

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

Detección, Identificación y Estimación de Riesgo de
Norovirus y Virus de Hepatitis A Presentes en Agua de
Mar de Playas de Sinaloa

Por:

Yuridia Lizet Cháidez Fernández

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y
SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Diciembre de 2006

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

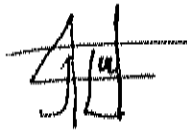
Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación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

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

Dr. Alfonso A. Gardea Bejar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Yuridia Lizet Cháidez Fernández, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



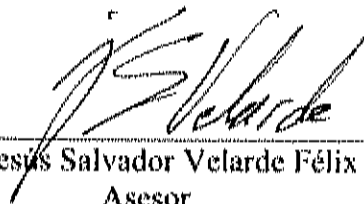
Dra. Josefina León Félix
Director de Tesis



Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz
Asesor



Dr. José Benigno Valdez Torres
Asesor



Dr. Jesús Salvador Velarde Félix
Asesor

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota".

Madre Teresa de Calcuta

"La ciencia se compone de errores que a su vez son los pasos hacia la verdad".

Julio Verne

Dedicatoria:

Con todo amor y cariño para mis padres Fermín Cháidez Quintero y María del Refugio Fernández Ayón, quienes siempre me han conducido para ser lo que soy y me han impulsado para cumplir todos mis sueños. A mis hermanos Lleimi Nadeida Cháidez Fernández, Leonel Cháidez Fernández y Aidé Cháidez Fernández por creer en mí y por apoyarme en todo momento, a un angelito que acaba de llegar a nuestras vidas María José y a toda mi familia que es el impulso para seguir adelante.

A ti Roberto Cabada Rodríguez por tu gran amor, por mantener encendida la luz en mi vida y tu apoyo incondicional.

¡Gracias!

Agradecimientos:

En el desarrollo de este trabajo participaron muchas personas que contribuyeron a su realización y a quienes agradezco enormemente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Comisión Nacional del Agua (CNA) por su apoyo económico.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por las facilidades otorgadas para continuar con mis estudios.

De manera muy especial doy las gracias a la Dra. Josefina León Félix, quien depositó en mí su confianza y por proporcionarme lo que sé y gran parte de su tiempo.

De la misma forma agradezco al Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz, por la oportunidad que me brindó de participar en este trabajo y formar parte del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos porque siempre me dio ánimos para seguir adelante.

Al Dr. José Benigno Valdéz Torres por sus acertadas asesorías, por todo su apoyo y porque le dio otro giro a este trabajo.

Al Dr. Jesús Salvador Velarde Félix por su colaboración y apoyo para la realización de esta tesis.

A todos mis profesores de maestría por compartir un poquito de su conocimiento: Dra. Dolores Muy Rangel, Dr. Jorge H. Siller Cepeda, Dr. Miguel Ángel

Angulo Escalante Dr. Raymundo García Estrada, Dr. Tomás Osuna Enciso y M.C. Armando Carrillo Facio.

A la Q.F.B. Célida Isabel Martínez Rodríguez y la M.C. Johana Marcela Soto Beltrán quienes siempre estuvieron orientándome y pendientes de lo que me hacía falta para sacar adelante este trabajo.

Al Q.F.B. Andrés Medrano Félix y Biól. Néstor Abraham Gallardo Zazueta por su gran ayuda y disposición durante los muestreos.

A la M.C. Rosabel Velez, M.C. Adriana Sañudo, I.B.Q. Rosalba Contreras y M.C. Laura Contreras, por su alegría y por proporcionarme todas las facilidades de equipo y material de laboratorio.

Y de manera muy especial a mis compañeros y amigos de maestría Blanca, Dalia, Edith, Elizabeth, Hilario, Iris, Iván, Marina y Vania, porque nos subimos juntos en este barco, por apoyarnos y por todos los momentos de preocupaciones, alegrías y retos que vivimos durante este tiempo.

A Evelia, Xiomara y Mayra, por su ayuda en el área administrativa.

A Victor Alarcón, por su ánimo y por transmitirse su alegría en todo momento.

Y a todos aquellos que me brindaron una sonrisa y palabras de aliento, porque todos formamos parte de un equipo.

A todos muchas gracias!!!

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos.....	7
HIPÓTESIS.....	8
METAS	8
REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
Planteamiento del Problema.....	9
Importancia del Agua de Uso Recreativo en México	10
Alteración de la Calidad del Agua de Uso Recreativo y sus Efectos a la Salud.....	12
Indicadores Microbiológicos de Contaminación Fecal.....	13
Indicadores Microbiológicos de Contaminación Viral	16
Distribución de los Virus en el Medio Acuático	18
Virus Entéricos.....	19

Microorganismos en Estudio	21
Norovirus	21
Morfología.	22
Genoma y proteínas.....	22
Diversidad genética.....	23
Estabilidad en el ambiente.	23
Patogenicidad.	23
Epidemiología.	24
Virus de Hepatitis A.....	25
Morfología.	26
Genoma y proteínas.....	26
Diversidad genética.....	27
Estabilidad en el ambiente.	28
Patogenicidad.	28
Epidemiología.	29
Métodos de Concentración de Virus Entéricos en el Agua	30
Método Adsorción-Elución.....	32
Métodos de Detección e Identificación de Virus en Muestras Ambientales	35
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	38
Técnica de ADN Recombinante.....	40

