A su vez, los GI y GII son subdivididos en 14 subgrupos (genotipos), GI.1-GI.7 y GII.1-GII.7 (Chakravaty *et al.*, 2005).

Figura 4. Representación esquemática del genoma de norovirus



Vinjé *et al.*, 2003

Patogénesis y respuesta inmune. Los estudios de administración de virus a voluntarios, muestran que el 50% de ellos desarrollan la enfermedad (Graham *et al.*, 1994). Algunas características clínicas de norovirus son vómitos agudos, donde 30 millones de partículas pueden ser excretadas por esta ruta (Reid *et al.*, 1988), fiebre, diarrea y calambres abdominales (McCarthy *et al.*, 2000). La excreción de los virus puede ocurrir desde 15 h después de la exposición, con excreciones prolongadas de 7-14 días (Graham *et al.*, 1994).

Tang and Jiang (2005), concluyeron que la partícula P (C-terminal) de norovirus se une a las células Caco-2 intestinales, es la partícula P quien, presenta mayor afinidad por los antígenos histo de los grupos sanguíneos (HBGAs, por sus sigas en inglés) como receptores, los cuales, son carbohidratos complejos presentes en

los glóbulos rojos y mucosa epitelial, o como antígenos libres en los fluidos biológicos, como saliva, leche, y contenido intestinal.

Período de incubación e infección. El período de incubación tiene una media de 24-48 h con un máximo de excreción viral en las heces al inicio de la enfermedad. Mediante el uso de técnicas moleculares (RT-PCR) se demostró que, aunque la mitad de los voluntarios se enfermaron, el 90% de ellos excretaron virus en las heces, de lo que se deduce que el 40% tuvieron una infección subclínica. Se observó una inflamación en la mucosa del intestino así como incremento en las células epiteliales (Agus *et al.*, 1973; Dolin *et al.*, 1975). Debido a que, existen múltiples serotipos de NV, la inmunidad a éstos es de corta vida, es por ello, que los individuos sólo se protegen por algunos meses después de la infección, antes de volverse a infectar con el mismo virus (Parrino *et al.*, 1977).

Persistencia. Estudios con modelos de calcivirus felinos (FCVs), han demostrado que esta familia de virus a la cual pertenece norovirus, es menos resistente a la inactivación térmica que el virus de hepatitis A. La investigación realizada por Slomka and Appleton (1998), demostró que la inactivación completa de FCVs en productos de mar, se lleva a cabo cuando se calientan a una temperatura interna de 78°C o más. Norovirus, resiste temperaturas de 60°C por 3 min, pH de 2-7 por 3 h y exposiciones de cloro de 6.25 mg/L (Keswick *et al.*, 1985). La infectividad en los productos de mar no se ve reducida después de un mes de almacenamiento a 4°C o por cuatro meses congelados (Carter, 2005).

Norovirus se ha encontrado en aguas de desecho usando técnicas moleculares como la RT-PCR. Se presume, que estos virus se encuentran en concentraciones mayores que 10^7 partículas virales, lo cual no puede ser relacionado con el número de partículas infectivas (Wyn-Jones and Sellwood, 2000).

Detección de Virus en Agua

El monitoreo para evaluar la presencia de virus entéricos en aguas ambientales comenzó en la década de los 40's, y este trabajo se ha aplicado tanto para la detección de virus humanos como de animales, para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua y posiblemente el rastreo de la fuente de contaminación del agua (Griffin *et al.*, 2001).

La detección de virus en agua requiere de tres pasos generales: (a) Toma de una muestra representativa; (b) Concentración de los virus de la muestra (y purificación); e (c) Identificación y estimación cuantitativa de los virus concentrados. Los problemas asociados con la detección de virus de importancia en salud pública en los ambientes acuáticos, son el pequeño tamaño de las partículas virales (20-100 nm), la baja concentración de los virus en el agua y la variabilidad en cantidad y tipos en que se presentan, materiales disueltos y suspendidos que interfieren con

los procesos de detección, así como las limitaciones existentes de los métodos de estimación e identificación de los virus (EPAC, 1998).

Toma de la Muestra

Para la toma de muestra de agua, se recomienda el uso de guantes, lavar y desinfectar los contenedores con escobillón y detergente libre de fosfatos, así como enjuagar tres veces con agua deionizada. Botes de polietileno o bolsas de plástico son las más usadas para este proceso, según datos de la USEPA (1997), se debe de rotular con número, fecha y hora a cada contenedor, tanto éste como la tapa para evitar confusiones. Al realizar la toma de muestra se debe tratar de remover el agua de la superficie, colocar el contenedor con la boca hacia abajo en sentido de la corriente a 30 cm de profundidad aproximadamente, y retirar el contenedor hacia la superficie (EPA, 2006).

Concentración Viral

Las muestras ambientales para la concentración y subsecuente detección por métodos celulares o moleculares de los virus; van de los 10 a los 1000 L de agua (Bitton, 1994).

Diferentes métodos se han usado para concentrar partículas virales a partir de muestras de aguas ambientales; la adsorción-elución viral, que utiliza filtros

cargados positiva o negativamente; la precipitación con sulfato de amonio; floculación orgánica o el empleo de polietilenglicol (Bosch *et al.*, 1998).

Adsorción-elución. El método estándar para la concentración viral (APHA, 1995), es la adsorción-elución. El método involucra la manipulación de cargas en la superficie del virus, usando cambios de pH para maximizar la adsorción del virus a los filtros cargados (Lipp *et al.*, 2001; Pallin *et al.*, 1997). El proceso de filtración se lleva a cabo a través de membranas de microporos (0.2-0.45 μm) cargadas positiva ó negativamente, por lo que también se le llama microfiltración (MF). Para filtros cargados negativamente, la muestra de agua es condicionada al uso de pH ácido mediante sales divalentes (MgCl_2) o trivalentes (AlCl_3), que alteran la carga de la superficie de las partículas virales y permiten la adsorción de éstas al filtro (Berg, 1983).

El tratamiento del agua no es necesario cuando se usan filtros cargados positivamente, éstos se tapan fácilmente y presentan una baja eficiencia de recuperación en ambientes marinos debido a la presencia de sales y alta turbidez, causando una baja adsorción de los virus a la membrana del filtro (Lukasik *et al.*, 2000).

Para ambos tipos de filtros (positivos o negativos), se usa un eluente alcalino, como la glicina básica o como el extracto de carne; para alterar la carga de la superficie del virus y llevarlo a la solución; posteriormente para disminuir el

volumen se requiere una concentración por métodos como el polietilenglicol, y subsecuente detección por medios celulares o moleculares como PCR (Katayama *et al.*, 2002).

Diversos estudios, han mostrado variabilidad en las eficiencias de adsorción de los virus a las membranas mediante el método de adsorción-elución, (Guttman and Armon, 1983), debido a las diferencias en la composición química del agua; como pH, concentración de sales, presencia de materiales proteínicos, componentes húmicos, o bien una combinación de éstos. El método implica el proceso de volúmenes de muestras de agua muy grandes (100-1000 L), lo cual incrementa el tiempo de muestreo, además del requerimiento del manejo de equipos grandes.

Un método alternativo para la concentración de partículas virales en ambientes acuáticos es la ultrafiltración, el cual se ha evaluado en diversos estudios para la recuperación de bacterias, virus y protozoarios (Winona *et al.*, 2001; Morales-Morales *et al.*, 2003; Olszewisky *et al.*, 2005).

Ultrafiltración. El sistema de ultrafiltración (SUF), es un sistema de membranas de flujo cruzado que involucra el manejo de la presión. Puede purificar, concentrar y fraccionar moléculas orgánicas de un flujo regulado simultáneamente. El flujo entrante presurizado se pasa a través de una membrana semipermeable, la cual separa al flujo de agua en dos efluentes llamados retenido (concentrado) y permeado (filtrado) (Divizia *et al.*, 1988).

El permeado es la fracción de muestra que ha sido pasada a través de la membrana semipermeable y que contiene algunas moléculas pequeñas disueltas, como iones y agua; mientras que el retenido, es el efluente que no pasa a través de las membranas del ultrafiltro, puesto que, el tamaño de poro de la membrana es menor. La naturaleza química y física de la membrana es quien controla los componentes que serán retenidos y cuáles no. La habilidad de la membrana de retener la mayoría de las moléculas de tamaño conocido es generalmente usada para especificar la porosidad de esta. El término usado es masa molecular de corte (MWCO, por sus siglas en inglés), de esta manera las partículas de una mayor masa molecular de corte al especificado por la membrana, quedarán en el retenido, y las de menor masa molecular quedarán suspendidas en el permeado (Caballero *et al.*, 2003).

Las membranas más usadas para el SUF son hechas de polisulfona (PS), las cuales presentan la ventaja de que pueden ser operadas en un amplio rango de temperaturas (hasta 75°C), son compatibles con un amplio rango de pH (0.5-13), y su limpieza es fácil. Se encuentran disponibles en tamaños de poro que van de los 0.001 los 0.02 μm , además de que son resistentes al cloro (Caballero *et al.*, 2003).

Algunas desventajas del SUF son atribuidas al diseño de la membrana, como el que deben ser operadas en un bajo rango de presión (170-700 kPa) y pueden contaminarse debido a que son reusables (Caballero *et al.*, 2003).

Un factor importante para la eficiencia de recuperación, es la presión manejada en el sistema de ultrafiltración, Divizia *et al.* (1988), obtuvieron eficiencias de recuperación del 100% inoculando hepatitis A en muestras de agua dulce, utilizando una presión de 10-12 psi, y de 50-60% utilizando presiones de 18-26 psi. En este estudio se observó, que la ultrafiltración posee ventajas como el no ser necesario un ajuste de pH, además de que los compuestos orgánicos o soluciones proteínicas no interfieren con la recuperación.

El SUF ha sido utilizado en diversos estudios para evaluar la eficiencia de recuperación de virus. Winona *et al.* (2001), reportaron eficiencias de recuperación mayores del 60% para los bacteriófagos PP7 y T1 así como para poliovirus, mediante el método de ultrafiltración en 2 L de agua inoculada. Para este estudio, se utilizaron diferentes tipos de aguas ambientales, como agua superficial, dulce y subterránea. Por otro lado, Olszewisky *et al.* (2005), evaluaron la eficiencia de recuperación con los tres virus antes mencionados, inoculándolos en agua subterránea, superficial y dulce pero a partir de 100 L de agua, y mediante ensayos de placa, obtuvieron eficiencias de recuperación mayores del 70%. En ambos estudios, el filtro se pretrató con suero fetal bovino (SFB) o suero de cabra, con el propósito de incrementar la adsorción de los virus a la superficie de la membrana del filtro.

Hill *et al.* (2005) obtuvieron eficiencias de recuperación de 70-93% para bacteriófago MS2, *C. parvum*, entre otras especies inoculados en agua de grifo. En este estudio, los filtros se pretrataron con suero bovino al 5% y el incremento de la eficiencia de recuperación respecto al estudio de Winona *et al.* (2001), se asumió al uso de polifosfato de sodio (NaPP) como dispersante de los microorganismos aplicado en las muestras de agua, y Tween 80 como eluente de los microorganismos aplicado por recirculación en el filtro.

Una vez concentrada la muestra, existen diferentes métodos para disminuir el volumen y la aplicación en ensayos moleculares. La precipitación con polietilenglicol (PEG) se ha utilizado en sistemas acuosos de dos fases para concentrar y aislar virus de una variedad de muestras ambientales (Lewis y Metcalf, 1998). Se han sugerido dos mecanismos por los cuales actúa el PEG; el primero es el mencionado por Atha e Ingham (1981), quienes sugieren que el PEG actúa como una "esponja de solvente inerte" que excluye a las proteínas del solvente, incrementando efectivamente su concentración hasta que la solubilidad se excede y ocurre la precipitación. Éste proceso, muy similar al "salting out"; es discutido por Bhat y Timassheff (1992), quienes mencionan que el PEG disminuye la tensión superficial del agua y muestra un carácter fuerte no polar por lo que, la formación se ve afectada por factores como tamaño de la proteína, concentración y carga. El segundo mecanismo, es el sugerido por Lee y Lee (1981), donde la carga de la superficie de la proteína produce un efecto termodinámico infavorable para la

solubilización del PEG, causando que éste sea excluido de la "zona de la proteína", y como consecuencia ocurre la precipitación o cristalización de las proteínas.

Identificación viral

Ensayos de infectividad en líneas celulares de mamíferos; métodos inmunológicos; métodos de hibridación de ácidos nucleicos; métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR son algunos de los métodos de identificación viral (Sair *et al.*, 2002).

Las líneas celulares presentan la ventaja de determinar infectividad, proporcionando datos cuantitativos, sin embargo se requiere un tiempo largo del proceso (días a semanas) y es más costoso que una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencional, además de que no todos los virus pueden crecer en líneas celulares (Lipp *et al.*, 2001). Comparado con ello, la PCR es más rápida, además de que incrementa la sensibilidad y especificidad, la desventaja de este método, es que sólo se determina presencia o ausencia (no cuantitativa), y que los inhibidores presentes en las muestras ambientales pueden interferir con la amplificación, y la infectividad no puede ser determinada (Lipp *et al.*, 2001).

PCR. El objetivo de la técnica de PCR, es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirecta de un ARN, presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra original. Debe resaltarse que, es un requisito imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de ADN o ARN que se requiere amplificar (APHA, 1998).

La PCR resulta de la aplicación práctica de tres conceptos fundamentales de la biología molecular, 1) La desnaturalización del ADN para dar hebras sencillas, 2) la hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido. También se denomina etapa de templado (entendido como disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica y 3) la replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa a partir del oligonucleótido anterior como cebador, también conocida como elongación o extensión del cebador, o polimerización (Luque y Herráez, 2001).

Según sea el objetivo del estudio, existe la aplicación de diferentes modalidades la PCR, como RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR semianidada, etc.

a) RT-PCR

El nombre "PCR transcripción inversa", indica que se trata de una amplificación de ARN (especialmente ARNm) a través de la síntesis previa de su ADNc (ADN complementario a su ARN), que después se amplifica por PCR. Es

decir, no se obtienen copias del ARN, sino de ADNc. Es el método con mayor capacidad de detección de los disponibles para la medida de la expresión génica *in vitro* (Luque y Herráez, 2001).

Para el proceso de RT-PCR la mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios como muestra de ARN, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores y desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs, por sus siglas en inglés). El proceso comienza (ejemplo 45 min a 48°C) con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, permaneciendo el ADN unido al molde como dúplex ARN: ADNc. En una segunda etapa (ejemplo 2 min a 94°C) se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal, la hebra de ADNc liberada actúa como molde para su segunda hebra de ADNc y luego el dúplex se amplifica en sucesivos ciclos. Teóricamente basta con una molécula de ARN que esté intacta entre los dos sitios de unión al cebador para conseguir la amplificación (Luque y Herráez, 2001).

Los VHA y NV se han detectados mediante RT-PCR. Morace *et al.* (2002) detectaron virus de hepatitis A en agua ambiental (Mediterráneo) durante un período de 8 meses, utilizando dos métodos de análisis. El primero de ellos, está basado en la captura del antígeno (AC) y el segundo en la extracción de ARN. Los virus fueron detectados en todas las muestras analizadas, confirmando la alta estabilidad de este virus y lo difícil que resulta su eliminación mediante los

tratamientos convencionales aplicados en agua salada. La alta sensibilidad de la extracción de ARN seguido de RT-PCR mostró mejores resultados que la captura del antígeno seguida de RT-PCR, ya que éstas resultaron contaminadas probablemente debido a la presencia de sustancias orgánicas del agua salada que previnieron la captura por los anticuerpos.

b) PCR anidada y PCR semianidada

Por otra parte, la PCR anidada ofrece un aumento de sensibilidad, ya que, se realiza una segunda reacción de PCR, con dos oligonucleótidos nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos. Las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias a los nuevos cebadores, a diferencia de los productos no específicos generados en la primera PCR. Este método también sirve para aumentar el factor de amplificación conseguido, al suponer dos rondas de amplificación (Luque y Herráez, 2001). La PCR semianidada, es una PCR anidada en la que sólo se utiliza uno de los oligonucleótidos internos.

Electroforesis en gel de agarosa

Ésta técnica, es una herramienta fundamental en el análisis de ácidos nucleicos. Es simple y efectiva para la visualización y clasificación del ADN por tamaño de moléculas como plásmidos o fragmentos de ADN. Las muestras se

cargan dentro del medio de agarosa. Se aplica un voltaje al gel, causando que el ADN migre hacia el ánodo debido a los fosfatos cargados negativamente a lo largo del ADN. El gel es teñido con un colorante como bromuro de etidio, permitiendo la visualización del ADN al observarse bajo luz ultravioleta. Los fragmentos más pequeños de ADN migran más rápido a través del gel, mientras que los más grandes migran más lentamente. El tamaño molecular en pares de bases (pb) del ADN determina el rango de migración a través del gel, y se estima el tamaño en base al estándar que es corrido paralelamente con el gel (Maier *et al.*, 2000).

Genotipificación Viral

La habilidad de analizar el ácido nucleico de las secuencias de los virus, permite identificar los genes virales en variantes genéticas que ocurren de manera natural (Rosental, 1994). El genotipo se define como la secuencia de nucleótidos del virus de la cual la secuencia de aminoácidos de una proteína puede deducirse. Para la genotipificación, la secuencia de nucleótidos de interés debe ser comparada con una variedad de genotipos virales (Persing *et al.*, 2004).

Existen diferentes métodos para la genotipificación como análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de (RFLP, por sus siglas en inglés), hibridación inversa, análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de

rotura (CFLP, por sus siglas en inglés), así como secuenciación directa del ADN.

La secuenciación del ADN identifica cambios críticos en los nucleótidos que pueden llevar a una proteína disfuncional asociada con una condición o enfermedad en particular (Mondelli *et al.*, 1994).

Secuenciación

Consiste en la identificación de la secuencia de las bases de un determinado fragmento de ADN. Existen cuatro pasos básicos para la secuenciación del ADN, aislamiento del ácido nucleico, el cual involucra la amplificación del ADN; la síntesis del ADN y marcado de la cadena; separación electroforética de las cadenas marcadas; y traducción de los datos electroforéticos según el significado de la información de la secuencia de la cadena (Persing *et al.*, 2004). El aislamiento del ácido nucleico depende de la naturaleza de la molécula de interés; pudiendo ser ARN o ADN, plásmidos o productos de PCR, los cuales usualmente son amplificados por PCR previo al diagnóstico de secuenciación. Se requiere de una cantidad de ADN suficiente para incrementar la sensibilidad y facilitar la legibilidad de las secuencias de interés (Persing *et al.*, 2004).

El ADN puede ser marcado y fragmentado por diversos métodos; la estrategia más común de fragmentación es la tecnología de terminación en cadena durante la

síntesis del ADN por incorporación de un terminador dideoxy, conocido como secuenciación de Sanger. Actualmente, existen tecnologías para la secuenciación específica, como la electroforesis en gel separador, la pirosecuenciación y la electroforesis capilar. Ésta última, es una técnica reciente que proporciona múltiples ventajas como el no ser necesario la preparación de geles. El método utiliza una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación cíclica. El producto de la reacción se separa mediante electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser (Persing *et al.*, 2004).

Las muestras migran del capilar al contenedor recubierto, donde el láser ilumina el flujo de la muestra. El rayo del láser se enfoca a través o justo por debajo de la punta del capilar permitiendo la excitación del flujo de la muestra (Dovich and Zhang, 2001), y el lente toma cada señal de emisión fluorescente.

Análisis filogenético

El análisis filogenético es un proceso encargado de probar hipótesis sobre la descendencia de ciertas especies de un ancestro común, y de esta manera establecer el genotipo o genogrupo al que las secuencias de interés pertencen. La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos emparentados (taxón) o genes (Persing *et al.*, 2004).

Para llevar a cabo un análisis filogenético, se requiere de la secuencia de interés, un alineamiento, un modelo de sustitución de bases, la creación de una matriz de distancias que permita la construcción de un árbol filogenético, así como su evaluación (Persing *et al.*, 2004). Una vez que se obtiene la secuencia del ADN de interés, se procede a identificar las secuencias similares mediante paquetes de computadora específicos que permiten conocer el ancestro común. Las secuencias que muestran un grado idéntico o similar de homología a la secuencia de interés son buscadas por su nombre o número de acceso, en bases de datos como el banco de genes, para la comparación por alineamiento y construcción de un árbol filogenético, el cual muestra las relaciones de evolución entre varias especies u otras entidades que se cree tuvieron una descendencia común (Persing *et al.*, 2004). Algunos paquetes utilizados para el alineamiento y construcción del árbol filogenético son Genetix-Win, MacVector, BioEdit, Mega, CLUSTAL W, Genetic Computer Group (GGG), entre otros.

Eficiencia de Recuperación Viral

Examinar una muestra de agua incluye evaluaciones preliminares que permitan establecer la eficiencia de recuperación del método. Para realizar esto, se requiere conocer la concentración inicial de uno o más virus a evaluar en un determinado volumen de muestra; procesar la muestra por el método de concentración; y aplicar

ecuaciones matemáticas que permitan estimar la concentración de virus recuperados de la muestra (EPAc, 1998).

La PCR cuantitativa, también conocida como PCR en tiempo real, permite la amplificación y detección de los fragmentos de ADN de manera simultánea en el mismo vial cerrado. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento. A pesar de la sensibilidad y rapidez de este método, posee la desventaja de ser costoso y poco accesible (Laverick *et al.*, 2004).

Uno de los métodos comúnmente utilizados para evaluar la eficiencia de recuperación de microorganismos en muestras de aguas tratadas, es el conteo en placa (Winona *et al.*, 2001). Éste involucra la inoculación de virus modelo como bacteriófagos, los cuales presentan características muy similares a los virus entéricos (forma, tipo de genoma, tamaño, entre otros). Los bacteriófagos, lisan a las células bacterianas. La técnica de doble agar, permite la cuantificación de los bacteriófagos a partir de la inoculación de una concentración conocida y la concentración de la muestra ya tratada; no se requiere de líneas celulares como en el caso de poliovirus o echovirus, pero sí de un hospedero (bacteria) (APHA, 1998).

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Podrá implementarse el sistema de ultrafiltración a nivel laboratorio para su aplicación en la concentración de virus entéricos en agua estuarina?
2. ¿Existirá la presencia de los virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar Huizache Caimanero?
3. ¿Será posible la identificación de los virus de interés mediante la RT-PCR?
4. ¿Las cepas aisladas de los virus serán patógenos al humano?
5. ¿Los indicadores de contaminación fecal y los parámetros fisicoquímicos serán datos predictivos respecto a la presencia de los patógenos?

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Determinación de la eficiencia de recuperación del sistema de ultrafiltración utilizando el bacteriófago MS2 inoculado en agua estuarina; y su aplicación acoplado a RT-PCR para la detección de virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar Huizache Caimanero Sinaloa, de septiembre 2006 a abril 2007; y de la capacidad predictiva de los indicadores de contaminación fecal y las variables fisicoquímicas respecto a la presencia de los patógenos virales.

JUSTIFICACIÓN

La determinación de la eficiencia de recuperación viral del SUF a nivel laboratorio, permitirá su implementación en campo para la concentración e identificación por métodos moleculares de los virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar el Huizache-Calmanero. Aunado a un análisis estadístico (regresión logística), se estime el riesgo de la presencia de los patógenos en relación a la calidad del agua e indicadores de contaminación fecal; aportando elementos que alerten a las autoridades pertinentes, a tomar medidas correctivas y/o preventivas, para asegurar la calidad microbiológica del agua y subsecuentemente la de los productos de mar que en esta se encuentren; así como el bienestar del consumidor; evitando vedas sanitarias que impactan socio económicamente a la población.

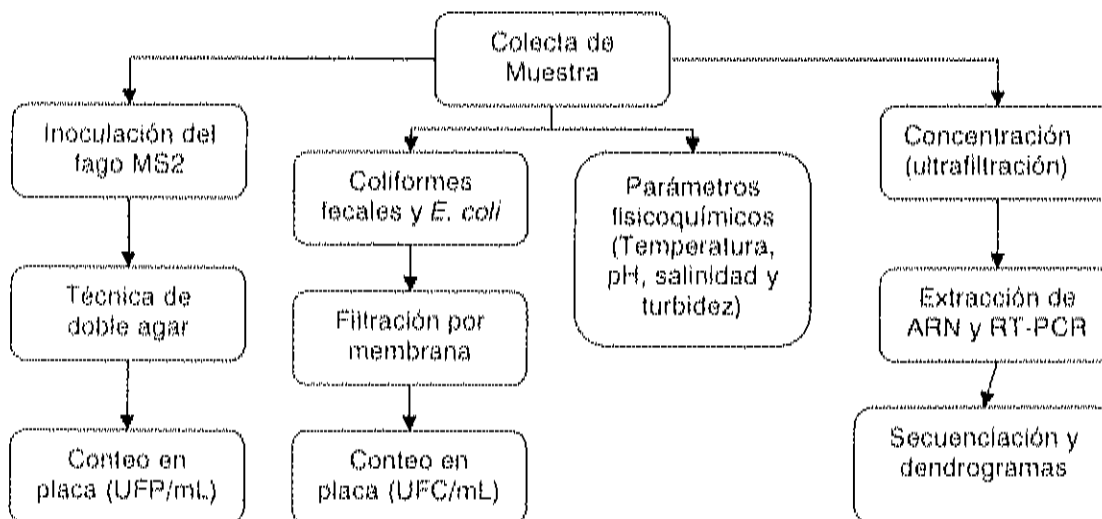
META

Establecer una metodología factible en tiempo, costo y beneficio, para el monitoreo de virus entéricos en ambientes acuáticos destinados al cultivo y comercialización de especies marinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología desarrollada en el presente estudio, se basó en colecta de muestra, concentración viral e identificación del VHA y NV. En la Figura 6, se muestra de manera general, la estrategia de trabajo que se siguió.

Figura 5. Esquema representativo de la estrategia de trabajo general



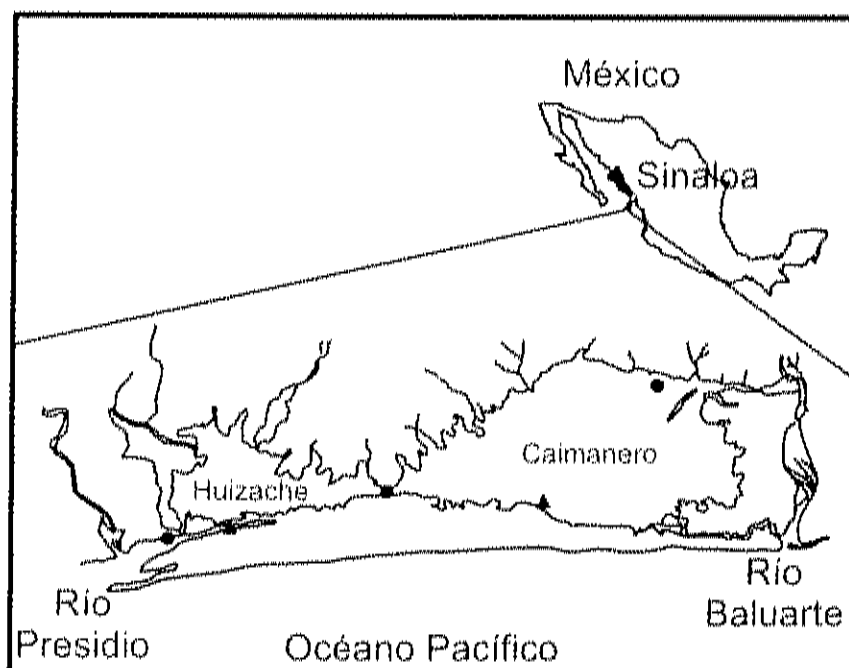
Detección de los Virus de Hepatitis A y Norovirus

Toma de muestra

La toma de muestra se realizó en el Complejo Lagunar Huizache-Caimanero, de acuerdo a los métodos descritos para colecta (9060 A), preservación y almacenamiento (9060 B) de muestras de agua (APHA, 1998). Se tomaron cuarenta

muestras de agua estuarina de cinco puntos diferentes a lo largo del Complejo Lagunar, conocidos como El Ostial, Los Candelones, Tapo Hacienda, La Guasima y Tapo Caimanero, establecidos por el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP), Mazatlán (Figura 6). La toma de muestra se realizó una vez por mes de septiembre 2006 a abril 2007.

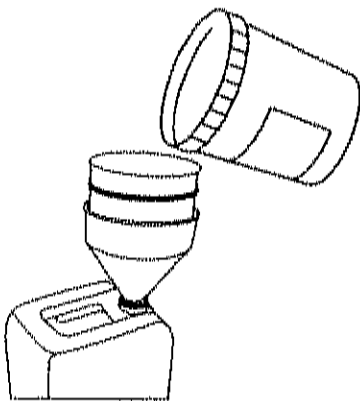
Figura 6. Ubicación geográfica de los puntos de toma de muestra en el Complejo Lagunar Huizache Caimanero



El protocolo consistió en tomar 20 L de agua para la identificación de los virus, 500 mL de agua para la cuantificación de los indicadores de contaminación fecal y 100 mL para la determinación de los parámetros fisicoquímicos, las cuales se colocaron en contenedores estériles de polipropileno con un prefiltrado por tamices

(Figura 7) de acero inoxidable de 106, 53 y 38 μm de porosidad (Cat. VWR 54334-476, 484 y 488 USA). Las muestras se tomaron a una distancia de 1-2 m de la orilla del agua y 10-20 cm bajo la superficie de ésta.

Figura 7. Toma de muestra y prefiltrado por tamices de acero inoxidable



Las muestras de agua se transportaron en hieleras a 4°C dentro de las primeras cinco horas de la toma de muestra y se almacenaron a la misma temperatura antes del análisis, el cual se realizó dentro de las primeras 24 h en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) A.C., Unidad Culiacán.

Concentración viral por ultrafiltración

La concentración viral comprende el proceso desde la llegada de la toma de muestra hasta su aplicación en procesos moleculares para la identificación viral. Esta etapa se dividió en seis pasos; (1) configuración del sistema de ultrafiltración

(SUF), describe como está conformado el sistema que se utilizó para la concentración del agua; (2) pretratamiento del filtro, con el fin de aumentar la eficiencia de recuperación viral; (3) filtración, proceso para concentrar la muestra de 20 L a 320 mL; (4) sanitización del filtro, para evitar posibles contaminaciones; (5) reconcentración, para disminuir el volumen de muestra y (6) purificación de la muestra, para evitar la presencia de contaminantes.

(1) *Configuración del sistema de Ultrafiltración.* El sistema de ultrafiltración está formado por dos reservorios (retenido y permeado), una bomba peristáltica, válvula de presión, sistema de tuberías, así como de un módulo de filtro.

Se utilizó una bomba peristáltica digital de velocidad variable tipo L/S (Masterflex: Cole Parment Instrument 7524-40 Co USA), con un cabezal #24 fabricado de polifenilsulfato, (Masterflex: Cole Parment Instrument 7024-52 Co USA) con tubería de neopreno #24, (Masterflex: Cole Palmer Instrument 6404-24 Co USA). Se utilizaron filtros de polisulfona para diálisis con un MWCO de 15000 a 20000, un área superficial de 1.8 m^2 y un diámetro de fibra interna de $200 \text{ }\mu\text{m}$ (Hemoflow F80A Fresenius Medical Care USA).

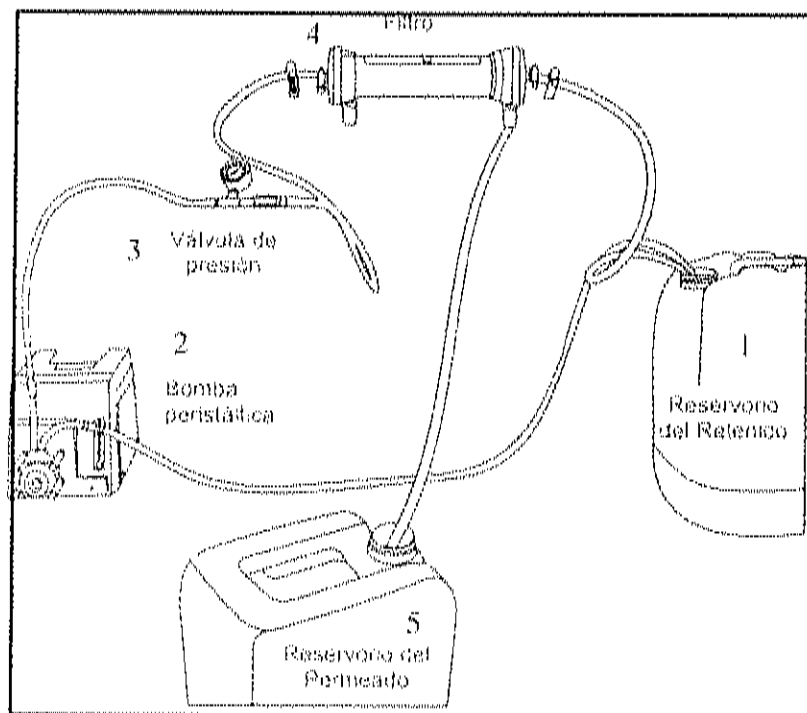
En la Figura 8 se muestran los componentes del SUF, el reservorio del retenido (1), contiene un sistema de tubería con una pipeta de 10-20 mL en su interior. La muestra de agua es presurizada del reservorio del retenido hacia el módulo del ultrafiltro (4), mediante una bomba peristáltica (2), donde el flujo es regulado con una

válvula de presión (3). La muestra es separada en el ultrafiltro en dos flujos, el retenido y el permeado (5). El permeado es el flujo que ha sido filtrado, donde se encuentran las partículas de menor tamaño a la MWCO especificado por la membrana, mientras que el retenido, es el flujo que contiene las partículas de mayor tamaño al MWCO del ultrafiltro, como los virus.

(2) *Pretratamiento del filtro.* El módulo del ultrafiltro de fibra hueca se pretrató, un día anterior a cada experimento, siguiendo la metodología descrita por Hill *et al.* (2005). Para ello, se abrió la parte de flujo de permeado del ultrafiltro, y se vació con un embudo de 200-250 mL de suero bovino (GIBCO Cat. 16170-078 USA) al 5%, se cerró el flujo de permeado del ultrafiltro y se incubó toda la noche a 4°C en un agitador orbital (VWR S-500 Cat. 14005-830 USA).

(3) *Procedimiento de filtración.* Seguido del pretratamiento, el módulo del ultrafiltro se montó en el SUF para completar el proceso de configuración e iniciar el proceso de concentración del agua, para lo cual se siguió la metodología descrita por Hill *et al.*, (2005), con ciertas modificaciones. Brevemente, se agregó polifosfato de sodio (NaPP) (Sigma Cat. 305553-25G) al 0.1% a la muestras de agua (20 L), se agitó por 5 min antes de proceder a filtrar la muestra (Anexo 1). El sistema se calibró para operar a un flujo de 1700 mL/min y de 15-20 psi. Se colocó la tubería en el interior del recipiente del retenido y se encendió la bomba peristáltica para filtrar sin flujo de permeado (sólo recirculación) por 10 min. Posteriormente, se abrió el flujo de permeado para concentrar la muestra.

Figura 8. Representación esquemática del sistema de ultrafiltración (SUF) de fibra hueca



Una vez que la muestra de agua (20 L) se concentró hasta un volumen de 170 mL (concentrado), se cerró el flujo de permeado y se retiró la tubería del reservorio del retenido, la cual, se colocó en 150 mL de Tween 80 (Sigma ultra Cat. P8074-100) al 0.01% (Anexo 1) y se recirculó por 10 min. Posteriormente se apagó la bomba peristáltica y el eluyente (150 mL) se mezcló con el concentrado (170 mL) para obtener un volumen de 320 mL de retenido.

(4) *Sanitización del filtro.* Después de cada experimento, el SUF se sanitizó de acuerdo a lo descrito por Morales-Morales *et al.* (2003). Para ello, se recirculó 500 mL de una solución de hipoclorito de sodio (200 mg/L) por 30 min. Posteriormente, se recirculó 500 mL de una solución de tiosulfato de sodio al 0.1% (Anexo 1) a través del filtro por 30 min. Las tuberías y abrazaderas se esterilizaron con autoclave a 121°C por 15 min antes y después de cada experimento.

(5) *Reconcentración de la muestra.* El retenido (320 mL) se reconcentró con polietilenglicol 8000 (Sigma Cat. 25322-68-3) al 12% y cloruro de sodio (NaCl) 0.8 M (Anexo 1). La mezcla se homogenizó por agitación por 30 min y se dejó precipitar toda la noche a 4°C. La solución se colocó en tubos cónicos de 50 mL (8 tubos con 40 mL cada uno) y se centrifugaron a 10,000 xg por 2 h a 4°C. El sobrenadante se descartó y la pastilla (8 tubos) se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés).

(6) *Purificación de la muestra.* La pastilla resuspendida en PBS (Anexo 1), se purificó con un volumen igual (1:1) de cloroformo/butanol (Anexo 1), se agitó por inversión aproximadamente 10 veces. Se centrifugó a 12,000 xg por 15 min a 4°C y la fase acuosa (donde se encontraban los virus), se retiró cuidadosamente (sin tocar la interfase), para un volumen final de 2 a 3 mL, el cual se utilizó para la extracción del material genético viral.

Identificación de los VHA y NV

Extracción del ARN viral. La extracción del ARN viral se realizó con el mini kit QIAamp para ARN viral (QIAGEN Cat. 52906 USA), como recomienda el fabricante (Anexo 3). Brevemente, se tomó un volumen de 140 μ L de la muestra purificada, obtenida en el proceso de concentración viral.

Se procedió a la lisis de la muestra, para ello se adicionó 560 μ l de amortiguador AVL conteniendo el ARN cargador dentro de un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL. El amortiguador AVL provee altas condiciones desnaturalizantes para la inactivación de ARNsas y asegura el aislamiento del ARN viral intacto.

La muestra junto con el amortiguador AVL se agitó en un vórtex por 15 s y se incubó a temperatura ambiente (15 a 25°C) por 10 min, para completar el proceso de lisis. Se retiró la muestra y se centrifugó a máxima velocidad para la remoción del sedimento dentro del tubo.

Se agregó 560 μ L de etanol (96-100%) a la muestra, se agitó en un vórtex por 15 s y se centrifugó rápidamente para la remoción del sedimento; el etanol purifica al ARN. De la solución obtenida, se agregó 630 μ L a la columna de QIAamp y se centrifugó a 6,000 xg por 1 min. Lo anterior se hizo por duplicado.

Una vez que se llevó a cabo la centrifugación, se abrió la tapa de la columna QIAamp y se agregó 500 μ L de amortiguador AW1, se cerró la tapa y se centrifugó a 6,000 xg por 1 min, la minicolumna se pasó a un tubo limpio y se descartó el filtrado. Se agregó 500 μ L de amortiguador AW2 y se centrifugó a 20,000 xg por 3 min. Los amortiguadores AW1 y AW2 purifican el ARN viral.

La minicolumna se pasó a un tubo limpio para microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min para la eliminación de los amortiguadores de lavado. La minicolumna se pasó a un tubo limpio de 1.5 mL y se agregó 40 μ L de amortiguador AVE, se equilibró a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 6000 xg por 1 min. Lo anterior se hizo por duplicado.