Elementos de la tecnología del ADN recombinante	40
Enzimas de restricción	40
Vectores de clonación	41
Hospederos	42
Transfección	42
Clonación de ADN	42
Secuenciación de ADN	43
Método químico	44
Método enzimático o método de la terminación dideoxi	44
Análisis Filogenético	46
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Puntos de Muestreo	48
Procedimiento de Muestreo	51
Recuperación de Virus a Partir de Agua de Mar	51
Filtración-Adsorción	52
Elución	52
Concentración	53
Detección de NV y VHA	54
Extracción de ARN viral	54
Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	54
Identificación de NV y VHA	59

Clonación	59
PCR	59
Poliadenilación	61
Reacción de ligación	61
Transformación de bacterias	62
Análisis de bacterias transformadas	63
Aislamiento y Purificación de ADN Plasmídico	63
Protocolo de lisis alcalina.....	63
Digestión con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	64
Aislamiento y purificación de ADN plasmídico para secuenciación.....	65
Purificación de ADN a partir de agarosa para secuenciación	66
Análisis Filogenético.....	67
ANÁLISIS DE RESULTADOS	70
Análisis Estadístico	70
Regresión Logística Binaria.....	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
Análisis Estadístico	76
Análisis Descriptivo	76
Predicción de Riesgos	89
Predicción de riesgos para NV	90
Predicción de riesgos para VHA.....	101

Análisis Filogenético.....	104
Análisis de secuencia de NV.....	104
Análisis de secuencia de VHA.....	108
CONCLUSIONES	113
SUGERENCIAS	115
ANEXO I.....	116
LITERATURA CITADA	121

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
A	Adenina
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ADNc	Ácido deoxirribonucleico complementario
APHA	American Public Health Association
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
BSA	Suero de albúmina bovina
C	Citosina
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CNA	Comisión Nacional del Agua
COFEPRIS	Comisión Nacional para la Protección contra Riesgos Sanitarios
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoR1</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa RV 13 primera endonucleasa aislada de esta cepa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gravedad
G	Guanina
gal	Galón
gr	Gramo
Has	Hectáreas

HCl	Ácido clorhídrico
hr	Hora
kb	Kilobases
kD	Kilodaltones
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
Km ³	Kilómetro cúbico
L	Litro
LB	Luria Bertani
m	Metro
M	Molar
m ³	Metro cúbico
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
Na ₂ PO ₄	Fosfato de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetro
NMWL	Peso molecular nominal límite
NV	Norovirus
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Open Reading Frame
P	Fósforo
pb	Pares de bases

PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial de Hidrógeno
pg	Picogramo
ppt	Partes por thousand
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo
S	Azufre
T	Timina
TAE	Tris Acetato EDTA
u	Unidad
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UFP	Unidad Formadora de Placas
UNT	Unidades Nefelométricas
VHA	Virus de Hepatitis A
VP	Proteína viral
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
°C	Centígrados

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Enfermedades producidas por virus entéricos.....	20
Cuadro 2. Métodos de concentración de virus en agua.....	31
Cuadro 3. Número de muestras recolectadas en la Bahía de Altata y Mazatlán.....	50
Cuadro 4. Mezcla maestra para RT-PCR de NV	55
Cuadro 5. Mezcla maestra para RT-PCR de VHA	56
Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados para la detección de NV por RT-PCR.....	56
Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados para la detección de VHA por RT-PCR.....	57
Cuadro 8. Condiciones de amplificación para NV.....	57
Cuadro 9. Condiciones de amplificación para VHA.....	58
Cuadro 10. Mezcla maestra para PCR de NV y VHA	59
Cuadro 11. Condiciones de amplificación para NV.....	60
Cuadro 12. Condiciones de amplificación para VHA.....	60
Cuadro 13. Reacción de ligación	62
Cuadro 14. Digestión del ADN plasmídico con <i>EcoRI</i>	64
Cuadro 15. Cepas de NV usadas para el análisis filogenético	68
Cuadro 16. Cepas de VHA usadas para el análisis filogenético	69
Cuadro 17. Parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio en la Bahía de Altata	89
Cuadro 18. Parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio en Mazatlán	89
Cuadro 19. Análisis de regresión logística. NV vs T, Tu, S	90

Cuadro 20. Riesgo de presencia de NV	100
Cuadro 21. Análisis de regresión logística. VHA vs T, Tu, S	102
Cuadro 22. Alineamiento de secuencias de la región A del genoma de cepas de NV... ..	105
Cuadro 23. Alineamiento de secuencias de la interfase VP1-VP2 de cepas de VHA. ..	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma de NV.....	22
Figura 2. Organización del genoma del VHA.....	27
Figura 3. Procedimiento para la recolección de muestra y análisis de virus en agua.	34
Figura 4. Etapas de la RT-PCR.....	39
Figura 5. Localización de los puntos de muestreo en la Bahía de Altata.....	49
Figura 6. Localización de los puntos de muestreo en Mazatlán.	50
Figura 7. Función logística.....	71
Figura 8. Porcentaje de muestras positivas y negativas	76
Figura 9. Porcentaje de muestras positivas en la Bahía de Altata y Mazatlán.....	77
Figura 10. Porcentaje de muestras positivas de NV en la Bahía de Altata y Mazatlán ...	78
Figura 11. Presencia de NV por zonas en la Bahía de Altata y Mazatlán.....	79
Figura 12. Porcentaje de muestras positivas de VHA en la Bahía de Altata y Mazatlán	80
Figura 13. Presencia de VHA por zonas en Mazatlán	81
Figura 14. Análisis filogenético de cepas de NV.....	106
Figura 15. Análisis filogenético de cepas de VHA	111

RESUMEN

El rápido crecimiento de la población asociado al desarrollo de las costas, han aumentado el nivel de contaminación de las aguas costeras y el riesgo de adquirir enfermedades por contacto directo o ingestión de agua durante el uso recreativo de las mismas; por la descarga de aguas residuales que son fuente de microorganismos patógenos como los virus entéricos. Entre los virus entéricos de mayor importancia, que representan un riesgo de salud pública, transmitidos por agua se encuentran NV y VHA, asociados a gastroenteritis aguda y Hepatitis tipo A, respectivamente.

A pesar del riesgo sanitario que las aguas de uso recreativo representan para la salud humana, no existen límites que regulen la presencia de microorganismos patógenos. La OMS utiliza como indicadores bacterianos de contaminación fecal en aguas de uso recreativo los *Enterococos intestinales*, que muestran limitaciones para reflejar la presencia de virus entéricos en agua de mar de uso recreativo.

En México, no se dispone de información sobre la incidencia de virus entéricos en playas de uso recreativo, que representan riesgos a la salud e impacto económico negativo, al convertirlas en no aptas para realizar actividades recreativas. Por lo que, el propósito del presente estudio fue detectar, identificar y estimar el riesgo de presencia de NV y VHA, en agua de mar en la Bahía de Altata y playas de Mazatlán en el estado de Sinaloa.

La metodología utilizada en este trabajo, consistió en la toma de muestra quincenal durante 4 meses, en dos zonas de la Bahía de Altata y tres zonas de Mazatlán. A la muestra de agua se le determinó la temperatura, pH, turbidez y salinidad. Las muestras se procesaron en base al método adsorción-elución 9510-C, establecido por la APHA, que consistió en la filtración de 250L de agua de mar a través de un filtro electronegativo de 0.45µm de porosidad. Las partículas virales retenidas en el filtro, se eluyeron con extracto de carne al 3%, se concentraron mediante floculación orgánica y posteriormente, por ultrafiltración con un Centricon 100 microconcentrador.

Para detectar los virus se usó la técnica de RT-PCR, amplificando un fragmento del gen de la región A del genoma (327pb) de NV y de la interfase de las proteínas de la cápside VP1-VP2 (192pb) de VHA. Para la identificación de los virus, se clonaron los productos obtenidos de cada uno de los virus en el vector pCR 4-TOPO, utilizando células de *Escherichia coli* (TOP 10) químicamente competentes. Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico para su secuenciación y análisis por comparación en la base de datos NCBI. Por último, se realizó el análisis filogenético con el programa MEGA 3.1. El análisis de riesgos del efecto de los factores fisicoquímicos (temperatura, turbidez y salinidad) en la presencia/ausencia de NV y VHA en agua de mar, se realizó con el modelo de Regresión Logística Binaria.

Se encontró la presencia de virus en el 56.25% (18/32) de las muestras analizadas y sólo en el 6.25% (2/32) se detectaron simultáneamente ambos virus (NV y VHA). El 12.5% (4/32) de las muestras positivas se encontraron en la Bahía de Altata y el 43.75%

(14/32) en Mazatlán. Se detectó la presencia de NV en el 46.875% (15/32) de las muestras analizadas, de las cuales 4 se detectaron en la Bahía de Altata y 11 en Mazatlán. Se detectó VHA en 15% (3/20) de las muestras analizadas en Mazatlán. El virus que se detectó con mayor frecuencia en las 32 muestras fue NV.

El análisis de riesgos mostró que incrementos unitarios en las variables temperatura, turbidez y salinidad disminuyen el riesgo de presencia de NV en agua de mar. Mientras, que ninguno de los parámetros fisicoquímicos mostró efecto significativo sobre la presencia de VHA en agua de mar.

El análisis comparativo entre la secuencia de nucleótidos de las muestras M1, M19 y M20 con las secuencias de la base de datos (NCBI) mostró asociación con NV. El análisis filogenético mostró que las muestras se encuentran dentro del genogrupo II con un porcentaje de identidad de 55-81.8% con cepas de ese genogrupo. Por otra parte, el análisis confirmó que las muestras M1 y M2 se encuentran asociadas a VHA, dentro del genotipo I subgenotipo B, con un porcentaje de identidad de 94.2-99.4%.

La presencia de NV y VHA en agua de mar de uso recreativo, sugiere que el análisis de microorganismos patógenos como los virus, es de considerable interés para prevenir la diseminación de infecciones y efectos adversos a la salud de los propios usuarios.

ABSTRACT

The fast growth population associated with coastal development have increased the level of contamination of coastal waters and the risk of acquiring diseases by direct contact or water ingestion during the recreational use of them, to the discharge of wastewater, main source of pathogenic microorganisms like enteric viruses. Between enteric viruses of greater importance that represent a risk of public health, transmitted by water are NV and HAV, associated to acute gastroenteritis and Hepatitis type A, respectively.

In spite of the sanitary risk that waters of recreational use represent for the human health, limits do not exist that regulate the presence of pathogenic microorganisms. The WHO utilizes as bacterial indicators of fecal contamination in water of recreational use the *Intestinal Enterococci* that shows limitations to reflect the presence of enteric viruses in water of recreational use.

In Mexico, the information is limited about the incidence of enteric viruses in beaches of recreational use that represent health risks and economic negative impact to convert them do not competent to realize recreational activities. The objective of this study was to detect, identify and estimate the risk of presence of NV and HAV in seawater of Altata Bay and beaches of Mazatlan in Sinaloa.

The methodology used in this work consisted in collect water samples biweekly during 4 months, of two zones of the Altata Bay and three zones of Mazatlan. To the

water sample measured temperature, pH, turbidity and salinity. The samples was processed by the adsorption-elution method 9510-C as outlined in APHA. Consisted in filter 250 liters of seawater with a negatively charged cartridge filter of 0.45 μ m pore size. The retained viral particles in the filter were eluted with 3% beef extract solution, viruses were further concentrated by organic flocculation and lastly by ultrafiltration with a Centricon 100 microconcentrator.