El procedimiento antes mencionado, permitió obtener el ARN viral purificado (80 μ L), necesario para los ensayos mediante RT-PCR. El ARN se alicuota en tubos para microcentrifuga de 200 μ L (30 μ L/tubo) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

RT-PCR. Para la identificación de los virus, se realizó la RT-PCR en una sola etapa, mediante el kit Access RT-PCR System (Promega Cat. A1250 USA), como recomienda el fabricante (Anexo 3), el cual provee una alta eficiencia y especificidad para ARN de cualquier origen.

Brevemente, se preparó la mezcla de reacción (Cuadro 3), se agregaron los reactivos necesarios para realizar la RT-PCR en una sola etapa, así como los

oligonucleótidos (sentido y antisentido) (Cuadros 4 y 5). La mezcla se homogenizó cuidadosamente por pipeteo antes de agregar las enzimas transcriptasa inversa AMV y ADN polimerasa *Tfi*. Se colocó 20 μL de mezcla maestra en tubos para PCR de 200 μL , en el caso de las muestras ambientales, los tubos de PCR contenían 30 μL del ARN molde para un volumen de reacción final de 50 μL . Para el control positivo, se colocó 20 μL de la mezcla, 29 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL del ARN control. Para el blanco se colocó 20 μL de la mezcla madre y 30 μL de agua libre de nucleasas.

Cuadro 3. Componentes para la reacción de RT-PCR

Componente	Volumen	Concentración final
Amortiguador de reacción AMV/ <i>Tfi</i> 5X	10 μl	1X
Mezcla de dNTP's (10 mM de cada dNTP)	1 μl	0.2 Mm
^a Primer sentido, 100 μM	1 μl	1 μM
^b Primer antisentido, 100 μM	1 μl	1 μM
MgSO ₄ , 25 mM	2 μl	1 mM
Transcriptasa inversa AMV (5 u/ μl)	1 μl	0.1 u/ μL
ADN polimerasa <i>Tfi</i> (5 u/ μl)	1 μl	0.1 u/ μL
ARN molde	variable	Variable
Agua libre de nucleasas al volumen final de	50 μl	1X

^{a,b} Oligonucleótidos 2949 y 3192 para el VHA; MJV12 y RegA para NV

Los tubos para PCR, se colocaron en el termociclador previamente programado con temperaturas y tiempos según las especificaciones del proveedor (Access RT-PCR System Promega), y temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos usados durante 40 ciclos (Cuadro 6).

Cuadro 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y PCR anidada de los virus de hepatitis A

Nombre	Región	Secuencia (5' - 3')	Posición genómica	Tamaño
^a 2949		TAT TTGTCTGTCACAGAACAA TCAG	2949	267 pb
^b 3192	VP1-	AGGAGGAGGTGGAAGCACTTCATTTGA	3192	
^c dAk24	2A	CTT CCT GAG CAT ACT TGA GTC	3166	200 pb
^d dAk24		CCA GAG CTC CAT TGA ACT C	2986	

^{a,b} Oligonucleótidos diseñados originalmente por Robertson *et al.* (1992), Norman *et al.* (1994);

^{c,d} Oligonucleótidos anidados diseñados por Kingsley and Richards (2001).

Cuadro 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y PCR semianidada de norovirus

Nombre	Región	Secuencia (5' - 3') ^c	Posición genómica	Tamaño
^a MJV12		TAY CAY TAT GAT GCH GAY TA	4553	327 pb
^b RegA	A	CTC RTC ATC ICC ATA RAA IGA	4859	
Mp290		GAY TAC TCY CSI TGG GAY TC		316 pb
^b RegA	CTC RTC ATC ICC ATA RAA IGA	4859		

^{a,b} Oligonucleótidos diseñados usando modificaciones de los oligonucleótidos JV12/JV13 por Vinjé and Sobsey (2003)

Cuadro 6. Condiciones de amplificación para la RT-PCR

Etapa	Temperatura (°C)/tiempo
Transcripción inversa	45°C/45 min
Inactivación de la RT AMV y desnaturalización de los oligonucleótidos ARN/ADNc	94°C /2 min
Desnaturalización	94°C /30 seg
ªAlineamiento	°C /1 min
Extensión	68°C /2 min
Extensión final	68°C /10 min
Espera	4°C /2 min

ªTemperatura de 60°C para los oligonucleótidos 2949 y 3192 y 50 C para MJV12 y RegA

PCR anidada y semianidada. Para la confirmación de los resultados e incremento de la sensibilidad, se realizó PCR anidada a los productos de RT-PCR de los virus de hepatitis A y PCR semianidada a norovirus (Anexo 6). Se utilizó el kit de PCR Core System (Promega Cat. M7660 USA), según las especificaciones del proveedor (Anexo 3). Brevemente, se agregó el amortiguador de reacción 10X con ADN polimerasa termofílica libre de MgCl₂, solución de MgCl₂ 25 mM, mezcla de nucleótidos, se homogenizó y se agregó la *Taq* ADN polimerasa. Se agregó 45 µL de la mezcla madre a cada uno de los tubos para PCR que contenían 5 µL del producto de RT-PCR en el caso de las muestras ambientales y 1 µL de producto de RT-PCR del control positivo y negativo. Los tubos para PCR se colocaron en el termociclador programado, durante 38 ciclos (Cuadro 8).

Cuadro 7. Componentes para la reacción de PCR

Componente	Volumen	Concentración final
Amortiguador de reacción 10X ADN polimerasa Termofílica libre de MgCl ₂	5 µl	1X
Solución MgCl ₂ , 25 mM	3 µL	1.5 mM
Mezcla de nucleótidos para PCR, 10 mM cada uno	1 µL	200 µM cada uno
^a Primer sentido, 50 µM	1 µL	0.1-1.0 µM
^b Primer antisentido, 50 µM	1 µL	0.1-1.0 µM
<i>Taq</i> ADN polimerasa	0.25 µL	1.25 u/50 µL
ADN molde	variable	<0.5 µg/50 µL
Agua libre de nucleasas al volumen final de	50 µL	

^{a,b}Oligonucleótidos dAk24 y dAk25 para el VHA; RegA y Mp290 para NV

Cuadro 8. Condiciones de amplificación para la PCR anidada y semianidada

Etapas	Temperatura (°C)/tiempo
Desnaturalización inicial	95°C/2 min
Desnaturalización	95°C /1 min
^a Alineamiento	°C /1 min
Extensión	72°C /2 min
Extensión final	72°C /5 min
Enfriamiento	4°C

^aTemperatura de 50°C para IdAk24 y dAk25 y 49°C para RegA y Mp290

Electroforesis en gel de agarosa. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador.

Se pesó 0.3 g de agarosa y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de amortiguador Tris Acetato EDTA (TAE) 1X, se disolvió mediante calentamiento en un horno de microondas (LG intelowave) por 30 s. Se mezcló hasta disolver completamente los cristales de agarosa, se dejó enfriar y se agregó 1 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) hasta homogenizar. El contenido se vació a la cámara previamente armada con empaques y peine.

La agarosa se dejó polimerizar por 20 min. Se retiró el peine del gel y se colocó sobre la cámara de electroforesis, cubriéndolo completamente con TAE 1X. Se cargó 10 μ L del producto de RT-PCR y/o PCR con 2 μ L de colorante de carga 6x Load dye ó azul de bromofenol en los pozos del gel. Se colocó 3 μ L del marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega Cat. G2101) como sugiere el proveedor, con 1 μ L de colorante de carga 6x load dye. Se programó la cámara electroforética a 75 volts de 30-45 min. Se procedió a la visualización de los fragmentos en un transiluminador. Se consideró como muestra positiva, aquella que amplificó mediante PCR un fragmento de 200 pb para el VHA y 316 pb para NV (Anexo 6).

Genotipificación

Secuenciación

Aislamiento de los productos de PCR. El aislamiento de los productos de PCR de los VHA y NV, se realizó con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA), con las especificaciones descritas por el proveedor. Brevemente, una vez observados los fragmentos amplificados en el transiluminador, se cortó la banda (200 pb para VHA y 316 pb para NV) conteniendo el ADN con un cúter estéril y se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL previamente pesado. Se agregó la solución de unión a la membrana (10 μ L por cada 10 mg de gel). La solución se mezcló con el gel por agitación en vórtex y se incubó a 65°C por 10 min, mediante agitaciones en vórtex cada 3 min. La mezcla ya disuelta se paso a la minicolumna SV colocada en un tubo de recolección. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min, y se centrifugó a 16,000 xg por 1 min. Se descartó el filtrado y se reinsertó la minicolumna SV en el tubo de recolección.

Se agregó 700 μ L de solución de lavado de la membrana y se centrifugó a 16,000 xg por 1 min, se descartó el filtrado y se reinsertó la minicolumna en el tubo de recolección, lo anterior se realizó dos veces, pero la segunda vez con 500 μ L de la solución de lavado y se centrifugó por 5 min. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 min y la membrana se dejó secar al aire por 10 min para la eliminación del etanol. La minicolumna se paso a un tubo de limpio para microcentrifuga de 1.5 mL, se agregó 500

μL de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Se descartó la minicolumna y el ADN se almacenó a -20°C hasta su uso. Para observar la integridad de los productos de PCR purificados, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%, cargando 3 μL del ADN purificado con 1 μL del colorante de carga. Si el fragmento se visualizaba, el producto purificado era apto para secuenciación, según las condiciones descritas por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Electroforesis capilar. La secuenciación de los productos de PCR purificados, se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en el Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Análisis de las secuencias. Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la comparación y búsqueda de homologías de las secuencias de interés, contra secuencias previamente caracterizadas que se encuentran en la bases de datos del NCBI (The National Center for Biotechnology Information) y de esta manera determinar la autenticidad de las cepas aisladas.

Análisis Filogenético

Alineamiento múltiple. Se realizó una búsqueda (por nombre o número de acceso) en el banco de genes de las secuencias de las cepas representativas de cada subgenotipo

para los VHA (Cuadro 9, Anexo 7), y genotipo para NV (Cuadro 10). Las secuencias se alinearon usando el software BioEdit (Hall, 1999).

Árbol filogenético. Para la deducción del genogrupo y genotipo para NV y genotipo y sub genotipo de los VHA aislados, se realizó un árbol filogenético. Para ello, el alineamiento múltiple realizado con el software BioEdit, se importó al paquete Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), usando el método Neighbor-Joining y el modelo de dos parámetros de Kimura, disponible en internet (<http://www.megasoftware.net/>).

Cuadro 9. Secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple de los VHA

Nombre	No. de acceso	Genotipo	Subgenotipo
HM175	M14707		
MBB	M20273		B
CR326	M10033	I	
FH2	AB020568		A
GBM	X75215		
CF-53/Berne	AY644676	II	
PA21	M34084		
GA76	M66695		A
M-25	L20544	III	
A-229	L20532		B
CY-145	M59286	IV	
AGM-27	D00926	V	
JM-55	L07731	VI	
SLF-88	AY032861	VII	

Cuadro 10. Secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple de NV

Nombre	No. de acceso	Genogrupo	Genotipo	
Norwalk	M87661	I	1	
Southampton	L07418		2	
Hawaii	U07611	II	1	
Mexico	U22498		3	
Toronto	U02030		4	
Lordsdale	X86557		4	
Farmington	AY502023		4	
Camberwell	AF155896		4	
MD145	AY032605		4	
Bristol	X76716		4	
Bovine calicivirus	AJ011099		III	
Fort Lauderdale	AF414426		IV	
Murine norovirus	AY228235	V		

Eficiencia de Recuperación del Sistema de Ultrafiltración

En el presente estudio, se utilizó el fago MS2 para evaluar la eficiencia de recuperación del SUF, debido a dos principales factores, presenta características morfológicas similares a las de los virus de hepatitis A y norovirus; como forma icosaédrica, genoma de ARN de cadena sencilla sin envoltura, tamaño de 26 nm de diámetro. Además, puede ser cuantificado de una manera rápida, económica y sencilla mediante la técnica de doble agar (Prescott *et al.*, 2002).

El proceso para evaluar la eficiencia de recuperación inició con la toma de muestra del agua estuarina, lo cual se describe en la sección de detección de virus de hepatitis A y norovirus. Una vez que los 20 L de agua estuarina se trasladaron al LMAA de CIAD, Cullacán, se inició el procesamiento de la muestra.

En seis ocasiones diferentes se inocularon 10 mL del fago MS2 (ATCC 15597-B1), a una concentración de 10^6 a 10^7 UFP/mL, a 20 L de agua estuarina proveniente del Complejo Lagunar, se agitó manualmente para homogenizar. La muestra se concentró utilizando el SUF hasta 320 mL. Se tomó una alícuota de 5 mL del inoculado y 5 mL del retenido, de cada experimento para la realización de ensayos de placa.

Las alícuotas se usaron para la realización de la metodología 9211 D para detección de colifagos, el cual es un método cuantitativo basado en ensayos de placa. Este método, consiste en vaciar un agar líquido (sobrecapa) que contiene a la bacteria y a la dilución del fago (realizada con las alícuotas), sobre un agar sólido (APHA, 1998).

El agar de sobrecapa se preparó con caldo soya tripticaseína (TSB) (BD Bioxon 211670, México), además de 1% de agar bacteriológico (BD Bioxon 215000, México). El agar sólido se preparó con agar soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxon 210800, México). La preparación de los medios, se muestra en el Anexo 2.

Brevemente, se vaciaron 3 mL de agar de sobrecapa a tubos de ensayo, donde se usó un tubo para cada una de las diluciones seriales del fago. Para las diluciones

seriales, se tomó 1 mL de la alícuota de la muestra concentrada (retenido y permeado) y se colocó en 9 mL de PBS (Anexo 1), obteniendo una dilución 1:10. A partir de esta dilución se hicieron las diluciones seriales. Todos los tubos de ensayo se rotularon con la dilución correspondiente.

Se tomó 5 mL de TSB (sin agar), y se inoculó una colonia de *E. coli* (ATCC 7301), se dejó incubar a 37°C toda la noche. Posteriormente, se tomó 1 mL del medio TSB conteniendo a la bacteria, y se colocó en 50 mL de medio TSB, el cual, se colocó en un baño de agua a 37°C con agitación por 3 h ($DO_{660}=1$) para permitir que la bacteria alcanzará la fase logarítmica.

Una vez que se tenían listos los tubos de ensayo con PBS y la dilución del fago, se rotularon las cajas con medio TSA con la dilución correspondiente. Se colocaron los tubos de ensayo con medio TSB en baño de agua para derretir el agar, cuando este ya no tenía grumos y se encontró a una temperatura aproximada de 42°C, se le colocó 1 mL de la bacteria y 0.1 mL de la dilución del fago, se agitó con vórtex y se vació sobre el agar sólido (TSA), se expandió por toda la caja y se eliminaron las burbujas. Por último, las cajas se incubaron a 37°C por 24 h, para observar el lisado de las células. Los resultados se expresan en UFP/mL, donde, cada unidad formadora de placa (UFP) corresponde a un fago (APHA, 1998). Los cálculos para obtener el % de recuperación, se basan en los métodos para virología de la USEPA (2001), donde la concentración del fago en la muestra de agua (C_b), se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_b = (C_a \times V_a / V_b)$$

Donde, C_a es la concentración del fago en el material concentrado en UFP/mL, V_a es el volumen de material analizado en mL y V_b es el volumen del agua procesada en L. C_a se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$C_a = P \times 10 \times D \text{ en UFP/mL}$$

Donde P , es el número total de placas contadas en las cajas y D es el recíproco de la dilución realizada del inóculo antes de colocarla en las cajas ($D=1$ para muestras no diluidas). El factor 10 se utiliza dado que se colocó 0.1 mL de la dilución del fago y los resultados están expresados en UFP/mL.

De esta manera, el % de recuperación es calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = (C_b / C_a) \times 100$$

Parámetros Físicoquímicos

La temperatura, pH, salinidad y turbidez se evaluaron como variables predictivas respecto a la presencia de los patógenos. La temperatura y el pH de las muestras de agua, se evaluaron en el momento y lugar de las tomas de muestras. Para ello, se usó un termómetro de mercurio 81 Total inmersión (TAYLOR 6335 SAMA CT25 México) y un pHTestr 3+ waterproof double junction (Eutech instruments Cat. 4133N45). La salinidad y la turbidez se determinaron un día posterior a las tomas de muestras,

utilizando un Salinitest H198203 Salinity concentration Pocket-sized meter, y cuando fue necesario un Espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 220 (Australia) en modalidad flama; para la turbidez se utilizó un turbidímetro 2100 P HACH, respectivamente. Los equipos utilizados, se calibraron antes de cada medición según las especificaciones del proveedor.

Indicadores de Contaminación Fecal

Se identificó y enumeró a *E. coli* y coliformes fecales en las muestras de agua estuarina, mediante el procedimiento estándar 9222 B de filtración por membrana para coliformes totales (APHA, 1998). Para ello, se tomó 300 mL del agua estuarina y se colocó en frascos de polipropileno de 500 mL que contenían 1 mL de tiosulfato de sodio al 10%, con el propósito de inhibir el cloro que pudiera tener la muestra, la cual se trasladó en hielo (4°C) al LMAA para su procesamiento.

Se rotuló con el volumen seleccionado de la muestra a procesar (1 mL), las cajas petri que contenían el medio selectivo CHROMagar (Paris, Francia). Se montó el tren de filtración en un ambiente estéril (con mecheros encendidos), se conectó la manguera saliente de la bomba de vacío con el vástago del matraz kitazato. Se esterilizó la punta plana de la pinza, impregnándola con alcohol al 70% y quemándola al mechero, se dejó enfriar antes de ser usada.

Se tomó una membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm de porosidad y 47 mm de diámetro, con la pinza, cuidando de no tocarla con las manos u otro objeto, se levantó cuidadosamente el cuerpo del embudo, y se colocó la membrana sobre la base (con la cuadrícula hacia arriba), se dejó caer ligeramente el cuerpo del embudo sobre la base.

La muestra de agua se agitó vigorosamente y se vertió 1 mL de la muestra de agua homogenizada sobre el embudo de filtración. Se encendió la bomba de vacío y se llevó a cabo el proceso de filtración. Se esterilizó la pinza, se levantó cuidadosamente el cuerpo del embudo y se retiró con cuidado la membrana. Se abrió la caja correspondiente (cajas petri sin división 60 mm x 15 mm) y se colocó sobre el medio de cultivo selectivo cromogénico, con movimiento hacia arriba y abajo, para asegurar que no quedaran burbujas de aire entre el medio y la membrana. Las muestras se analizaron por duplicado, filtrándolas en el mismo embudo. Las cajas se colocaron de manera invertida y se incubaron a 42°C por 24 h.

Para realizar el conteo de las unidades formadoras de colonia sobre la superficie de la membrana filtrada, se utilizó un cuenta colonias. La identificación de las colonias se basa en un método colorimétrico. El reactivo utilizado (ECC CHROMagar) contiene tergitol, el cual inhibe las bacterias Gram positivas así como algunas Gram negativas y otros coliformes. La mezcla contiene dos substratos cromogénicos, Salmon-GAL y X-glucoronide. La enzima β -D galactosidasa producida por los coliformes se une a Salmon-GAL, resultando la coloración roja, mientras que la enzima β -D glucoronidasa

producida por *E. coli* se une a X-glucoronide o Salmon GAL formando colonias azul-violeta oscuro (Anónimo, 2007).

El número de colonias se calculó en base a la siguiente ecuación:

Coliformes Fecales/*E. coli* = (colonias contadas x100)/ mL de la muestra filtrada

Análisis Estadístico

Los datos se almacenaron en una tabla de Excel 2002, donde se realizaron las Figuras correspondientes (Anexos 5-8). Los datos se exportaron al programan Minitab versión 14 y SPSS versión 13 para el análisis estadístico de los datos. Se calcularon estadísticos descriptivos (media y desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos y los niveles de los indicadores de contaminación fecal mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Los valores se compararon con los tiempos de muestreo realizados. En caso de observarse que algún parámetro era significativo en los tiempos de muestreo, se realizaron pruebas de comparación múltiple ajustadas por Tukey para establecer el período que era significativo.