In order to detect the viruses the RT-PCR technique was used, amplifying a fragment of gene from the Region A of the genome (327bp) of NV and the VP1 and VP2 capsid protein interphase (192bp) of HAV. For the identification of the virus, the obtained product was ligated into the pCR 4-TOPO vector and transformed into chemically competent *E. coli* strain TOP 10. Then, plasmid DNA was extracted and purified for its sequenciation and analysis by comparison in the data base NCBI. Last, phylogenetic analysis was made with the MEGA 3.1. The risks analysis of the effect of physicochemical factors (temperature, turbidity and salinity) in the presence/ausence of NV and HAV in seawater was made with the model of Binary Logistic Regression.

Viruses were found in the 56.25% (18/32) of the analyzed samples and both virus (NV and HAV) were detected simultaneously in the 6.25% (2/32) of the samples. The 12.5% (4/32) of the positive samples were detected in Altata Bay and the 43.75% (14/32) in Mazatlan. The presence of NV was detected in 46.875% (15/32) of analyzed samples, of which 4 were detected in the Altata Bay and 11 in Mazatlan. HAV was

detected in 15% (3/20) of analyzed samples in Mazatlán. The most frequently detected viruses in the 32 samples were NV.

Risks assessment showed that unitary increments in the variables temperature, turbidity and salinity diminish the risk of presence of NV in seawater. While, the physicochemical parameters does not showed significant effect on the presence of VHA in seawater.

The comparative analysis between the nucleotides sequence of the samples M1, M19 and M20 with the sequences of the data base (NCBI) showed association with NV. Phylogenetic analysis showed that the samples are within genogroup II with a percentage of identity of 55-81.8% with the strains of that genogroup. On the other hand, the analysis confirmed that the samples M1 and M2 are associated to HAV, within genotype I subgenotype B, with a percentage of identity of 94.2-99.4%.

The presence of NV and HAV in seawater of recreational use, suggests the analysis of pathogenic microorganisms like viruses is of considerable interest, to prevent the dissemination of infections and adverse effects to the health of users.

INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento de la población mundial, la urbanización y la expansión de la agricultura, han provocado el deterioro de la calidad del agua, por el incremento sustancial de desechos tóxicos y la descarga de aguas residuales tratadas y no tratadas a los cuerpos de agua (Toledo, 2005). En México, aproximadamente el 20% del agua residual es sometida a algún tipo de desinfección, lo que significa que el 80% restante se vierte en los cuerpos de agua, sin ningún tratamiento previo, ocasionando la contaminación de éstos y en consecuencia, una menor disponibilidad del agua (SEMARNAT, 2005b) para uso y consumo humano (Toledo, 2005).

La descarga de aguas residuales en ríos, lagos o mares, representa un serio problema de salud pública (OMS, 2003a), ya que, son fuente de microorganismos patógenos como bacterias, protozoarios y virus, los cuales, pueden ser transmitidos a la población a través del contacto directo o ingestión de agua al realizar actividades recreativas (Tejedor *et al.*, 2005). Las personas en contacto con agua de mar para uso recreativo contaminada, están en riesgo de adquirir diversas enfermedades como gastroenteritis, hepatitis, infecciones respiratorias e infecciones en oídos, ojos, nariz y garganta (Griffin *et al.*, 2003; Bofill-Mas *et al.*, 2005).

Diversos estudios epidemiológicos, confirman que existe correlación entre la contaminación del agua de mar y el padecimiento de enfermedades por los propios usuarios (Dorfman, 2004). En Hong Kong durante 1990, se presentaron 400,000 casos

de infecciones en ojos, piel y sistema respiratorio, atribuidas a la exposición con agua de mar contaminada (Cheung *et al.*, 1990). En la Bahía de Santa Mónica, California, se reportaron 373 personas que presentaron síntomas de enfermedades después de haber estado en contacto con el agua, recomendando la implementación del análisis de virus en agua (Haile *et al.*, 1996).

Los virus constituyen una de las principales causas de enfermedades infecciosas relacionadas con el contacto o consumo de agua de mar para uso recreativo (Griffin *et al.*, 2003). Entre los virus entéricos de mayor importancia, se encuentran los Norovirus (NV) y Virus de la Hepatitis A (VHA), asociados a enfermedades como gastroenteritis aguda y Hepatitis tipo A, respectivamente (Kittigul *et al.*, 2006; Parshionikar *et al.*, 2003).

Los NV son la principal causa de brotes de gastroenteritis de origen viral tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Se ha estimado que son responsables del 90% de los casos que se presentan mundialmente (Haramoto *et al.*, 2004). Además, su importancia ha aumentado, debido a que, se han asociado a brotes de enfermedades por el uso de agua recreativa (Parshionikar *et al.*, 2003). Por su parte, el VHA, es la principal causa de hepatitis aguda en el mundo (Kittigul *et al.*, 2006) y representa el 87% de todas las enfermedades virales transmitidas por agua en Estados Unidos (Gesche *et al.*, 2003). México, se encuentra dentro de los países de mayor endemicidad a nivel mundial (CDC, 2006).