Se comparó la presencia de los patógenos e indicadores de contaminación fecal entre los tiempos de muestreo usando una prueba ji-cuadrada. Para modelar la relación entre la presencia de los patógenos y las posibles variables predictivas (Indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos), se realizó regresión logística binaria

(RLB) a pasos y se calculó el estimador de la Razón de Momios (RM). En todas las pruebas estadísticas se utilizó un nivel de significancia del 5%.

La RLB, es un modelo estadístico utilizado en los análisis de datos epidemiológicos. Describe la relación entre diversas variables de interés, respecto a una variable dicotómica, es decir, sólo puede tomar dos posibles valores (Sí-No, 0-1, verdadero-falso, etc.) (Kleinbaum y Klein, 2002).

$$P(y=1/\mathbf{X}) = \frac{1}{1 + e^{-\left(\beta_0 + \sum \beta_j X_j\right)}}$$

Los coeficientes del modelo de regresión logística binaria se interpretan en función de la Razón de Momios (RM). Cuando se hace referencia al incremento unitario en una de las variables explicativas del modelo, aparece el concepto de Razón de Momios (*odds-ratio*, en inglés) como el cociente entre los dos momios asociados (el obtenido tras realizar el incremento y el anterior al mismo). La Razón de Momios (RM) es la única medida de asociación directamente estimada del modelo logístico (Kleinbaum y Klein, 2002). En este tipo de modelos no resulta posible interpretar directamente las estimaciones de los parámetros β , ya que son modelos no lineales. Para ello, se toma en cuenta el signo de los estimadores (RM). Si el estimador es positivo, significará que incrementos en la variable asociada causan incrementos en $P(Y=1)$. Por lo contrario, si el estimador muestra un signo negativo, ello supondrá que incrementos en la variable asociada causarán disminuciones en $P(Y=1)$ (UOC, 2007).

Detección de virus de hepatitis A y norovirus mediante ultrafiltración en agua del
Complejo Lagunar Huizache Calmanero, Sinaloa, Mexico

Joane Hernández – Morga¹, Josefina León – Félix¹, Felipe Peraza - Garay², Bruno
Gómez -Gil ¹ y Cristobal Cháidez-Quíroz^{1*}

*Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo¹ y Universidad Autonoma de
Sinaloa²*

* Autor para correspondencia. Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo, Unidad Culiacan, Carretera a Eldorado Km. 5.5, apartado postal 32 – A, Culiacan, Sinaloa, Mexico. C.P. 80129. Teléfono: 01152 (667) 760 – 5536. Fax: (667) 760 – 5537. E-mail:chaqui@ciad.edu.mx

Resumen

El Complejo Lagunar Huizache Caimanero (CLHC) se localiza en el sureste de Sinaloa y es uno de los sistemas costeros de mayor extensión y productividad de especies marinas en el Pacífico mexicano. Se investigó el empleo de la ultrafiltración como método para la concentración de virus en agua estuarina del CLHC. La recuperación de virus inoculados en agua estuarina fue del 95.8%. Se determinó la presencia de virus entéricos en cinco puntos del Complejo Lagunar de septiembre 2006 a abril 2007. Aunado a ello, los indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos se evaluaron como variables predictivas respecto a la presencia de los virus. La presencia simultánea de ambos virus (hepatitis A y norovirus), se encontró en el 57.5% de las muestras analizadas, donde el virus de hepatitis A (VHA) se encontró en el 80% de las muestras, mientras que norovirus (NV) se aisló en el 70%. Ambos virus se aislaron más frecuentemente en primavera ($P < 0.05$) que en otros períodos evaluados. El análisis filogenético mostró la presencia del subgenotipo IB para las cepas de los VHA aisladas y dos cluster del GI (GI.4 y probablemente un nuevo genotipo) para NV, ambos patógenos al humano. Los coliformes fecales se aislaron en el 48.57% de las muestras, mientras que *Escherichia coli* (*E. coli*) se encontró en el 34.28%. El análisis de regresión logística binaria mostró que el pH ($P = 0.03$) se asoció positivamente con la presencia de los VHA con una razón de momios (RM) de 14.3. No se encontró relación entre la presencia de los virus y los coliformes fecales o *E. coli* en las muestras analizadas. Los resultados obtenidos muestran que el agua del Huizache Caimanero está contaminada por desechos que contienen heces humanas, además la

ineficiente predictividad viral de los indicadores de contaminación fecal. Finalmente, los resultados obtenidos sugieren la importancia de contar con métodos con una alta eficiencia de recuperación para la concentración y monitoreo de virus en aguas dedicadas al cultivo de especies marinas.

Abstract

The use of ultrafiltration as a concentration method to recover viruses from estuarine water samples of the Huizache Caimanero lagunary complex was investigated. Recovery of seeded viruses in estuarine water were 95.8%. The Huizache Caimanero on the southern of Sinaloa is one of the most important and productive systems of shrimp fishery in the Pacific coast of Mexico. The presence of enteric viruses were investigated in five sites from september 2006 to april 2007. In addition, bacterial indicators and physicochemical parameters were evaluated like a predictive variables for the presence of enteric viruses. Altogether, 57% of the samples were positive for hepatitis A (HAV) virus and noroviruses (NV); 80% were positive for hepatitis A and 70% contained noroviruses. Both viruses were isolated more frequently during spring ($P<0.05$) than other sampling periods. Phylogenetic analysis shown the presence of sub genotype IB for HAV and GI1 for NV. Fecal coliforms were isolated in 48.57% of the samples, while *Escherichia coli* (*E. coli*) were found in 34.28%. Binary logistic regression showed that pH ($P=0.03$) was positively associated with HAV presence with 14.3 odds ratio (OR). There were no significant relationships between the concentration or presence for fecal coliforms and *E. coli* and the virus in the samples analyzed. The

obtained results indicate that the Huizache Caimanero waters are impacted by human fecal pollution and the inadequacy of bacteriological indicators to predict the viral contamination. Finally, the results suggest the importance of the use of methods with a high viral recovery to monitoring waters and offer a microbiological safety for humans.

Introducción

La pesca de camarón es una importante actividad económica, ya que genera sesenta mil empleos directos en México, quien ocupa el quinto lugar en la producción del crustáceo en el mundo (SAGARPA, 2003). En el 2003, la captura nacional de camarón fue de 109,685 t, de las cuales 86,111 t se obtuvieron del litoral del Pacífico donde Sonora y Sinaloa contribuyeron con el 80% de las capturas (CONAPESCA, 2003). Uno de los sistemas costeros de mayor extensión y productividad en el Pacífico mexicano, localizado al sur de Sinaloa, es el Complejo Lagunar Huizache Caimanero (CLHC), dedicado al cultivo y comercialización de especies marinas, principalmente de camarón, cuyo cultivo constituye el 80% de la producción nacional en materia acuícola (SAGARPA, 2005).

El camarón proveniente del Complejo Lagunar se usa para abastecer el mercado nacional e internacional, por lo que la contaminación de éste por diversos microorganismos patógenos lo convierte en fuente importante de estudios microbiológicos. Los productos de mar se almacenan en aguas que pueden contener virus provenientes de los desechos; los virus se concentran dentro de los productos de mar donde pueden ser retenidos por algún tiempo (Carter, 2005). En el agua y

sedimento del CLHC, la vigilancia microbiológica está dirigida a la identificación y cuantificación de indicadores de contaminación fecal (Galindo *et al.*, 1997), los cuales no siempre reflejan la presencia de patógenos. Durante el 2003 y finales del 2004, el *Vibrio parahaemolyticus* (gen *tlh* y *tdh*) provocó más de 1,230 casos de gastroenteritis al sur de Sinaloa, todos se atribuyeron al consumo de camarón crudo o insuficientemente cocido proveniente del Complejo Lagunar (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006), estableciéndose una veda precautoria, lo cual afectó socio económicamente a la población cercana. Por lo anterior, el gobierno de Sinaloa decide implementar un programa de monitoreo para evaluar la calidad microbiológica del agua del Complejo Lagunar.

En México no se cuenta con valores de referencia de calidad del agua con carácter legal para evaluar el ambiente en zonas costeras (SAGARPA, 2006), sin embargo existen Criterios Ecológicos para evaluar la calidad del agua según su uso. Para el agua dedicada a la protección de la vida acuática, la calidad microbiológica está dirigida a la cuantificación de <230 UFC/100 mL coliformes fecales de (CE-CCA-001/89). Los estándares de La Unión Europea, también utilizan a los coliformes fecales (<300 UFC/100 mL) y *E. coli* (<230 UFC/100 mL) para evaluar la calidad microbiológica del agua (Anonymous, 1979). Los indicadores bacterianos son ineficientes en predecir la presencia de virus en agua, sin embargo su uso es común debido a la facilidad y bajo costo de las metodologías empleadas (Guyader *et al.*, 1996; Griffin *et al.*, 1999; Romalde *et al.*, 2001; Borchardt *et al.*, 2004).

Los principales causantes de enfermedades diarreicas de etiología viral son los virus de hepatitis A y norovirus, los cuales están relacionados con el consumo de

productos de mar que se encuentran en aguas contaminadas por aguas residuales no tratadas o con tratamiento deficiente; por actividades de agricultura, minería e industria; o por poblaciones costeras (Sánchez *et al.*, 2002; Atmar *et al.*, 1995; FAO, 2004; Vidal *et al.*, 2006; Myrmei *et al.*, 2004). Los virus ingresan al agua en grandes cantidades y comienzan a diluirse rápidamente, lo que hace necesario la aplicación de métodos de concentración eficientes. El método estándar (adsorción-elución) para la concentración viral, se basa en manipular el pH de la muestra y de la superficie viral (APHA, 1998), por lo que dependiendo del tipo de virus y la calidad fisicoquímica del agua, el método presenta variaciones en la recuperación de los microorganismos (Gersberg *et al.*, 2006).

Una alternativa al método de adsorción-elución es la ultrafiltración (UF), cuya eficiencia de recuperación se ha demostrado ampliamente *in vitro*, alcanzando porcentajes de recuperación mayores al 60% para bacterias, protozoarios y virus (Hill *et al.*, 2005; Olszewisky *et al.*, 2005; Morales-Morales *et al.*, 2003; Winona *et al.*, 2001). El método concentra por exclusión de tamaño, utilizando filtros de poro de 0.02 a 0.1 μm , donde un flujo presurizado se pasa a través de una membrana semipermeable, dividiendo la muestra en el filtrado (permeado), que contiene iones y agua, y el concentrado (retenido), que retiene a los microorganismos de interés (Caballero *et al.*, 2003).

El presente estudio tuvo como objetivos determinar la eficiencia de recuperación del sistema de ultrafiltración y acoplarlo en la concentración e identificación por RT-PCR de los virus de hepatitis A y norovirus en agua del Complejo Lagunar Huizache-Caimanero; así como analizar la relación entre la presencia de los virus respecto a la presencia de indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos.

Materiales y Métodos

Lugar y toma de muestra. Las muestras se obtuvieron de cinco puntos fijos de pesca del Complejo Lagunar Huizache-Caimanero; el cual está ubicado a 25 km de Mazatlán, Sinaloa, México, entre los 22°50'-23°05'N y 105°55'-106°15'O (Figura 1). El Complejo Lagunar tiene un área superficial de 17.5 km² y una profundidad promedio de 1.2 m. Se conecta con dos ríos; el río Presidio al norte y Baluarte al sur (Zetina-Rejón *et al.*, 2002). Se tomaron cuarenta muestras de agua estuarina con una periodicidad mensual entre septiembre 2006 y abril 2007. Las muestras previamente filtradas por cedazos de acero inoxidable de 106, 53 y 38 µm, se colocaron en contenedores de polipropileno estériles de 20 L y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

Parámetros físicoquímicos. La temperatura (termómetro calibrado) y el pH se evaluaron al momento de las tomas de muestras de agua. La salinidad (Espectrofotómetro de absorción atómica) y la turbidez (2100 P Turbidimeter HACH), se determinaron 16 h posterior a las tomas de muestras.

Concentración de las muestras de agua mediante el sistema de ultrafiltración (SUF). El sistema de filtración utilizado para concentrar las muestras de agua se muestra en la Figura 2. Las muestras (20 L) se concentraron a 320 mL según lo reportado por Hill *et al.* (2005). Se emplearon filtros de polisulfona para diálisis, MWCO de 15,000 a 20,000, área superficial de 1.8 m² y diámetro de fibra interna de 200 µm

(Hemoflow F80A Fresenius Medical Care). El SUF se calibró para operar a un flujo de 1,700 mL/min y de 15-20 psi. Los filtros se pretrataron con 250 mL de suero bovino al 5%, incubándolos en agitación constante a 4°C durante toda la noche. Las muestras de agua (20 L) se trataron con polifosfato de sodio (NaPP) al 0.01% y se mezclaron manualmente. Las muestras se recircularon sin flujo de permeado durante 10 min por el sistema de ultrafiltración (SUF), obteniéndose un concentrado de 170 mL. Se retiró el concentrado, se agregó 150 mL del eluyente Tween 80 al 0.01% y se recirculó sin flujo de permeado por 10 min. El eluyente (150 mL) se mezcló con el concentrado (170 mL), para obtener un volumen final de retenido de 320 mL.

Reconcentración y extracción de ARN. La solución del retenido se precipitó con polietilenglicol (PEG) 8,000 al 12% y NaCl 0.8 M toda la noche a 4°C. La solución se centrifugó a 10,000 X g por 2 h a 4°C, el sedimento se resuspendió en 5 mL de PBS. Se agregaron 5 mL de solución cloroformo/butanol (1:1) y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Se usaron 140 µL de la fase acuosa para la extracción del ARN, empleando el mini kit QIAamp (QIAGEN Cat. 52906 USA). El volumen final obtenido de 80 µL, se almacenó a -70°C hasta su uso.

Controles positivos. Se utilizaron las cepas ATCC 15597-B1 del bacteriófago MS2, y ATCC 1701 de *E. coli* como hospedero. Para los VHA, se empleó la cepa ATCC VR1402 y para NV se utilizaron heces humanas infectadas en una epidemia ocurrida en un crucero. Para la obtención de los stocks de norovirus, las heces se diluyeron en PBS (1:10), se centrifugaron a 16,200 X g por 20 min, el sobrenadante se utilizó para la

extracción del ARN viral. Las cepas se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Arizona, a cargo del Dr. Charles Gerba.

Análisis por RT-PCR. Para la identificación de los virus de hepatitis A y norovirus se realizó la técnica de RT-PCR empleando el kit Access RT-PCR System (Promega Cat. A1250 USA). Para los VHA, se usaron los oligonucleótidos descritos por Robertson et al., (1992); en sentido (+) 2949 (5'-TAT TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA G-3'); y antisentido (-) 3192 (5'-AGG AGG AGG TGG AAG CAC TTC ATT TGA-3') que amplifican un fragmento de 267 pb. Las condiciones de amplificación para la RT-PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito por Kingsley y Richards (2001). Para la confirmación de los resultados e incremento de la sensibilidad, se utilizó una PCR anidada utilizando el kit PCR Core System (Promega Cat. M7660 USA) empleando como molde 1 µL del producto de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados por Kingsley y Richards (2001), dKA24 (5'-CTT CCT GAG CAT ACT TGA GTC-3') y dKA25 (5'-CCA GAG CTC CAT TGA ACT C-3') que amplifican un fragmento de 200 pb de la región VP1-2A.

Para identificar NV, la RT-PCR se realizó según las condiciones descritas por Vinjé et al. (2003), utilizando los oligonucleótidos MJV12 (5'-TAY CAY TAT GAT GCH GAY TA-3') y RegA (5'-CTC RTC ATC ICC ATA RAA IGA-3') que amplifican un fragmento de 327 pb, modificando la temperatura de alineamiento a 50°C. Para la confirmación de los resultados e incremento de la sensibilidad, se realizó una PCR semianidada con los oligonucleótidos Reg A y Mp 290 (5'-GAY TAC TCY CSI TGG

GAY TC-3') que amplifican un fragmento de 316 pb de la región A. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Secuenciación. Los fragmentos amplificados de 200 pb para VHA y 316 pb para NV se purificaron usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Cat. A9281 USA) y se secuenciaron mediante un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las secuencias de nucleótidos de los VHA y NV se analizaron usando el sistema BLAST, y se identificaron basados en la similitud con las secuencias ya reportadas en la base de datos del banco de genes.

Análisis filogenético. Las secuencias obtenidas de los VHA y NV, se alinearon con el paquete BioEdit (Hall, 1999). Para los VHA, se utilizaron secuencias de los genotipos de la región VP1/2A: Cepas del genotipo I (HM175 M14707, MBB M20273, CR326 AY644676, FH2 AB020568 y GBM X75215), genotipo II (CF-53 Berne AY644676), genotipo III (PA21 M34084, GA76 M66695, M-25 L20544, A-229 L20532), genotipo IV (CY-145 M59286), genotipo V (AGM27 D00926), genotipo VI (JM-55 L07731) y genotipo VII (SLF-88 AY032861). Para NV, se utilizaron secuencias de la región A: Cepas del genogrupo I (Norwalk M87661, Southampton L07418), genogrupo II (Hawai U07611, Mexico U22498, Toronto U02030, Lordsdale X86557, Farmington AY502023, Camberwell AF155896, MD145 AY032605, Bristol X76716), genogrupo III (Bovine calicivirus AJ011099), genogrupo IV (Fort Laurdale AF414426) y genogrupo V (Muribe AY228235). Los alineamientos se importaron al paquete Mega versión 3.1 para la

construcción del árbol filogenético, usando el método Neighbor-Joining y el modelo de dos parámetros de Kimura (Kumar *et al.* 2004).

Indicadores de contaminación fecal. Para identificar y enumerar los coliformes fecales y *E. coli* se tomaron 500 mL de agua de cada uno de los puntos de tomas de muestras. Las muestras de agua se colocaron en contenedores de polipropileno estériles y se procesaron dentro de las primeras 16 h. Un mililitro de cada muestra se filtró a través de un tren de filtración conteniendo membranas de 0.45 μm (APHA, 1998). La membrana se colocó sobre una caja petri con agar cromogénico (CHROMagar ECC) específico para la identificación simultánea de coliformes fecales y *E. coli*.

Eficiencia de recuperación del SUF. Se inocularon 10 mL del bacteriófago MS2 a una concentración de 10^5 a 10^7 UFP/mL a 20 L de agua proveniente del Complejo Lagunar, y se agitó manualmente por 5 min. El agua se hizo pasar a través del SUF, para obtener un concentrado de 320 mL, se tomaron 5 mL de la muestra inoculada y 5 mL del retenido para cuantificar los niveles del MS2. El bacteriófago MS2 se cuantificó empleando el método de doble agar (DAL) para detección de colifagos, utilizando a *E. coli* como hospedero (Método 9211 D, APHA 1998). La eficiencia de recuperación se calculó en base lo establecido por la USEPA (2001):

% Recuperación = (No total de MS2 en el retenido/ No total de MS2 en el inoculado) X 100, en UFP/mL

Análisis Estadístico. Se utilizaron los programas Minitab versión 14 y SPSS versión 13. Se calcularon estadísticos descriptivos y se compararon los tiempos de muestreo para los parámetros fisicoquímicos y para los niveles de los indicadores de contaminación fecal mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Adicionalmente, se utilizaron pruebas de comparación múltiple ajustadas por Tukey cuando fue necesario. Se comparó la presencia de los patógenos e indicadores de contaminación fecal entre los tiempos de muestreo usando una prueba ji-cuadrada. Para modelar la relación entre la presencia de los patógenos y las posibles variables predictivas (indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos), se realizó regresión logística binaria (RLB) a pasos y se calculó el estimador de la razón de momios (RM). En todas las pruebas estadísticas usamos un nivel de significancia del 5%.

Resultados

Eficiencia de recuperación del SUF. Para calcular la eficiencia de recuperación del SUF, seis muestras de agua estuarina se inocularon con concentraciones conocidas del bacteriófago MS2, y la concentración del fago se cuantificó mediante la técnica del doble agar. La media del porcentaje de recuperación fue del 95.8% con una desviación estándar de $\pm 22.36\%$.

Presencia de los virus entéricos. La presencia de los VHA y NV fue significativa ($P < 0.05$) respecto a los períodos de muestreo evaluados (Cuadro 2). En un total de 37 de 40 (92.5%) de las muestras se encontró la presencia de alguno de los virus. Los

VHA se identificaron en 32 de 40 (80%) muestras, mientras que la presencia de norovirus se confirmó en 28 de 40 (70%) muestras de agua (Cuadro 2). La presencia simultánea de ambos virus se observó en el 57.5% de las muestras. Los VHA se aislaron en menor frecuencia en octubre (2 de 5; 40%) y los norovirus en enero (1 de 5; 20%) que en otros meses (Figura 3). Cuando el análisis se diseñó para los diferentes puntos de muestreo, NV fue igual o menos frecuentemente aislado que los VHA (Figura 4). No existió diferencia significativa entre la presencia de los VHA ($\chi^2=0.71$; $P=0.64$) y NV ($\chi^2=2.36$; $P=0.95$) respecto a los puntos de muestreo analizados.

Secuenciación y análisis filogenético de los VHA y NV. Para determinar la fuente de contaminación viral, un total de 21 de 32 (65.62%) de las muestras positivas para los VHA se secuenciaron. La búsqueda en el BLAST mostró que las secuencias fueron similares con otras cepas reportadas en la base de datos del banco de genes, presentando una homología del 96 al 100% con cepas con nos. de acceso DQ452797, DQ198363 y AF538726, aisladas en Mozambique y Brazil. El análisis filogenético de la región VP1/2A mostró que las cepas aisladas de los VHA identificadas en agua del Huizache Caimanero se agruparon en un solo genotipo I, y subgenotipo B (Figura 5). La homología entre los nucleótidos de las cepas aisladas y la cepa HM175 representativa del subgenotipo IB fue del 96% al 99%.

Para NV, 13 de 28 (46.42%) de las muestras se secuenciaron. La búsqueda en el BLAST mostró una fuerte homología (97-99%) entre las cepas aisladas del Huizache Caimanero con otras cepas reportadas en el banco de genes con nos. de acceso EF529742, EF200697, DQ078801 aisladas en Francia, Alemania y Australia,

respectivamente. El análisis filogenético mostró dos cluster del genogrupo II (GII) para NV, el primer cluster se identificó como el genotipo GII.4 y la homología entre las cepas aisladas y la cepa perteneciente al GII.4 Farmington (no. acceso AY502023) fue del 95%. En el segundo cluster no se definió el genotipo (Figura 6).

Calidad microbiológica del agua. Se evaluaron dos indicadores (coliformes fecales y *E. coli*) de contaminación fecal de cada uno de los puntos de muestreo (Figura 3). Los coliformes fecales se identificaron en 17 de 35 (48.57%) muestras, mientras que *E. coli* se identificó en 12 de 35 (34.28%) muestras, con periodos de muestreo significativos ($P < 0.05$) (Cuadro 2). Los mayores niveles de ambos indicadores de contaminación fecal se registraron en otoño, para coliformes fecales el valor máximo registrado fue de 800 UFC/100mL con promedio de 111.1 UFC/100 mL, mientras que para *E. coli* el valor máximo registrado fue de 700 UFC/100mL con promedio de 55.7 UFC/100mL. No se encontró la presencia de *E. coli* en primavera, mientras que sólo se cuantificaron 10 UFC/100 mL de coliformes fecales (Cuadro 1).

Calidad fisicoquímica del agua. A lo largo del período de muestreo, se observaron cambios significativos en la calidad fisicoquímica del agua (Cuadro 1). El rango de temperatura fue de 20.5°C en noviembre a 34°C en abril, con variaciones entre periodos de muestreo significativas ($P < 0.05$). El pH varió de 7.29 en febrero a 8.77 en noviembre y no fue significativo ($P < 0.05$), al igual que la turbidez con un rango de 13.8 en febrero a 219 unidades nefelométricas (UNT) en abril. La salinidad fue significativa en los

periodos evaluados ($P < 0.05$), con valores de 5 en septiembre a 77.5 partes por mil (ppt) en abril.

Relación entre los virus y las variables predictivas. Para investigar la capacidad predictiva de los parámetros fisicoquímicos respecto a la presencia de los VHA y NV, se utilizó RLB a pasos. El modelo final mostró que las variables pH ($P = 0.03$) y salinidad ($P = 0.06$) se asociaron positivamente con la presencia de los VHA, con una Razón de Momios (RM) de 14.30 y 1.07, respectivamente (Cuadro 3). Para NV, no se encontró relación con los parámetros fisicoquímicos. La presencia de los VHA y NV, no se asoció con las concentraciones ni presencia de los coliformes fecales y *E. coli*, utilizados para determinar la calidad microbiológica del agua (Cuadro 3).

Discusión

En este estudio, se determinó la eficiencia de recuperación del SUF y se acopló a la RT-PCR para la concentración e identificación de los VHA y NV en agua del Complejo Lagunar Huizache-Caimanero; obteniéndose recuperaciones mínimas de 69.8% y máximas de 128%. El método estándar (adsorción-elución) muestra inconsistencias en la recuperación viral (3-99%) y esto es debido a la calidad fisicoquímica del agua; tipo de filtro y virus; presencia de ácidos húmicos, sales o sólidos suspendidos, que interfieren en la adsorción de los virus al filtro (Guttman-Bass *et al.*, 1986; Lukasik *et al.*, 2000). Lo anterior dificulta su aplicación en ambientes acuáticos que se encuentran en continuo cambio, ya sea por factores ambientales como

mareas y lluvias, o bien descargas de aguas industriales y municipales, dando lugar a variaciones en los valores de los parámetros fisicoquímicos.

A diferencia del método estándar, el SUF concentra por exclusión de tamaño, por lo que variaciones en el pH, la salinidad, presencia de ácidos húmicos, entre otros, no intervienen en la recuperación de los microorganismos. El SUF se ha empleado para la recuperación y detección por ensayos de placa de virus, bacterias y protozoarios inoculados en diferentes tipos de aguas ambientales, con eficiencias de recuperación de 60 a 108% (Morales-Morales *et al.*, 2003; Olszewisky *et al.*, 2005; Winona *et al.*, 2001). El presente estudio confirma que el SUF puede ser utilizado para concentrar virus de aguas estuarinas.

Las ostras, almejas y ostiones son los moluscos bivalvos comúnmente asociados a brotes de gastroenteritis por los VHA y NV por su consumo en crudo (Guyader *et al.*, 2006; Nenonen *et al.*, 2006), sin embargo el camarón es un producto de mar que en el noroeste de México se consume en diferentes platillos sin cocción, como el ceviche y el "aguachile", por lo que la calidad microbiológica del agua de cría de éstos productos es importante. La información sobre la presencia los VHA y NV en el Pacífico mexicano es limitada. Los VHA y NV se han evaluado en diferentes lugares y ambientes acuáticos. En canales de Florida, los VHA y NV se encontraron en el 63% y 10% de las muestras, respectivamente (Griffin *et al.*, 1999). NV se encontró en el 9.4% de las muestras de agua de río y lagos analizadas en Finlandia (Hörman *et al.*, 2003). En el agua del río Tijuana y Playa Imperial (Océano Pacífico) en San Diego, se encontró la presencia de los VHA en el 79% de las muestras analizadas (Gersberg *et al.*, 2006).

En el presente estudio, los VHA y NV se identificaron en el 80% y 70% de las muestras de agua. La captura de camarón en el Complejo Lagunar se lleva a cabo en los meses de septiembre a noviembre, donde la presencia de los virus se observó en <70% de las muestras, poniendo en manifiesto que el agua del Complejo Lagunar presenta contaminación de origen fecal, donde la falta de sistemas de drenaje en los poblados cercanos puede ser la fuente de contaminación.

De esta manera, el agua contaminada puede actuar como vehículo de transferencia de los patógenos, creando la oportunidad de éstos lleguen a los productos de mar, poniendo en riesgo la salud de los consumidores, particularmente de quienes consumen moluscos y camarón crudo, el cual abastece uno de uno de los puertos de mayor afluencia turística internacional en México, como lo es Mazatlán, Sinaloa.

No se encontró diferencia significativa en la presencia de virus entre los diferentes puntos de muestreo analizados. Los puntos 1 y 5 de muestreo, son entradas de agua dulce de los ríos Presidio y Baluarte, respectivamente. La presencia simultánea de virus e indicadores de contaminación fecal en el punto 1 fue mayor del 55% en las muestras de agua, lo cual podría indicar que el Complejo Lagunar recibe desechos urbanos de los poblados y ranchos dedicados a la cría de ganado que se encuentran a lo largo del río Presidio y alrededor del Complejo Lagunar.

El ADN obtenido de cuatro muestras positivas para los VHA, se secuenciaron y la búsqueda en el BLAST mostró alta similitud con cepas de los VHA. Diversos estudios realizados para conocer la distribución geográfica del VHA muestran que el sub-genotipo IA es el más predominante a nivel mundial (Villar *et al.*, 2006), e incluso existen registros de su presencia en México (Nainan *et al.*, 2006). En el presente

estudio, las cepas aisladas de los VHA mostraron un solo agrupamiento con el genotipo I y subgenotipo B, el cual se ha aislado en Israel, Brasil, Egipto, Jordania, Noruega, Italia, España, pero no en México (Nainan *et al.*, 2006), siendo éste el primer estudio en mostrar la presencia de este sub genotipo en el país.

Para NV, las cepas pertenecientes al grupo GII.4 son reconocidas como las del genotipo más predominante a nivel mundial (Bull *et al.*, 2005). En el presente estudio, las muestras secuenciadas para NV correspondieron al GII, el 53.85% de las cepas se agrupó en el genotipo GII.4, mientras que el 46.15% de las cepas correspondió probablemente a un nuevo genotipo del GII.

En el presente estudio, la presencia de los virus y los cambios en los parámetros físicoquímicos, estuvieron en función de los períodos de muestreo. Los promedios máximos de temperatura (30.7°C) y pH (8.2), se registraron en otoño. En primavera se registraron los promedios más altos para la turbidez (60.7 UNT) y la salinidad (53.6 ppt). La asociación de los virus a los sólidos suspendidos incrementa la persistencia de éstos, ya que les ofrece protección contra las radiaciones solares y la degradación de las enzimas (Gantzer *et al.*, 1999). La mayor presencia de los virus fue en primavera, lo cual puede deberse a que en ésta época el nivel del agua desciende notablemente en el Complejo Lagunar y la turbidez incrementa. Los virus que se encuentran en los sedimentos, pueden ser resuspendidos por fenómenos naturales y artificiales (Bosh *et al.*, 1998). En el Complejo Lagunar, cuando se prohíbe la extracción de camarón, los pescadores se dedican a la captura de la jaiba (SAGARPA, 2003), actividad que puede influir en el movimiento del sedimento y de los virus que en éstos se encuentran, donde pueden persistir hasta por un año, dependiendo de el tipo de agua, iluminación,

turbidez, pH, entre otros (Biziagos *et al.*, 1998). Debido a que en primavera no es época de lluvias, la entrada de agua de los ríos se reduce y el Complejo se abastece principalmente de agua salada del Pacífico, donde los cruceros que llegan al puerto de Mazatlán, pueden ser una fuente de contaminación indirecta.

El 8.57% de las muestras de agua mostraron la presencia simultánea de los indicadores de contaminación fecal y los virus. Los coliformes fecales y *E. coli*, estuvieron presentes en el 48.57% y 34.28% de las muestras de agua, respectivamente. De las muestras positivas para coliformes fecales, los VHA se presentaron en el 70.5% y norovirus en el 76.4%; mientras que para *E. coli* ambos virus estuvieron presentes en el 75% de las muestras positivas.

El 35.29% de las muestras positivas para coliformes fecales, rebasó los límites permisibles (>230 UFC/100 mL) para el agua dedicada al cultivo de especies marinas de acuerdo a los Criterios Ecológicos en México; mientras que el 29.41% y el 16.66% de las muestras recolectadas rebasaron los límites permisibles para coliformes fecales y *E. coli*, respectivamente según los Estándares de la Unión Europea (Anonymous, 1979). Los límites excedidos por ambos indicadores de contaminación fecal se presentaron en otoño (época de lluvias); mientras que en invierno y primavera (época de sequía), los valores de ambos indicadores (<200 UFC/100mL), se mantuvieron dentro de los límites permisibles (CE-CCA-001/89; Anonymous, 1979), cuyo comportamiento ya se ha registrado anteriormente (Galindo *et al.*, 1997). A finales de septiembre de 2006, se presentó un fenómeno natural (huracán Lane), el cual provocó inundaciones y en algunas partes del Complejo Lagunar el desbordamiento del agua, lo cual podría explicar las altas concentraciones de ambos indicadores en esta época.

Diversos factores han mostrado afectar la persistencia de los virus en los ambientes acuáticos, por lo que incorporarlos a un modelo para predecir la contaminación viral en determinados tipos de aguas, puede ayudar a predecir los riesgos de encontrar a los patógenos. En el presente estudio, las variables utilizadas como posibles predictoras de la contaminación viral fueron el pH, temperatura, turbidez y salinidad. Para NV, el análisis de RLB no mostró asociación con ninguna de las variables, mientras que para los VHA, el modelo a pasos, mostró que el pH se relacionó positivamente con el patógeno.

El pH y la salinidad están relacionados en ambientes estuarinos, lo cual puede cambiar de acuerdo al tipo de contaminación, óptimamente aguas con salinidades <10 ppt, presentan un pH de 7-7.5, sin embargo la presencia de contaminantes influye en las variaciones, donde las descargas residuales presentan un pH cercano a 8 (LaBelle y Gerba, 1979). En nuestro estudio en otoño, el valor promedio de salinidad fue <10 ppt, mientras que el valor promedio de pH fue >8. En todos los meses analizados el valor promedio de pH fue mayor de 7.5, lo cual podría indicar la entrada de descargas residuales.

En contraste con el presente estudio, se ha observado que los virus están asociados a las bajas temperaturas en ambientes acuáticos, persistiendo por más tiempo a <23°C que a 30°C (Lipp *et al.*, 2001b; Wetz *et al.*, 2004). En nuestro estudio, no se encontró asociación de los virus con la temperatura, sin embargo en noviembre se registraron las temperaturas (20.5-21.5°C) más bajas que el resto de los meses evaluados, donde los virus e indicadores se identificaron en >60% de las muestras. La salinidad no ha mostrado tener un efecto en la persistencia de los virus, sin embargo se

ha reportado que acelera la inactivación de los indicadores de contaminación fecal (Bordalo *et al.*, 2002). En nuestro estudio, se realizó un análisis de RLB, que mostró que la disminución de los niveles de ambos indicadores estuvo directamente relacionada con el aumento de la salinidad y disminución de la temperatura para *E. coli*, que impiden el desarrollo y crecimiento bacteriano, donde las concentraciones de ambos indicadores disminuyeron notablemente al incrementar la salinidad de <10 ppt a >30 ppt.

El modelo de RLB se ha utilizado por diversos autores para relacionar la presencia de los indicadores de contaminación fecal y los patógenos. Lipp *et al.* (2001a), no encontraron asociación entre la presencia de los indicadores (coliformes, *enterococos*, *C. perfringens* y colifagos) y los patógenos (*Cryptosporidium* o *Giardia*) en agua estuarina en Florida. Por otra parte LaBelle *et al.* (1980), encontraron que los coliformes fecales del sedimento de estuarios, pueden actuar como posibles indicadores de la contaminación viral, pero no así los coliformes encontrados en el agua de los mismos estuarios. El presente estudio, la presencia de los virus no se relacionó con la presencia o concentraciones de los indicadores de contaminación fecal. Este comportamiento también se ha observado en productos de mar (moluscos bivalvos), donde se menciona que *E. coli* no protege efectivamente al consumidor del riesgo a la exposición de patógenos asociados con la contaminación fecal (Formiga-Cruz *et al.*, 2002). En contraste con ello, otros estudios muestran que los indicadores como *E. coli*, pueden actuar como indicadores de la contaminación viral sólo cuando el lugar está fuertemente contaminado por descargas residuales, existe una gran afluencia de personas, o bien la presencia de algún fenómeno natural (Gersberg *et al.*, 2006).

El presente estudio muestra que la presencia de los virus en el Complejo Lagunar está influenciada por posibles fuentes de contaminación indirectas como desechos humanos o de animales (ganado y aves), infiltraciones de las viviendas cercanas debido a la falta de un sistema de drenaje, o directas como cruceros. La falta de asociación de los indicadores de contaminación fecal y los virus entéricos, pone en evidencia una vez más la necesidad de incluir a los virus como parte del monitoreo para evaluar la calidad microbiológica de agua en zonas costeras. La búsqueda de variables predictivas e indicadores de contaminación fecal que permitan evaluar el riesgo de presencia de virus entéricos en agua aún continúa, mientras tanto la implementación de metodologías que ofrezcan una alta eficiencia de recuperación viral acoplados a métodos que ofrezcan alta sensibilidad para identificarlos, es importante para asegurar la calidad del agua y subsecuentemente la de los productos de mar, así como el bienestar del consumidor.

Referencias

- Anonymous**, 1979. Council directive of 30 october 1979 on the quality required of shellfish waters (79/923/EEC). Official Journal of European Communities L377, 48. Consultado en internet (2006):
http://europa.eu.int/eur-lex/en/consleg/pdf/1979/en_1979L0923__do_001.pdf
- APHA. American Control Health Association**. 1998. Compendium of methods for the examination of water and wastewater. 4^{ra} ed. Editores Frances Pouch and Downes Keith Ito. Ed. APHA.
- Atmar, R.L., F.H. Neill, J.L. Romalde, F.L. Guyader F, C.M. Woodley, T.G. Metcalf, and M.K. Estes**. 1995. Detection of norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61:3014-3018.
- Borchardt, M.A., N.L. Hass, and R.J. Hunt**. 2004. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. Appl. Environ. Microbiol. 70:5937:5946.
- Bordalo, A.A., R. Onrassami., and C. Dechsakulwatana**. 2002. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong river, Thainald). J. Appl. Microbiol. 1:191-196.
- Bosh, A**. 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Int. Microbiol. 1:191-196.
- Bull, R.A., E.T.V. Tu, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, and P.A. White**. 2005. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 44:327-333.

- Carter, M.J.** 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection, *J. Appl. Microbiol.* 98:1354-1380.
- CE-CCA-001/89.** Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. Instituto Nacional de Ecología. Consultado en internet (2007):
<http://www.ine.gob.mx/ueaje/publicaciones/gacetas/191/criterios.html>
- Caballero, B., Trugo L.C., and M.P. Finglas.** 2003. Membrane techniques. Principles of ultrafiltration. *Enciclopedia of Food Sciences and Nutrition.* 6:3837-3848.
- Cabanillas-Beltrán, H., E. Llausás-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. García-Gasca, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, and B. Gómez-Gil.** 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol. Letters.* 265:76-80.
- CONAPESCA,** 2003. Anuario Estadístico de Pesca. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Consultado en Internet (2007):
<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/integra/Pesquero/AnPes2003.pdf>
- FAO,** 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO fisheries technical paper No. 442, Rome. Consultado en internet (2007):
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4743e/y4743e00.pdf>
- Fong, T., and E.K. Lipp.** 2005. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assesment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:357-371.
- Formiga-Cruz, M., A.K. Allard, A.C. Conden-Hansson, K. Henshilwood, B.E. Hernroth, J.Jofre, D.N. Less, F. Lucena, M. Papapetropoulou, R.E. Rangdale, A. Tsi bouxi, A. Vantarakis, and R. Girones.** 2002. Evaluation of potential indicators of

viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. .

Appl. Environ. Microbiol. 69:1556-1563.