Los NV y VHA son transmitidos por la vía fecal-oral (Cuthbert, 2001) y son excretados en las heces de personas infectadas en altas concentraciones, por lo que, su presencia en aguas residuales, son causa inevitable de la contaminación de ríos, lagos o mares (APHA, 1999). Estos virus poseen una gran estabilidad y resistencia, permitiéndoles que en ocasiones los tratamientos de desinfección aplicados a las aguas residuales no consigan eliminarlos completamente (Bofill-Mas *et al.*, 2005). La concentración de virus en aguas residuales se ha estimado entre 1.82×10^2 y 9.2×10^4 Unidades Formadoras de Placas (UFP) por litro (Griffin *et al.*, 2003), permitiendo una amplia dispersión de éstos (Kittigul *et al.*, 2006).

A pesar, del riesgo sanitario que las aguas de uso recreativo representan para la salud humana, no se han establecido parámetros que regulen la presencia de virus patógenos. Los parámetros de calidad microbiológica del agua utilizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basan sólo en indicadores bacterianos (*Enterococos fecales*), que muestran limitaciones para reflejar la presencia de virus entéricos, ya que éstos son más resistentes que los indicadores bacterianos en condiciones ambientales y a los tratamientos de desinfección del agua (APHA, 1999; Pina, 2001; Mocé-Llivina *et al.*, 2005).

Sin embargo, los niveles aceptables de *Enterococos fecales*, establecidos por la OMS para aguas de uso recreativo, se basan en estudios epidemiológicos realizados con adultos saludables en contacto con agua de mar en países de climas templados que no representa las características de las aguas tropicales de la mayor parte de América Latina

y del Caribe (OMS, 2003a). Únicamente, la normativa europea establece la ausencia de enterovirus por cada 10 litros de agua (Directiva 80/778/CEE para agua de consumo, Directiva 76/160/CEE para agua de baño) (Pina, 2001). Otra alternativa como posibles indicadores virales son los bacteriófagos, que han mostrado cierto nivel de eficiencia (Mocé-Llivina *et al.*, 2005).

La baja concentración viral y las características del agua, contribuyen a que la detección de virus entéricos en agua sea un proceso complejo (Huang *et al.*, 2000). Dada la heterogeneidad de los diferentes tipos de agua, se carece de una metodología estandarizada que se aplique a todos los tipos de agua y todos los géneros de virus (Pina, 2001). El método de concentración más utilizado es el método adsorción-elución (Kittigul *et al.*, 2006).

Recientemente, las técnicas moleculares, han permitido la detección e identificación de virus en muestras ambientales; en particular, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP; del inglés PCR: Polymerase Chain Reaction) en conjunto con la retrotranscripción (RT-PCR), cuando el ácido nucleico viral es ARN (Schwab *et al.*, 1995; Kittigul *et al.*, 2006), proporcionando rapidez, sensibilidad y especificidad (Rosenfield *et al.*, 1999). Su uso presenta ventajas sobre los cultivos celulares, debido a que, éstos son técnicamente complejos, laboriosos y caros. Además ineficientes porque requieren de 1 a 6 semanas para proporcionar resultados (Fuhrman *et al.*, 2005). Las técnicas moleculares asociadas a la caracterización genética de los virus, permite obtener

información más completa de aquellos virus que no pueden cultivarse en líneas celulares como los NV (Bofill-Mas *et al.*, 2005).

El uso recreativo del agua, está aumentando en muchos países alrededor del mundo (OMS, 2003a), y México no es la excepción. La calidad del agua de uso recreativo, es un punto de interés para el sector turístico, ya que las playas adquieren un valor agregado al contar con un nivel aceptable de calidad (SSA, 2004). En nuestro país, durante el 2003 se implementó, el Programa Integral Playas Limpias, integrado por las Secretarías de Salud, de Medio Ambiente y Recursos Naturales, por conducto de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Comisión Nacional del Agua (CNA), con el objetivo de proteger la salud de los usuarios y mejorar la calidad de las playas nacionales (SECTUR, 2004), en el que se determina la calidad de agua de mar para uso recreativo, mediante, el análisis de los niveles de *Enterococos fecales* (SSA, 2004), siguiendo los lineamientos establecidos por la OMS (SECTUR, 2004).

En Sinaloa, las zonas de playa consideradas dentro del Programa Playas Limpias son Mazatlán y la Bahía de Altata; en el caso del primero es uno de los puertos más importantes de la costa del Pacífico, dotado de 10km de playa aptos para realizar diversas actividades acuáticas y cuenta con una gran infraestructura de servicios turísticos, razones por las cuales más de un millón de personas visitan este puerto. Y en el caso del segundo debido a que cuenta con extensas playas y se tiene proyectado su desarrollo como destino turístico de calidad internacional (SECTUR, 2004).

En la actualidad, en el país y en el estado no se dispone de información sobre la incidencia de virus entéricos, que representan riesgos para la salud, en playas de uso recreativo y de mayor afluencia turística. Por lo que, este estudio se planteó con el objetivo de detectar, identificar y estimar el riesgo de presencia de NV y VHA, en agua de mar en la Bahía de Altata y playas de Mazatlán en el estado de Sinaloa.

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar, identificar y estimar el riesgo de Norovirus y Virus de Hepatitis A presentes en agua de mar de playas de Sinaloa

Objetivos Específicos

1. Evaluar la presencia de Norovirus y Virus de hepatitis A en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán.
2. Estimar el riesgo de presencia/ausencia de Norovirus y Virus de Hepatitis A en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán en función de los factores fisicoquímicos temperatura, turbidez y salinidad.
3. Identificar los Norovirus (genogrupo) y Virus de Hepatitis A (genotipo) detectados en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán.