Gantzer, C., S. Senouci., A. Maul., Y. Levi, and L. Schwartzbrod. 1999. Enterovirus detection from wastewater by RT-PCR and cell culture. *Water Sci. Technol.* 40:105-109.

Galindo, R.J., J.M. Medina, L.C. Villagrana., and Ibarra C.L. 1997. Environmental and pollution condition of the Huizache-Caimanero lagoon, in the north-west of Mexico. *Marine Pollution Bulletin.* 34:1072-1077.

Gersberg, R.M., M.A. Rose, R. Robles-Sikisaka., and A.K. Dhar. 2006. Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7438-7444.

Griffin, D.W., C.J. Gibson III, E.K. Lipp, K. Riley, J.H. Paul III, and J.B. Rose. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida keys. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4118-4125.

Guttman-Bass, N., and J. Catalano-Sherman. 1986. Humic acid interference with virus recovery by electropositive microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:556-51.

Guyader, F.L., F.H. Neill, M.K. Estes, S.S. Monroe, T. Ando, and R.L. Atmar L. 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4268-4272.

Guyader, F.L., F. Bon., D. DeMedici, S. Parnaudeau, A. Bertone, S. Crudeli, A. Doyle, M. Zidane, E. Sufferedini, E. Kohli, F. Maddalo, M. Monini, A. Gallay, M. Pommepuy, P. Pothier, and F. M. Ruggeri. 2006. Detection of multiple noroviruses

associated with and international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44:3878-3882.

Hall, T.A. 1999. **BioEdit**: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sequencing and Mapping, Ser.* 41:95-98.

Hill, V.R., A.L. Polaczyk, D. Hahn, J. Narayanan, T.L. Cromeans, J.M. Roberts, and J.E. Amburgey. 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6878-6884.

Hörman, A., Rimhanen-Finne., L. Maunula L, C. Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo, and M. Hänninen. 2003. *Campylobacter* spp., *giardia* spp., *cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organism in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:87-95.

Kingsley, D.H., and Richards G.P. 2001. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4152-4157.

Kumar, S., Tamura K., and M. Nei. 2004. **Mega 3.1**: Integrated software for molecular evolutionary genetics and lysis sequence alignment. *Briefings in bioinformatics* 5:150-163.

LaBelle, R.L., and C.P. Gerba. 1979. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:93-101.

LaBelle, R.L., C.P. Gerba, S.M. Goyal, J.L. Melnick, I. Cech, and G.F. Bogdan.

1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:588-596.

Lipp, E.K., R. Kurz., R. Vincent., C. Rodriguez-Palacios., S.R. Farrah., and J. B. Rose. 2001a. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries.* 24:266-276.

Lipp, E.K., J. Lukasik, and J.B. Rose. 2001b. Human enteric viruses and parasites in the marine environment. *Methods in microbiology.* 30:559-588.

Lukasik, J., T.M. Scott, D. Andryshak, and S.F. Farrah. 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2914-2920.

Morales-Morales, H.A., G. Vidal, J. Olszewisky, C.M. Rock, D. Desgupta, K.H Oshima, and G.B. Smith. 2003. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4098-4102.

Myrmel, M., E.M.M Berg, E. Rimstad, and B. Grinde. 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2678-2684.

Nainan, V.O., Xia G., Vaughan G., and Margolis S.H. 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews.* 19:63-79.

PENDIENTE

Nenonen N.P., B. Hernroth, A.A. Chauque, C. Hannoun, and T. Bergström. 2006. Detection of hepatitis A virus genotype 1B variants in clams from Maputo bay, Mozambique. *J. Med. Virol.* 78:896-905.

- Olszewisky, J., L. Winona, and K.H. Oshima.** 2005. Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. *Can. J. Microb.* 51:295-303.
- Robertson, B.H., R.W. Jansen, B. Khanna, A. Totsuka., O.V. Nainan, G. Siegl, A. Widell, H.S. Margolis, S. Isomura, K. Ito, T. Ishizu, Y. Moritsugu, and S.M. Lemon.** 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 73:1365-1377.
- Romalde, J.L., E. Area, G. Sánchez, C. Ribao, I. Torrado, X. Abad, R.M. Pintó, J.L. Barja, and A. Bosch.** 2002. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 119-130.
- SAGARPA, 2003.** La pesquería de jaiba (*Callinectes spp*) en el Pacífico mexicano: Diagnóstico y propuesta de regulación. Consultado en internet (2007):
<http://www.inp.sagarpa.gob.mx/Dictámenes/JaibaPacífico.pdf>
- Sánchez, G., R.M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch.** 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40:4148-4155.
- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. SEMARNAP.** Consultado en internet 2007.
<http://e-mar.sct.gob.mx/fileadmin/biblioteca/ecologia/308.pdf>
- USEPA. Environmental Protection Agency.** 2001. Manual of methods for virology. EPA/600/4-84/013 (N16).

- Vidal, R., P. Roessler, V. Solari, J. Vollaire, X. Jiang, D.O. Matson, N. Mamani, V. Prado, and M.L. O’Ryan.** 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin. Microbiol.* 44:2271-2275.
- Villar, L.M., L.M. Morais, R. Aloise, M.M.M. Melo, I.A. Calado, E. Lampe, and A.M.C. Gaspar.** 2006. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A in Northeast Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:873-881.
- Vinje, J., R.A. Hamidjaja, and M.D. Sobsey.** 2003. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Methods.* 116:109-117.
- Wetz, J.J., E.K. Lipp, D.W. Griffin, J. Lukasik, D. Wait, M.D. Sobsey, T.M. Scott, and J.B. Rose.** 2004. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Mar. Poll. Bull.* 48:698-704.
- Winona, L.J., A.W. Ommani, J. Olszewiski, J.B. Nuzzo, and K.H. Oshima.** 2001. Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. *Can. J. Microbiol.* 47:1033-1041.
- Zetina Rejón, M.J., F. Arreguín-Sánchez, and E.A. Chávez.** 2002. Trophic structure and flows of energy in the Huizache-Caimanero lagoon complex on the Pacific coast of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 57: 803-815.

CUADRO 1. Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del Complejo Lagunar

Huizache Caímanero

Periodo	Meses evaluados (no de muestras)	Parámetros fisicoquímicos				Niveles de ICF ^a (UFP/mL)	
		Temperatura (°C)	pH	Turbidez (UNT) ^c	Salinidad (ppt) ^d	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
Otoño	Septiembre y octubre 2006 (10)	30.7 (1.0)	8.0 (0.4)	51.8 (48.7)	0.9 (0.8)	440.0 (243.0)	150.0 (308.0)
Otoño	Noviembre 2007 (10)	25.9 (3.4)	8.2 (0.2)	46.9 (37.6)	7.8 (0.7)	114.0 (244.2)	80.0 (94.9)
Invierno	Enero y febrero 2007(10)	24.4 (2.0)	8.0 (0.3)	69.6 (56.1)	13.3 (2.8)	45.0 (68.5)	40.0 (56.8)
Primavera	Marzo y abril 2007(10)	27.8 (2.5)	8.0 (0.2)	60.7 (80.0)	53.6 (5.7)	10.0 (21.0)	0
	Total	27.21 (3.3)	8.0 (0.3)	54.4 (49.6)	25.4 (22.0)	111.1(210.5)	55.7(129.9)
	Valor <i>P</i> ^e	<0.01 ^f	0.44	0.92	<0.01 ^f	<0.01 ^f	0.17 ^f

^aMedia (desviación estándar)

^bDeterminado por ANOVA

^cIndicadores de contaminación fecal

^dUNT, Unidades nefelométricas

^eppt, partes por mil

^fEstadísticamente significativo ($P < 0.05$)

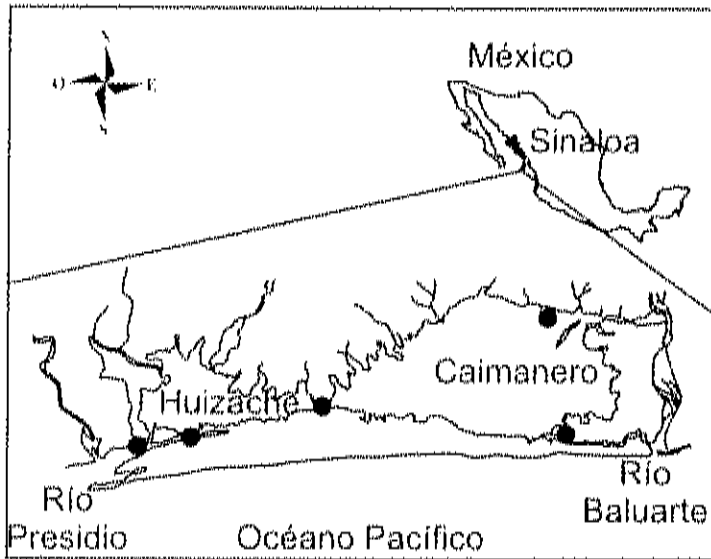
CUADRO 3. Regresión logística binaria (RLB) para la presencia de virus entéricos usando los indicadores de contaminación fecal y parámetros fisicoquímicos

	Parámetros fisicoquímicos ^a				Presencia ^a		Niveles ^b	
	Temperatura	pH	Salinidad	Turbidez	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>
Virus de Hepatitis A	0.85 (0.65-1.11)	14.31 ^b (1.17-174.0)	1.05 (0.99-1.12)	1.00 (0.99-1.02)	0.14 (0.01-1.27)	0.45 (0.08-2.68)	1.00 (0.99-1.00)	1.00 (0.99-1.00)
Norovirus	1.07 (0.87-1.32)	3.30 (0.47-23.13)	1.01 (0.98-1.04)	1.00 (0.99-1.02)	1.25 (0.27-5.73)	1.06 (0.21-5.27)	1.00 (1.0-1.01)	1.00 (0.99-1.01)

^aRM; Razón de momios (Intervalo de confianza del 95%) determinado por RLB

^bEstadísticamente significativo (P=0.03) determinando por RLB a pasos

FIGURA 1. Localización geográfica del Complejo Lagunar Huizache Caimanero mostrando los sitios de muestreo



• Sitios de muestreo

FIGURA 2. Representación esquemática del sistema de ultrafiltración (SUF) utilizado para la concentración de las muestras de agua

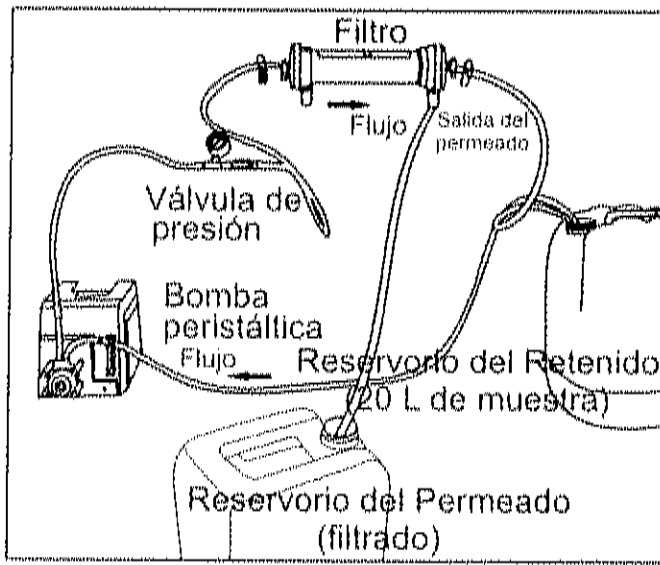


FIGURA 3. Distribución del porcentaje de las muestras de agua positivas para los indicadores de contaminación fecal y virus en los meses de muestreo

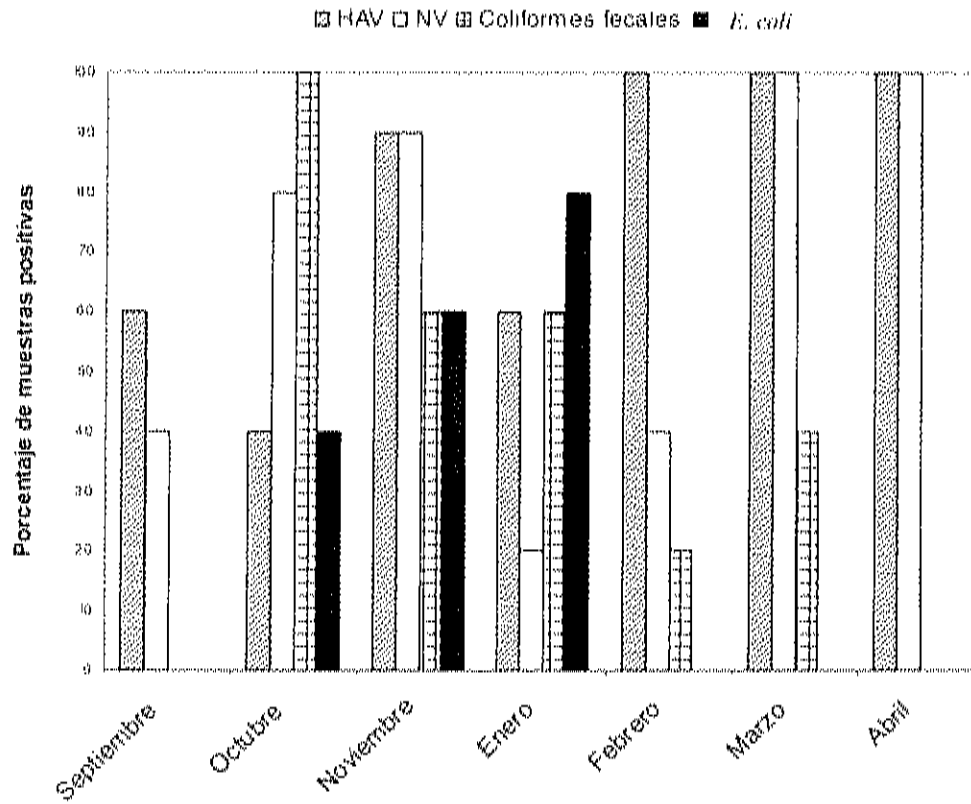


FIGURA 4. Distribución de los virus e indicadores de contaminación fecal en los puntos de muestreo del Complejo Lagunar Huizache Calmanero