HIPÓTESIS

1. Norovirus y Virus de Hepatitis A están presentes en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán.
2. Los Norovirus y Virus de Hepatitis A detectados en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán, pertenecen a los genogrupos I, II y/o IV y al genotipo I, II, III y/o VII respectivamente.
3. Los factores fisicoquímicos temperatura, turbidez y salinidad afectan la presencia de Norovirus y Virus de Hepatitis A en agua de mar de la Bahía de Altata y Mazatlán.

METAS

1. Obtener información sobre la presencia de Norovirus y Virus de Hepatitis A en agua de mar de playas turísticas del estado de Sinaloa.
2. Definir un modelo matemático que permita predecir la presencia/ausencia de Norovirus y Virus de Hepatitis A en función de los factores fisicoquímicos temperatura, turbidez y salinidad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Planteamiento del Problema

En México, la información científica sobre la presencia de NV y VHA en agua de mar para uso recreativo es limitada. Su presencia representa un riesgo de salud pública para las personas que están en contacto directo con el agua, ya que, ésta puede servir como medio de transporte de estos microorganismos patógenos.

Por otra parte, la ausencia de normas y parámetros que regulen la presencia de virus patógenos en agua de uso recreativo y la utilización de los indicadores bacterianos, no garantizan la protección de la salud de los usuarios.

Dada la importancia del turismo en la economía mexicana, la presencia de NV y VHA puede generar un impacto económico negativo, ya que favorecen el deterioro de la calidad de las playas turísticas y las convierten en no aptas para realizar actividades recreativas.

Importancia del Agua de Uso Recreativo en México

Los océanos cubren aproximadamente tres cuartas partes de la superficie terrestre, lo que representa 97% del total de agua de nuestro planeta y el 3% restante corresponde a agua dulce. El 79% se encuentra en los glaciares y en los polos, un 20% está almacenada en mantos acuíferos o en el suelo y el 1% restante se encuentra en forma de aguas superficiales (Pepper *et al.*, 2006).

Aproximadamente, $113,000\text{km}^3$ de agua se precipitan cada año sobre la tierra con el ciclo hidrológico. De estos, alrededor de $71,000\text{km}^3$ se evaporan y retornan a la atmósfera, el resto, recarga los mantos acuíferos o regresan a los océanos a través de los ríos. Los volúmenes realmente disponibles se estiman entre $9,000$ a $14,000\text{km}^3$, de los que, el 70% sostienen los ecosistemas terrestres, lo que reduce a un 30%, la disponibilidad para uso humano (Toledo, 2005).

La navegación, agricultura, industria, generación de energía y los usos domésticos son las principales actividades económicas que dependen directamente del agua y han terminado por alterar su calidad (Toledo, 2005). En términos de los usos del agua, en el país, anualmente se utilizan 72,000 millones de m^3 . El 78% se usa en la agricultura y el 22% restante, se destina al uso público urbano, pecuario e industrial (Castillo, 2003).

En México, se generan alrededor de $420\text{m}^3/\text{s}$ de aguas residuales, de éstas las municipales generan $250\text{m}^3/\text{s}$ y las no municipales generan el resto. Gran parte de las

aguas residuales son descargadas en las zonas costeras, sin tratamiento previo, ocasionando contaminación y produciendo una degradación en la calidad del agua (Castillo, 2003). La zona costera de México representa un gran potencial de desarrollo, por lo que, se hace necesario su óptima utilización y conservación, que permita la realización de diversas actividades socioeconómicas (CONAPO, 1999).

Como ejemplo, el uso recreativo del agua costera o agua dulce (OMS, 2003a), donde se realizan actividades recreativas de contacto primario y/o secundario, que implican la inmersión intencional (natación, buceo) o incidental (navegación, pesca) del cuerpo en el agua (Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, 1992; OMS, 2003a). Las playas que cuentan con un alto nivel de calidad, impactan de manera positiva en la actividad turística, esto permite que los usuarios desarrollen actividades recreativas en playas y zonas costeras, de tal forma que, los beneficios que proporcionan estas actividades para la salud y el bienestar general sean mucho mayores (OMS, 2003a). Aumentando la importancia de que exista información sobre la calidad del agua de uso recreativo e incrementando la necesidad de llevar a cabo una evaluación ambiental y microbiológica (OMS, 2003a).

El uso recreativo del agua está aumentando en muchos países alrededor del mundo y México no es la excepción. México cuenta con 11,122.5km de franja litoral (CONAPO, 1999; INE, 2000), zona considerada con un inmenso potencial económico; para el desarrollo de la pesca, la disponibilidad de agua para la agricultura (CONAPO, 1999) y para la realización de actividades que representan importantes fuentes de

captación de divisas; como la industria turística, consolidada como uno de los ejes de la economía nacional, al participar con el 8.2% del Producto Interno Bruto; además, de dar empleo a 6.1% de la planta productiva del país. El turismo, siendo la tercera fuente de ingresos más importantes para el país, colocó a México en el 2005 en el séptimo lugar a nivel mundial en captación de turistas, con 21.9 millones de visitantes, cifra que para el año 2020 se estima en 49 millones (SECTUR, 2005).

Por su parte, Sinaloa cuenta con un litoral costero de 656km y 272,740has de cuerpos de agua, que se distinguen por la riqueza de sus recursos cinegéticos, pesqueros y turísticos (SAGARPA, 2005); siendo éste último, la segunda actividad económica más importante que ofrece una extensa variedad de atractivos turísticos. Además genera más de 250 mil empleos directos e indirectos, representando el 9% de la población económicamente activa. Los resultados obtenidos por el sector turístico en el estado demuestran la importancia de su capacidad para impulsar el desarrollo regional (SECTUR, 2005).