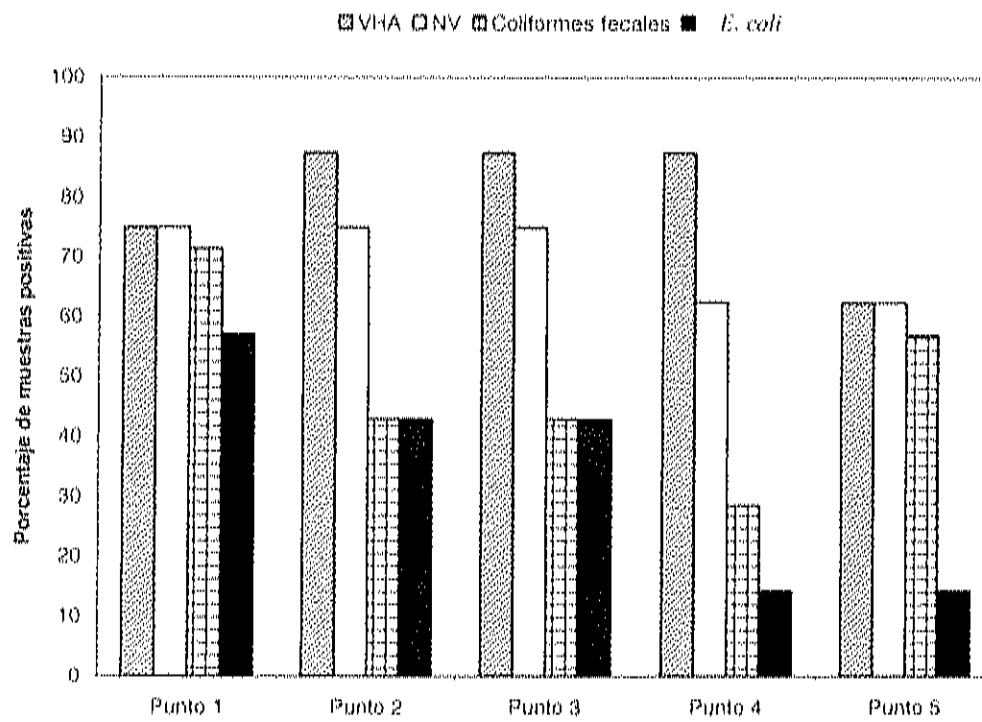


FIGURA 5. Árbol filogenético basado en la región VP1/2A del virus de hepatitis A

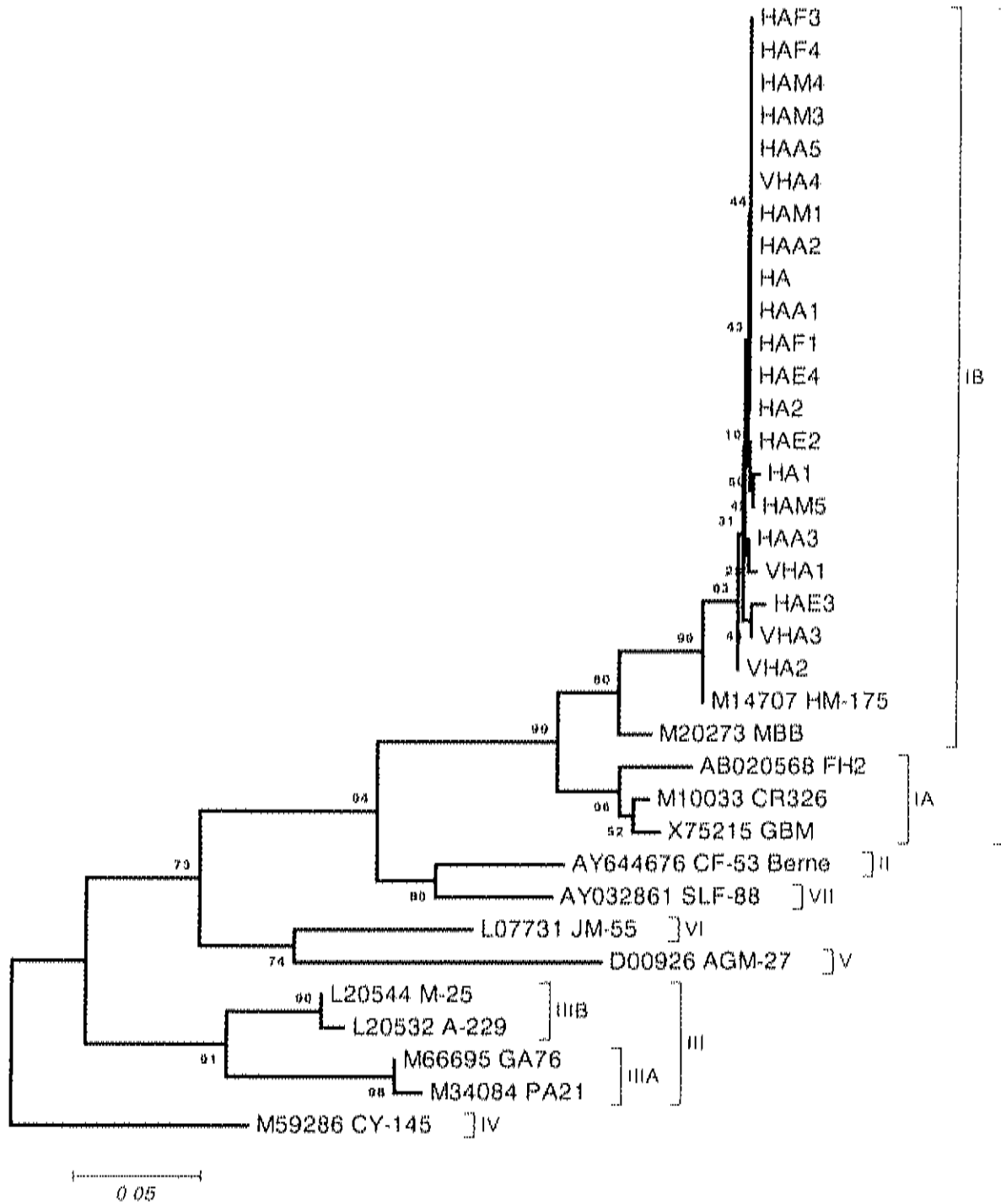
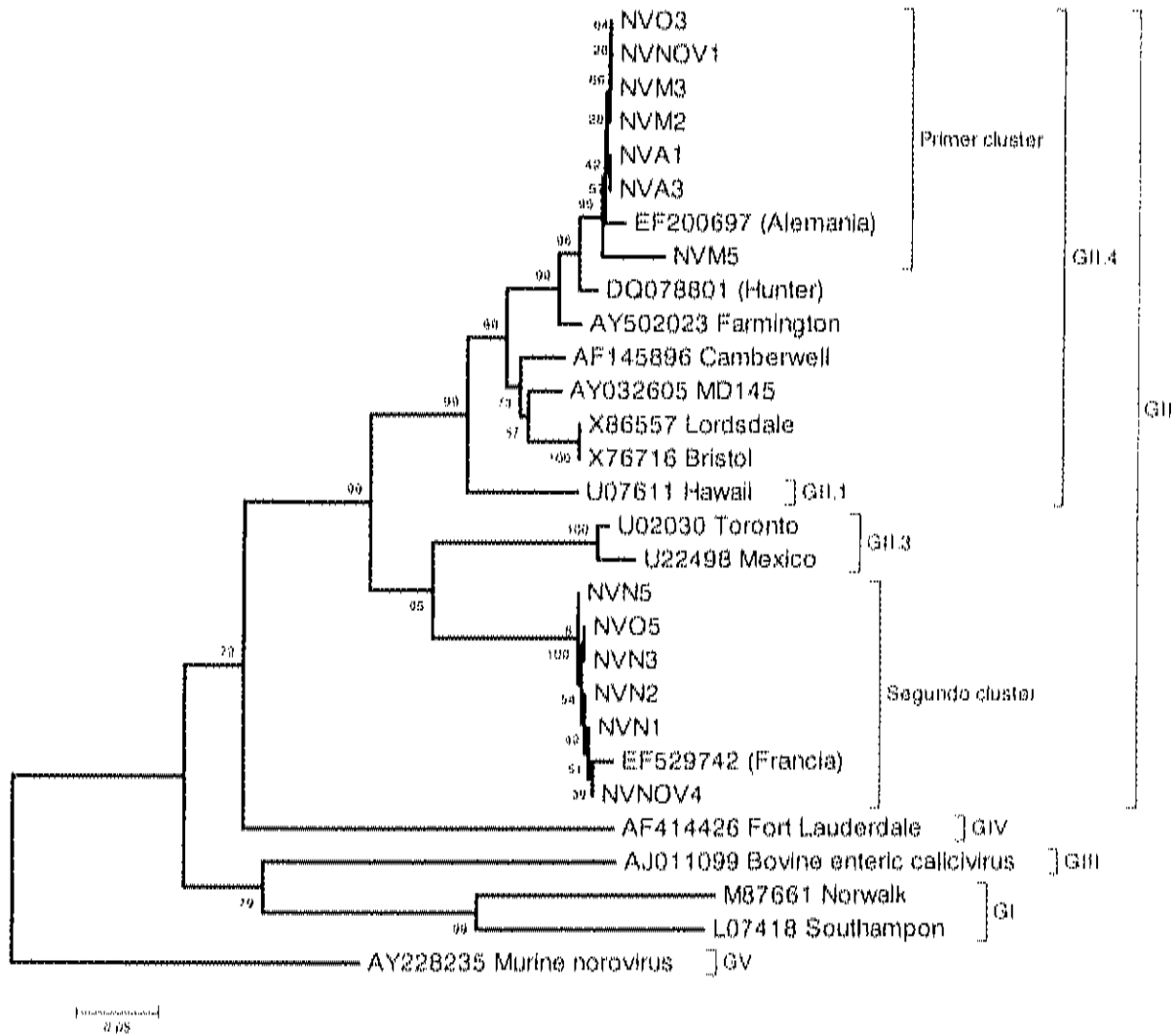


FIGURA 6. Árbol filogenético basado en la región A de norovirus



ANEXO 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES*Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)*

Componente	Cantidad
Fosfato de sodio (dibásico)	8.09 g
Fosfato de potasio (monobásico)	2.44 g
NaCl	4.25 g
Agua destilada (estéril)	1 L

Combinar todos los ingredientes y ajustar pH a 7.2. Almacenar a 4°C.

Cloroformo/butanol (1:1)

Componente	Cantidad
Cloroformo	2.5 mL
Butanol	2.5 mL

Combinar el cloroformo y butanol, agitar por inmersión de 4-5 veces. Preparar al momento de usarse.

Cloruro de sodio (NaCl) 0.8 M

Para un volumen de retenido de 320 mL

$$M = g / (pm)(vol) ; g = (M)(pm)(vol)$$

$$g = (0.8 \text{ mol})(58.44 \text{ mol/L})(.32 \text{ L})$$

$$g = 14.96$$

Polietilenglicol (PEG) al 12%

Para un volumen de retenido de 320 mL

$$\begin{array}{l} 12 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \quad x = 38.4 \text{ g} \\ x \text{ ----- } 320 \text{ mL} \end{array}$$

Polifosfato de sodio (NaPP) al 0.01%

Para un volumen de muestra de 20 L

$$\begin{array}{l} 0.01 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \quad x = 2 \text{ g} \\ x \text{ ----- } 20000 \text{ mL} \end{array}$$

Suero bovino al 5%

Para un volumen de 1 L

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \quad x = 50 \text{ mL} \\ x \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \end{array}$$

Tween 80 al 0.01%

Para un volumen de 150 mL

$$\begin{array}{l} 0.01 \text{ mL} \text{ ----- } 100 \text{ mL} \quad x = 0.015 \text{ mL}; 1.5 \mu\text{L} \\ x \text{ ----- } 150 \text{ mL} \end{array}$$

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS*Agar soya tripticaseína (TSA, México)*

Componente	Cantidad (g)
Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15
pH final 7.3 ± 2	

Para 1 L de TSA; pesar 40 g del medio y disolver en 1 L de agua destilada. Agitar hasta ebullición y esterilizar (121°C/15 min). Vaciar en cajas petri (20 mL/caja).

Caldo soya tripticaseína (TSB, México)

Componente	Cantidad (g)
Peptona de caseína	17
Peptona de soya	3
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5
pH final 7.3± 2	

Para 1 L de TSB; pesar 30 g del medio y disolver en 1 L de agua destilada, agregar 10 g de agar bacteriológico y agitar hasta ebullición. Esterilizar (121°C/15 min) y vaciar en tubos de ensayo (3 mL/tubo).

*Medio cromogénico para la detección y enumeración de E. coli y coliformes
(CHROMagar ECC, Paris, Francia)*

Componente	Cantidad (g/L)
Agar	15
Mezcla cromogénica	4.8
Peptona	8
Extracto de levadura	8
NaCl	5
pH final 7.2 ± 2	

Para 1 L de CHROMagar; pesar 32.8 g del medio y disolver en 1 L de agua purificada, agitar hasta ebullición y vaciar en cajas petri (5 mL/caja)

ANEXO 3

CONTENIDO DE LOS KITS*Access RT-PCR System Promega (Madison, WI, USA)*

Componente	Cantidad
Transcriptasa reversa AMV, 5 u/ μ L	500 u
ADN polimerasa <i>Tfi</i> , 5 u/ μ L	500 u
Amortiguador de reacción AMV/ <i>Tfi</i> ,	1 mL
MgSO ₄ , 25 mM	1.25 mL
Mezcla dNTP, 10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP	100 μ L
Control positivo de ARN con cargador (1.25 attomol/ μ L)	50 μ L
Primer control corriente arriba, 15 μ M	100 μ L
Primer control corriente abajo, 15 μ M	100 μ L
Agua libre de nucleasas	13 mL
Protocolo	1

QIAamp Viral RNA QIAGEN Mini kit (USA)

Componente	Cantidad
Mini columnas QIAamp	250
Tubos de colección (2 mL)	1000
Amortiguador AVL	5x31 mL
Amortiguador AW1 (concentrado)	95 mL
Amortiguador AW2 (concentrado)	66 mL
Amortiguador AVE	8x2 mL
ARN cargador (poly A)	5x310 μ g
Protocolo	1

El Amortiguador AW1 (95 mL), se mezcla con 125 mL de etanol (96-100%), para un volumen final de 220 mL. El amortiguador AW2 (66 mL), se mezcla con 160 mL de etanol (96-100%), para un volumen final de 226 mL. Se agregan 310 μ L de amortiguador AVE, al tubo que contiene los 310 μ g del ARN cargador liofilizado, a

la mezcla AVE-ARN se le adiciona 0.56 mL de amortiguador AVL, para su uso en la extracción de ARN.

PCR Core System Promega (Madison, WI, USA)

Componente	Cantidad
Taq ADN polimerasa	250 u
Amortiguador de reacción 10X ADN polimerasa termofílica, libre de MgCl ₂	1.2 mL
Solución 25 mM, MgCl ₂	1.2 mL
Amortiguador 10X Taq ADN polimerasa, con MgCl ₂ 15 mM	1.2 mL
Mezcla de nucleótidos para PCR, 10 mM	200 µL
Protocolo	1

Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Promega (Madison, WI, USA)

Componente	Cantidad
Solución de unión a la membrana	20 mL
Solución de lavado de la membrana (concentrado)	15 mL
Agua libre de nucleasas	3.75 mL
Minicolumnas wizard SV	50 mL
Tubos de colección de 2 mL	50
Protocolo	1

La solución de unión a la membrana (15 mL), se mezcla con 75 mL de etanol (95%) para un volumen final de 90 mL.

ANEXO 4

ABREVIATURAS

AC. Antigen capture

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario

ANOVA. Analisis of varlance

APHA. American Public Health Association

ARN. Ácido ribonucleico

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero

ATCC. American Type Culture Collection

BLAST. Basic Local Aligment Search Tool

CDC. Centers for Disease Control

CFLP. Cleavage fragment length polymorphism

CHROMagar. Medio cromogénico para la detección y enumeración de *E. coli* y coliformes

CIAD. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

cm. centímetro

COFEPRIS. Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios

CONACyT. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

dNTP. Deoxyribonucleotide triphosphate

DUMAC. Ducks Unlimited de México

E. coli. *Escherichia coli*

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

EPA. Environmental Protection Agency

et al. y colaboradores

FAO. Food and Adgriculture Organization

FCVs. Feline Caliciviruses

G. Genogrupos

g. Gramos

g. Gravedades

h. horas

HBGA. Histo-Blood Group Antigens

INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática

KDa. Kilodaltones

Km. Kilómetros

kPa. Kilopascales

L. Litros

LMAA. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de los Alimentos

M. Molar

MF. Microfiltración

mg. Miligramos

MgCl₂. Cloruro de magnesio

min. Minutos

mL. mililitro

m. Metros

MWCO. Molecular weight cut off

- NaCl.** Cloruro de sodio
- NaOH.** Hidróxido de sodio
- NCBI.** The Nacional Center for Biothecnology Information
- nm.** Nanómetros
- NaPP.** Polifosfato de sodio (NaPO_3)
- NSSP.** The Nacional Shellfish Sanitation Program
- NV.** Norovirus
- ORF.** Open reading frame
- pb.** Pares de bases
- PBS.** Phosphate buffered saline
- PCR.** Polimerase chain reaction
- PEG.** Polietilenglicol
- pH.** Potencial de hidrógeno
- ppm.** Partes por millón
- ppt.** Partes por mil
- PS.** Polisulfona
- psi.** Unidad de presión (Kj/cm^2)
- RFLP.** Restriction fragment length polymorphism
- RLB.** Regresión logística binaria
- RM.** Razón de momios
- RT-PCR.** Reverse transcription-polimerase chain reaction
- s.** Segundos
- SAGARPA.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SEMARNAP. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca

SFB. Suero fetal bovino

spp. Sin género ni especie

SUF. Sistema de Ultrafiltración

t. Toneladas

TAE. Amortiguador Tris Acetato EDTA

TSA. Tripticase soy agar

TSB. Tripticase soy broth

u. Unidades

UE. Unión Europea

UF. Ultrafiltración

UFC. Unidades formadoras de colonia

UFP. Unidades formadoras de placa

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México

USA. The United States of America

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency

UTR. Untranslated region

UV. Ultravioleta

VHA. Virus de hepatitis A

VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana

WHO. World Health Organization

WHSRN. Western Hemisphere Shorebird Reserve Network

°C. grados celsius

µL. Microlitro

μm . Micrómetro

% Por ciento

‰ ppt

ANEXO 5

DATOS SIN PROCESAR*Parámetros fisicoquímicos*

Parámetros Fisicoquímicos					Parámetros Fisicoquímicos				
Muestra	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (‰) ^a	Turbidez (UNT) ^b	Muestra	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (‰) ^a	Turbidez (UNT) ^b
1	29	7.48	5	179	21	21	7.78	25	34.7
2	30	7.41	5.4	28.4	22	22	7.93	27	43.06
3	30	8.5	5.5	31.2	23	23.5	8.64	22	52
4	30	8.34	8.4	14.2	24	25	8.27	32	56.4
5	30.5	7.54	5.9	29.1	25	25	8.07	37	64.5
6	30	7.95	5.45	70	26	23	7.7	33	13.8
7	32	8.49	5.6	23.6	27	25	7.77	52	26.7
8	31.5	8.57	5.4	64.7	28	27	8.34	26	212.6
9	32	8.31	11	21	29	27.5	8.24	41	34.5
10	32	7.5	11.8	56.5	30	25	7.29	38	47.4
11	27	8.1	5.4	30.4	31	25	7.84	48.8	20.6
12	28	8.77	5.6	19.2	32	27	8.36	75.1	25.5
13	28	8.5	5.4	129	33	25	7.89	54.6	58.6
14	29	8.07	8.4	19	34	27	8.01	57.8	34.8
15	28	8.38	9.4	50.2	35	28	7.97	48.6	45.7
16	20.5	7.91	9.5	22.7	36	27	7.75	28.7	14.7
17	21	8.36	5.9	39.9	37	28	8.53	77.5	93.85
18	21.5	8.3	5.6	99.5	38	29	7.92	44.4	44.25
19	28	8.18	11	20.9	39	34	8.23	73.9	219
20	28	7.79	11.8	37.8	40	28.5	8.01	26.6	50.2

^a‰, partes por mil^bUNT. Unidades nefelométricas

Presencia y niveles de los indicadores de contaminación fecal

Indicadores de Contaminación Fecal					Indicadores de Contaminación Fecal				
Muestra	Niveles de CF (UFC/mL ^a)	Presencia de CF ^b	Niveles de <i>E. coli</i> (UFC/mL ^a)	Presencia de <i>E. coli</i>	Muestra	Niveles de CF (UFC/mL ^a)	Presencia de CF ^b	Niveles de <i>E. coli</i> (UFC/mL ^a)	Presencia de <i>E. coli</i>
1	ND	ND	ND	ND	21	0.5	1	0.5	1
2	ND	ND	ND	ND	22	0	0	1.5	1
3	ND	ND	ND	ND	23	0	0	0	0
4	ND	ND	ND	ND	24	1	1	1	1
5	ND	ND	ND	ND	25	0	0	0	0
6	4	1	0.5	1	26	0	0	0	0
7	5.5	1	0	0	27	2	1	0	0
8	8	1	7	1	28	0	0	0	0
9	2	1	0	0	29	0	0	0	0
10	2.5	1	0	0	30	0.5	1	0	0
11	8	1	1	1	31	0	0	0	0
12	0.5	1	1	1	32	0	0	0	0
13	4	1	0	0	33	0.5	1	0	0
14	0	0	0	0	34	0	0	0	0
15	1	1	0	0	35	0	0	0	0
16	0.5	1	0.5	1	36	0	0	0	0
17	0	0	3	1	37	0	0	0	0
18	0	0	1.5	1	38	0	0	0	0
19	0	0	1	1	39	0	0	0	0
20	1	1	0	0	40	0.5	1	0.5	1

ND. No determinado

^aUFC/mL. Unidades formadoras de colonia por mililitro

^bCF. Coliformes fecales

Virus entéricos

Presencia del			Presencia del		
Patógeno			Patógeno		
Muestra	VHA ^a	NV ^b	Muestra	VHA ^a	NV ^b
1	1	0	21	1	0
2	0	0	22	0	0
3	1	0	23	0	0
4	1	1	24	0	0
5	0	1	25	0	1
6	0	1	26	0	1
7	1	1	27	1	0
8	0	1	28	1	0
9	1	0	29	0	0
10	0	1	30	0	1
11	1	1	31	1	1
12	1	1	32	1	1
13	1	1	33	1	1
14	1	1	34	1	1
15	1	1	35	1	1
16	1	1	36	1	1
17	0	1	37	1	1
18	1	1	38	1	1
19	1	1	39	1	1
20	0	0	40	1	0

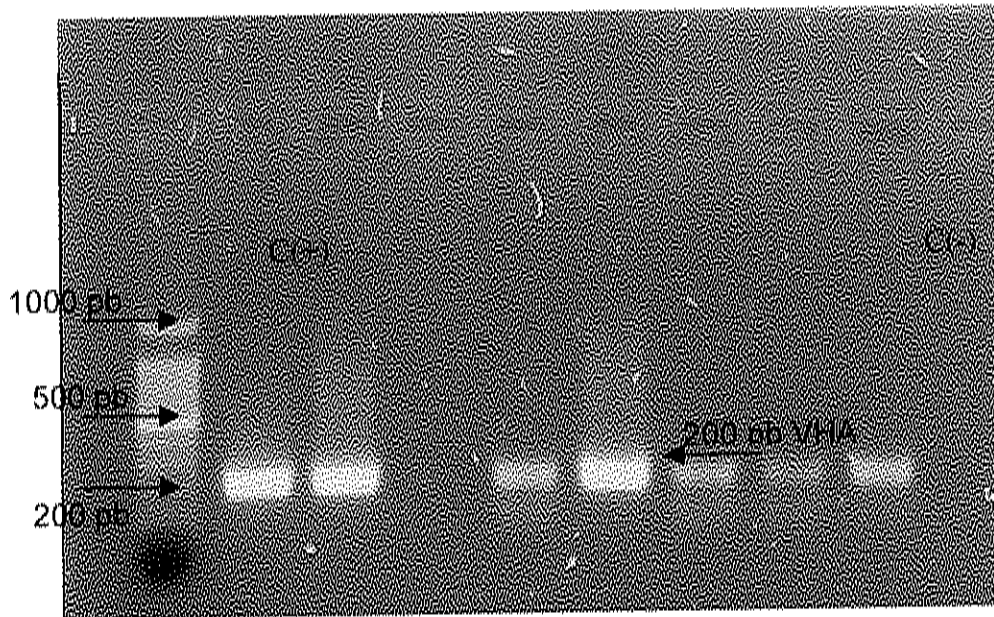
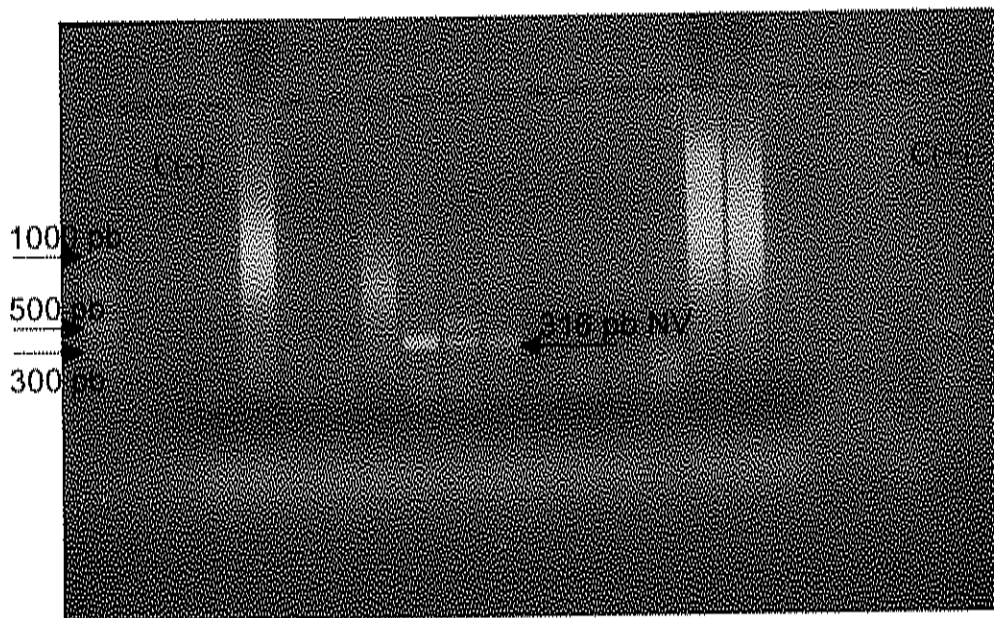
^aVirus de hepatitis A^bNorovirus

Mes, sitios y zonas de toma de muestra

Muestra	Punto de toma de muestra	Zona ^a	Mes	Muestra	Punto de toma de muestra	Zona ^a	Mes
1	1	I	Sep	21	1	I	Ene
2	2	I	Sep	22	2	I	Ene
3	3	I	Sep	23	3	I	Ene
4	4	II	Sep	24	4	II	Ene
5	5	II	Sep	25	5	II	Ene
6	1	I	Oct	26	1	I	Feb
7	2	I	Oct	27	2	I	Feb
8	3	I	Oct	28	3	I	Feb
9	4	II	Oct	29	4	II	Feb
10	5	II	Oct	30	5	II	Feb
11	1	I	Nov	31	1	I	Mar
12	2	I	Nov	32	2	I	Mar
13	3	I	Nov	33	3	I	Mar
14	4	II	Nov	34	4	II	Mar
15	5	II	Nov	35	5	II	Mar
16	1	I	Nov	36	1	I	Abr
17	2	I	Nov	37	2	I	Abr
18	3	I	Nov	38	3	I	Abr
19	4	II	Nov	39	4	II	Abr
20	5	II	Nov	40	5	II	Abr

^aZona I Hutzache, zona II Calmahero

ANEXO 6

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LOS VIRUSIDENTIFICADOS*PCR anidada de los Virus de hepatitis A**PCR semianidada de Norovirus*

LITERATURA CITADA

- Agus, S.G., Dolin R., Wyatt R.G., Tousimis A.J., and Northrup R.S. 1973.** Acute infection non bacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Annals of Internal Medicine*. **79**:18-25.
- Ando, T., Noel J.S., and Frankhauser R.L. 2000.** Genetic classification of Norwalk-like viruses. *The Journal Infection Disease*. **181**:S336-S348.
- Anonymous, 1979.** Council Directive of 30 october 1979 on the quality required of shellfish waters (79/923/EEC). Official Journal of European Communities L377, 48. Consultado en internet (2007):
http://europa.eu.int/eur-lex/en/consleg/pdf/1979/en_1979L0923_do_001.pdf
- Anónimo, 2007.** ECC Selective Agar. Consultado en Internet (2007):
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/85927>
- APHA. American Control Health Association. 1998.** Compendium of methods for the examination of water and wastewater. 4^{ta} ed. Editores Frances Pouch and Downes Keith Ito. Ed. APHA.
- APHA. American Control Health Association. 1998.** Compendium of methods for the microbial examination of foods. 4^{ta} ed. Ed. Frances Pouch Downes Keith Ito.
- Atha, D.H., and Ingham K.C. 1981.** Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols: analysis in terms of excluded volumes. *Journal Biological Chemical*. **256**: 12108-12117.

Atmar, R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Guyader F.L., Woodley C.M., Metcalf T.G., and Estes M.K. 1995. Detection of norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**:3014-3018.

Bertolotti-Ciarlet, A., White L.J., Chen R., Prasad B.V.V., and Estes M.K. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of Virology*. **76**: 4044-4055.

Berg, G. 1983. Viral pollution of water. Viral pollution of the environment. Ed. G. Berg. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 1-16. Department of Microbiology, University of Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

Bhat R. and Timassheff S.N. 1992. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein science*. **1**:1133-1143.

Bitton, G. 1994. Wastewater microbiology. Ed. Wiley-Liss. pp. 83-94.

Boletín CIAD, 2005. Cabanillas-Beltrán, H., García-Gasca A. y Gómez-Gil B. 2005. Estudio de un brote epidemiológico de gastroenteritis en el sur del estado de Sinaloa, México. CIAD, Unidad Mazatlán. Consultado en internet (2006): <http://www.ciad.mx/boletin/marabr05/Estudio.pdf>

Borchardt, M.A., Hass N.L., and Hunt R.J. 2004. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**:5937-5946.

Brooks, F.G., 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Geo F Brooks, Janet S Butel y L. Nicholas Ornston. 18ª ed. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Cap. 35.

- Caballero, B., Trugo L.C., and Finglas M.P. 2003.** Membrane techniques. Principles of ultrafiltration. *Enciclopedia of Food Sciences and Nutrition*. **6**:3837-3848.
- Cabanillas-Beltrán, H., Liausás-Magaña E., Romero R., Espinoza A., García-Gasca A., Nishibuchi M., Ishibashi M., and Gómez-Gil B. 2006.** Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters*. **265**:76-80.
- Carter, M.J. 2005.** Enterocally infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 1354-1380.
- CDC, 2002. Centers for Disease Control and Prevention.** Disease burden from hepatitis A, B and C in the United States. 9 de octubre de 2002. Consultado en internet (2006): <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/resource/>.
- Chakravarty, S., Hutson A.M., Estes M.K., and Prasad B.V.V. 2005.** Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *Journal of Virology* .**79**: 554-568.
- Costa-Mattioli, M., Napoli A.D., Ferré V., Billaudel S., Perez-Bercoff R., and Cristina J. 2003.** Genetic variability of hepatitis A virus. *Journal of general virology*. **84**: 3191-3201.
- Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. CE-CCA-001/89.** Instituto Nacional de Ecología. Consultado en internet (2007): <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/191/criterios.html>
- Croci, L., Ciccozzi M., Medici D.D., Pasquele S.D., Fiore A., Mele A., and Toti L. 1999.** Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *Journal of Applied Microbiology*. **87**: 884-888.

Dalton, C.B., Haddix A., Hoffman R.E. and Mast E.E. 1996. The cost of a foodborne outbreak of a hepatitis A in Denver Colorado. *Archives of Internal Medicine*. **156**: 1013-1016.

Divizia, M., Santi A.L., and Pana A. 1988. Ultrafiltration: an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration. *Journal of Virological Methods*. **23**: 55-62.

Dovichi, N.J., and Zhang J.Z. 2001. DNA sequencing by capillary array electrophoresis. *Methods Molecular Biology*. **162**:95-94.

Dufour, A.P., T.H. Ericksen, R.K. Ballentine, V.J. Cabelli, M. Goldberg, and W.E. Fox. 1986. Bacteriological ambient water quality criteria for marine and fresh recreational waters. Ambient water quality criteria for bacteria. EPA 44075-84-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

DUMAC. 2005. Humedales costeros de importancia para aves playeras. Sistema Lagunar Huizache-Caimanero, Sinaloa. Consultado en Internet en 2006: www.dumac.org.

EPAa. Environmental Protection Agency 1998. Estuaries and your coastal watershed. 842-F-98-009.

EPAb. Environmental Protection Agency 1998. The Volunteer Monitor. The National Newsletter of Volunteer Water Quality Monitoring.10:2

EPAc Environmental Protection Agency 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Detection of enteric viruses. 9510.

EPA. Environmental Protection Agency 2006. Volunteer estuary monitoring. 842-B-93-004. A methods manual. 2^{da} ed. Ohrel L.R. and Registrar M.K

FAO, 1993. Manejo y aprovechamiento acuícola de lagunas costeras en América Latina y el Caribe. Consultado en internet (2007):

<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB485S/AB485S05.htm>

Galindo, J.G., Medina M.A., Villagrana C. and Ibarra L. 1997. Environmental and pollution condition of the Hulzache-Caimanero lagoon, in the north-west of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. **34**:1072-1077.

Gerba, C.P. 2000. Assessment of enteric pathogens shedding during recreational activity and its impact on water quality. *Quantitative Microbiology*. **2**:55-68.

Gerba, C.P., Rose J.B. and Haas C.N. 1996. Sensitive populations: who is a greatest risk?. *International Journal of Food Microbiology*. **30**:113.123.

Germinario, C., Lopalco P.L., Chicanna M., and Da Villa G. 2000. From hepatitis B to hepatitis A and B prevention: the Puglia (Italy) experience. *Vaccine*. **18**:83-85.

Graham, D.Y., Jiang X., Tanaka T., Opekun A.R., Madore H.P. and Estes M.K. 1994. Norwalk virus infection in volunteers: new insights based on improved assays. *Journal of Infectious Disease*. **170**:34-43.

Green, K.Y., Ando T., Balayan M.S. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *Journal of Infective Disease*. **181**:322-330.

Green, K.Y., Kapikian A.Z. and Chanock R.M. 2001. Human caliciviruses. Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E. *Fields virology*, 4thed. pp. 841-874.

Griffin, W.D., Gibson III J.C., Lipp K.E., Riley K., Paul III H.J., and Rose B.J. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida keys. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:4118-4125.

- Griffin, D.W., Donaldson K.A., Paul J.H., and Rose J.B. 2001.** Marine recreation and public health microbiology:ques for the ideal indicador. *BioScience*. 51:817-825.
- Gust, I.D., Lehmann N.I., Crowe S., McCrorie M., Locarnini S.A., and Lucas C.R. 1985.** The origin of the HM-175 strain of Hepatitis A virus. *Journal of Infective Disease*. 151:365-367.
- Guttman-Bass, N., and Armon R. 1983.** Concentration of simian rotavirus SA-11 from tap water by membrana and organic flocculation. *Applied and Environmental Microbiology*. 45:850-855.
- Guyader L., Neill F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T., and Atmar R.L. 1996.** Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oyster implicated in a outbreak of acute gastroenteritis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4268-4272.
- Hadler, S.C., Webster H.M., Erben J.J., Swanson J.E., and Maynard J.E. 1980.** Hepatitis A in day-care centers. A community-wide assessment. *The New England Journal of Medicine*. 302:1222-1227.
- Hall, T.A. 1999.** **BioEdit:** A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuclei Acids Secuencing and Mapping*. Ser. 41:95-98.
- Hill, V.R., Polaczyk A.M., Hahn D., Narayanan J., Cromeans T., Roberts J.M. and Amburgey J.E. 2005.** Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6878-6884.
- Hollinger, F.B., and Emerson S.U. 2001.** Hepatitis A virus. In fields virology, 4thed. Ed. Knipe D.M. and Howley P.M. Nueva York. pp. 799-840.

- Horman, A., Rimhanen-Finne R., Maunula L., Bonsdorff C., Torvela N., Heikinheimo A., and Hanninen M. 2003. *Campylobacter* spp., *giardia* spp., *cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organism in surface water in Southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology*. 1:87-95.
- Instituto Nacional de Pesca, 1999. Pesquerías del Pacífico. Consultado en internet (2007):http://cripens.inp.gob.mx/sust_pesc_resp_ev_manejo_1999_2000/Pacifico/camapac.pdf.
- Jiang, X., Graham D., Wang K. and Estes M. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*. 250: 1580-1583.
- Jiang, X., Graham D., Wang K. and Estes M. 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*. 195: 51-61.
- Kapikian, A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., and Chanock R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with a acute infectious non-bacterial gastroenteritis in US adults. *Journal of Virology*. 10: 1075-1081.
- Katayama, H., Shimasaki A., and Ohgaki S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 3:1033-1039.
- Keswick, B.H., Satterwhite T.K., Johnson P.C., Dupont H.L., Secor S.L., Bitsura J.A., Gary G.W., and Hoff J.C. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking-water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 261-264.
- Kingsley, H.D., and Richards P.R. 2001. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4152-4157.

- Koopmans, M.P., von Bonsdorff C.H., Vinjé J., DeMedici D. and Monroe S.S. 2002.** Foodborne enteric viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**: 187-205.
- Kumar S., Tamura K., and Nei M. 2004.** **Mega 3.1**: Integrated software for molecular evolutionary genetics and lysis sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*. **5**:150-163.
- Laverick, M.A., Wyn-Jones A.P., and Carter M.J. 2004.** Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Letters in Applied Microbiology*. **2**:127-136.
- Lee, J.C., and Lee L.L. 1981.** Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols. *Jornal Biological Chemical*. **256**: 625-631.
- Lenfant, C. 1994.** From the National Institute of Health. *The Journal of the American Medical Association*. **272**: 842.
- Lewis, G.D., and Metcalf T.G. 1988.** Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 1983-1988.
- Lipp, E.K., Lukasik J. and Rose J.B. 2001.** Human enteric viruses and parasites in the marine environment. *Methods in Microbiology*. **30**: 559:588.
- Lukasik, J., Scott T.M., Andryshak D., and Farrah S.R. 2000.** Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 2914-2920.
- Luque, C.J y Herráez S.A. 2001.** *Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.* Ed. Harcourt. Tema 15.

- Macías-Regalado, E. 1981.** Variación diurna de la densidad de postlarvas de camarón, en la boca del Sistema Lagunar El Huizache-Caimanero Sin., México (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.*
- Maier, M.R., Pepper I.L., and Gerba C.P. 2000.** Environmentally transmitted pathogens. Capítulo 19. *Environmental Microbiology*. Ed. Academia Press. pp. 447-487.
- Maunula, L., Miettinen I.T. and Bonsdorff C. 2005.** Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 1717-1721.
- McCarthy, M., Estes M.K. and Hyams K.C. 2000.** Norwalk-like virus infection in military forces: epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts. *Journal of Infection Disease*. 181: 387-391.
- Mondelli M.U., Cerino A., Bono F., Cividini A., Maccabruni A., Arico M., Malfitano A., Barbarini G., Piazza V., Minoli L., and Silini E. 1994.** Hepatitis C (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:2523-2527.
- Morace G., Aulicino F.A., Angelozzi C., Costanzo L., Donadio F. and Rapicetta M. 2002.** Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 92:828-836.
- Morales-Morales, H.A., Vidal G., Olszewisky J., Rock M., Desgupta D., Oshima H., and Smith B. 2003.** Optimization of reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4098-4102.

- Nainan, O.V., Margolis H.S. Robertson B.H., Balayan M., and Brinton M.A. 1991.** Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology*. **72**:1685-1689.
- Normann, A., Graff J., and Flehmig B. 1994.** Detection of hepatitis A virus in a factor VII preparation by antigen capture/PCR. *Vox Sang*. **67**: 57-61.
- Olszewiski, J., Winona L., and Oshima K.H. 2005.** Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology*. **51**:295-303.
- Pallin, R., Wyn-Jones A.P., Place B.M., and Lightfoot N.F. 1997.** The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*. **67**: 57-67.
- Parrino, T.A., Schreiber D.S, Trier J.S., Kapikian A.Z. and Blacklow N.R. 1977.** Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by the Norwalk agent. *The New England Journal of Medicine*. **297**:86-89.
- Pérez, C.L., Nuñez E.J., Villagómez Z.D., Nicoli T.M., and Rubio L.M. 2005.** Bacteriological harmlessness in mexican export shrimp. *Veterinaria México*. **36**: 411-423.
- Persing, H.D., Tenover C.F., Versalovic J., Tang Y., Unger R.R., Relman A.D., and Thomas W.J. 2004.** Molecular Microbiology. Diagnostic principles and practice. Ed. ASM PRESS. Capítulo 12-13. pp 153-180.
- Prasad B.V.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.J., and Estes M.K. 1999.** X-ray crystallographic structure of the norwalk virus capsid. *Science*. **286**:287-290.

- Presscott, L.M., Harley P.J., and Klein A.D. 2002.** Los virus: virus de eucariotas. Capítulo 18. Microbiología. 5^{ta} ed. Ed. McGraw Hill Interamericana. pp 429-440.
- Reid, J.A., Caul E.O., White D.G. and Palmer S. 1988.** Role of the infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control. *Lancet*. **2**:321-323.
- Robertson, B.H., Jansen R.W. and Khanna B. 1992.** Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from diferente geographical regions. *Journal of General Virology*. **73**:1365-1377.
- Romalde, J.L., Area E., Sánchez G., Ribao C., Torrado I., Abad X., Pintó R.M., Barja J.L and Bosch A. 2001.** Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology*. **74**:119-130.
- Rose, J.B. 1986.** Microbial aspects of wastewater reuse for irrigation. *Critical Reviews in Environmental Control*. **16**: 231-256.
- Rose, J.B., Dickson L.J., Farrah S.R. and Carnahan R.P. 1996.** Removal of pathogenic and indicator microorganism by a full-scale water undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**:570-573.
- Rosenthal, N. 1994.** Tools of the trade. recombinant DNA. *The New England Journal Medicine*. **331**:315-317.
- Ross, B.C., and Anderson D.A. 1991.** Characterization of hepatitis A virus capsid proteins with antisera raised to recombinant antigens. *Journal of Virology Methods* **32**: 213-220.

SAGARPA, 2003. Evaluación del uso de purina en la captura de camarón en la lagunar el Caimanero, Sinaloa, México. Instituto Nacional de la Pesca. Consultado en internet (2007): <http://www.inp.sagarpa.gob.mx/Dictámenes/Purinacaiman2.PDF>.

SAGARPA, 2006. Publicación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Año 1(25). Consultado en internet (2007): <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/sembrando>.

Sair, A.I., D'Souza D.H., and Jaykus L.A. 2002. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1:73-89.

Sánchez, G., Pinto M.R., Vanaclocha H., and Bosch A. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:4148-4155.

SEMARNAP, 2007. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. La calidad del agua en los ecosistemas costeros de México. Consultado en internet (2007): <http://e-mar.sct.gob.mx/fileadmin/biblioteca/ecologia/308.pdf>

Slomka, M.J., and Apleton H. 1998. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of a small round structured viruses in shellfish. *Epidemiologic Infection*. 121: 401-407.

Springthorpe, V.S., Loh C.L., Robertosn W.J., and Sattar S.A. 1993. In situ survival of indicator bacteria, MS-2 phages and human pathogenic viruses in river water. *Water Science and Technology*. 27:413-420.

Tang, M., and Jiang X. 2005. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology*, 79:14017-14030.

- Tortora, G., Funke B. and Case C. 1994.** Microbial disease of the digestive system. Microbiology. 5th ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. P. 627-629.
- Tsarev, S.A., Emerson S.U., Balayan M.S., Ticehurst J. and Purcell R.H. 1991.** Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *Journal of General Virology*, **72**: 1677-1683.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 2001.** Manual of methods for virology, EPA/600/4-84/013 (N16).
- U.S. Environmental Protection Agency 1992.** Manual on guidelines for water reuse. EPA/625/R-92/004. Center for environmental reservation information, Cincinnati, Ohio.
- U.S. Environmental Protection Agency 2001.** Manual of methods for virology, EPA/600/4-84/013 (N16).
- Vinje, J., Hamidjaja R.A., and Sobsey M.D. 2003.** Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*. **116**:109-117.
- Vinje, J. and Koopmans M.P. 2000.** Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**:2595-2601.
- Winona, L.J., Ommani A.W., Olszewski J., Nuzzo J.B. and Oshima K.H. 2001.** Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**:1033-1041.
- Wyn-Jones, A.P. and Sellwood J. 2001.** A review: enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*. **91**:945-962.

Yates, M., and Yates S. 1988. Modeling microbial fate in the subsurface environment. *Critical Reviews in Environmental Control*. 17:307-344.