Alteración de la Calidad del Agua de Uso Recreativo y sus Efectos a la Salud

Existe una gran variedad de factores que pueden alterar la calidad del agua de uso recreativo; como la presencia de eventos naturales (mareas rojas, lluvias intensas, huracanes, cambios climáticos, microorganismos que habitan en ellas de manera normal) (OMS, 2003a), la influencia de actividades realizadas por el hombre en los ámbitos

doméstico (microorganismos de origen fecal), industrial, minero, etc, la contaminación fecal causada por los propios bañistas (OMS, 2003a; SEMARNAT, 2005b) y la descarga de agua de uso agrícola, de las granjas camaroneras y de las aguas residuales tratadas y no tratadas (APHA, 1999; SEMARNAT, 2005b). En una escala global aproximadamente, el 90% del agua residual no tratada es descargada al mar (Griffin *et al.*, 2003).

La contaminación del agua de uso recreativo con materia fecal de origen humano y animal, constituye un alto riesgo a la salud, ya que, puede ser un medio de transporte de microorganismos patógenos como *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, Hepatitis A, Cocksackie A y B y NV. Además, de microorganismos propios del ambiente como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp., *Legionella* sp., *Naegleria fowleri*, *Mycobacterium* sp., *Kleibsiella* sp. y *Vibrio* sp., que pueden ser transmitidos a los humanos, a través de ingestión, inhalación o contacto con el agua; causando enfermedades entéricas, principalmente, infecciones gastrointestinales y con menos frecuencia infecciones respiratorias, en oídos, ojos y piel (APHA, 1999; OMS, 2003b).

Indicadores Microbiológicos de Contaminación Fecal

La calidad del agua de uso recreativo, debe garantizar la protección de la salud de los usuarios (SSA, 2004), por lo que, su control y vigilancia, tienen que realizarse

continuamente (Pina, 2001), resultando poco práctico la utilización simultánea de distintos parámetros, lo que ha dado lugar a la utilización de indicadores microbiológicos de contaminación fecal (Craun *et al.*, 1997).

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal son microorganismos residentes del tracto intestinal; de éstos, los coliformes totales y coliformes fecales, son los más utilizados para evaluar la calidad microbiológica del agua (APHA, 1999; OMS, 2003b). Se ha sugerido el uso alternativo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, estreptococos y estafilococos para completar el análisis de la calidad de agua de uso recreativo (APHA, 1999). Los enterococos se han definido como el organismo indicador que muestra la mejor correlación con síntomas gastrointestinales, asociados a personas que nadan en aguas costeras contaminadas, en lugar de los coliformes totales y fecales (CEPIS, 2000). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, recomendó en sus guías de calidad microbiológica para agua costera de uso recreativo 35UFC de enterococos/100mL. Así mismo, los requisitos de calidad para agua de uso recreativo aprobados por la Comunidad Económica Europea son 100UFC/100mL (CEPIS, 2000).

La OMS desarrolló las *Guías para ambientes seguros en aguas recreativas*, donde establece criterios para evaluar su calidad microbiológica e identificar el impacto sobre la salud de los usuarios. La aplicación de estas guías en condiciones locales (país, estado), considera factores sociales, culturales, ambientales, económicos y condiciones

de salud e inmunidad de la población (CEPIS, 2000), que permiten adecuar los estándares de acuerdo a las regiones en estudio (OMS, 2003a).

En México, las Secretarías de Marina, Medio Ambiente y Recursos Naturales, Salud y Turismo, por conducto de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Comisión Nacional del Agua (CNA), instrumentaron en febrero del 2003 el *Programa "Playas Limpias"*, dentro del Sistema Nacional de Información sobre la calidad del agua en playas mexicanas. El objetivo del programa es promover la limpieza de las playas, mejorar su calidad, proteger la salud de los usuarios y desarrollar destinos turísticos sustentables (SECTUR, 2004). Así mismo, obtener certificado de calidad de playa limpia para uso recreativo, al cumplir con los requisitos establecidos por la norma mexicana NMX-AA-120-SCFI-2006.

El programa de monitoreo, consiste en el muestreo de 259 playas de los 17 estados costeros del país (SECTUR, 2004; SEMARNAT, 2005a), considerando los enterococos como indicador de contaminación fecal (SSA, 2004) y estableciendo como límite máximo permisible 0-500UFC/100mL, clasificando a la playa apta para uso recreativo (SSA, 2004), con base en los valores guías para la calidad microbiológica de agua de uso recreativo, establecidos por la OMS. Estos lineamientos son aplicables a zonas recreativas de playas en nuestro país.

Sin embargo, debe enfatizarse que estos valores se basan en estudios epidemiológicos realizados en adultos saludables en contacto con agua de mar en climas templados, características no encontradas en aguas tropicales de la mayor parte de

América Latina y del Caribe, sin incluir niños, ancianos o personas con su sistema inmunológico menos desarrollado. Se estimaron tiempos de contacto de 10 minutos, incluyendo tres inmersiones de la cabeza. Por lo que, se puede subestimar el riesgo al ingerir agua o estar en contacto con la misma por periodos más prolongados (CEPIS, 2000; OMS, 2003a).

Además debemos considerar que, los organismos indicadores bacterianos son menos estables en el ambiente (OMS, 2003a) y menos resistentes a los tratamientos de desinfección del agua (Pina, 2001), que organismos patógenos como los protozoarios y los virus entéricos (APHA, 1999; OMS, 2003a). Los organismos indicadores sólo son una referencia de la remoción o eliminación de los microorganismos patógenos del agua, sin indicar que su ausencia, no representa riesgos a la salud, demostrando que no son totalmente confiables (OMS, 2003a; Gesche *et al.*, 2003). Por lo que, las bacterias indicadores muestran limitaciones para reflejar adecuadamente el riesgo de infecciones virales en aguas de uso recreativo (APHA, 1999). Jiang *et al* (2001), realizaron un estudio en el que detectaron Adenovirus en agua de playas en California, sin encontrar correlación con bacterias indicadoras.

Indicadores Microbiológicos de Contaminación Viral

A pesar del riesgo de infecciones virales que las aguas de uso recreativo representan para la salud humana, no se han establecido estándares de calidad que

regulen la presencia de virus. Algunos grupos de bacteriófagos como colifagos somáticos, colifagos F-específicos, fagos de *Bacteroides fragilis* y virus de origen humano como enterovirus, se han considerado como posibles indicadores de contaminación viral (Pina, 2001).

El parámetro viral reconocido por la normativa europea sobre la calidad del agua, son los enterovirus, aislados por la técnica de cultivo sobre líneas celulares (Directiva 80/778/CEE para aguas de consumo, Directiva 76/160/CEE para aguas de baño). Los datos existentes, muestran que, la presencia de enterovirus, no se relaciona con la presencia de virus patógenos (Bofill-Mas *et al.*, 2005) como el virus de Hepatitis A. Además, estos virus no son excretados de forma regular por la población (Pina, 2001).

Se ha sugerido la utilización de bacteriófagos como posibles indicadores de contaminación viral, entre ellos los fagos de *Bacteroides fragilis*, se excretan en concentraciones de hasta 10^8 UFC/gr en el 10% de la población, su resistencia a diferentes tratamientos y la inactivación natural es superior a la de otros bacteriófagos, por lo que se han evaluado como indicadores (Pina, 2001). Los colifagos somáticos, están presentes en las heces humanas y animales, son los más abundantes en aguas residuales y fácilmente de detectar. Su persistencia en el medio es similar a las de los virus humanos, aunque son más sensibles a los procesos de desinfección. Los colifagos F-específicos, son poco frecuentes en las heces humanas y animales, su persistencia en el medio y resistencia a procesos de desinfección son similares a los enterovirus. Su uso tiene el inconveniente de la escasa prevalencia de muestras fecales con colifagos (<2%),

por lo que se requieren estudios que permitan su valoración como indicador (Pina, 2001).

Distribución de los Virus en el Medio Acuático

El agua posee una gran cantidad de organismos no perceptibles a simple vista, que permiten el desarrollo de los ciclos biológicos y químicos y no son nocivos para la salud. La presencia de estos organismos en condiciones normales es beneficiosa; pero, se convierten en un problema cuando su concentración y composición alteran la calidad del agua. Los organismos que en forma natural se encuentran en el agua son: bacterias, protozoarios, virus, hongos, algas, insectos, rotíferos, copépodos y otros crustáceos (Maier *et al.*, 2000).

Los ecosistemas acuáticos contienen cantidades variables de virus (Pina, 2001), en el agua natural se han detectado concentraciones de partículas virales hasta de 10^8 /mL (Bergh *et al.*, 1989), la concentración en aguas residuales puede llegar a ser de 10^4 UFP/100mL y en las aguas superficiales la concentración de los virus va a depender del grado de contaminación fecal; variando de 100UFP/L si está contaminada y de 1-10UFP/100L cuando no está contaminada (Maier *et al.*, 2000).

Los virus también se pueden encontrar asociados a partículas sólidas suspendidas, provenientes del agua residual, que se descargan en los cuerpos de agua y se acumulan en los sedimentos (Labelle *et al.*, 1980), donde pueden permanecer estables

durante meses o incluso más tiempo (Bofill-Mas *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el sedimento puede contener concentraciones más elevadas de virus que el agua y mediante fenómenos naturales o artificiales, se resuspenden facilitando la diseminación viral (Labelle *et al.*, 1980). Por otro lado, los moluscos bivalvos, son filtradores del agua y pueden concentrar virus en sus tejidos a partir de agua contaminada (Pina, 2001).

Virus Entéricos

Los virus patógenos presentes en el medio acuático y que son un peligro para la salud pública, pertenecen a un grupo conocido como virus entéricos (APHA, 1999; Griffin *et al.*, 2003). Aproximadamente, 140 tipos de virus entéricos pueden ser encontrados en el medio acuático (Bitton, 1994), como resultado de la contaminación del agua por heces fecales humanas y animales y el vertimiento de aguas residuales (APHA, 1999). Estos virus, son transmitidos por vía fecal-oral (APHA, 1999), entran al cuerpo humano oralmente, se multiplican en el tracto gastrointestinal y son excretados en las heces de individuos infectados (Bitton, 1994). Los virus entéricos están asociados a diversas enfermedades en humanos (Cuadro 1). La enfermedad más frecuente es la gastroenteritis, que representa la principal causa de muerte en niños. Siguiéndole en importancia clínica la hepatitis (Bofill-Mas *et al.*, 2005), siendo los ancianos, niños y las personas inmunocomprometidas las más susceptibles a desarrollar severas infecciones (Griffin *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Enfermedades producidas por virus entéricos

Familia	Género	Principales especies	Enfermedades
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	Adenovirus humanos	Infecciones respiratorias, oculares, urinarias, gastroenteritis
<i>Parvoviridae</i>	Parvovirus	-	Enfermedades respiratorias
	Dependovirus	-	
<i>Polymaviridae</i>	Poliomavirus	-	Infecciones del sistema nervioso, riñón y tracto urinario
<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	Poliovirus Coxsackevirus A Coxsackevirus B Echovirus Enterovirus (68-71)	Infecciones del sistema nervioso, oculares y respiratorias
	Hepatovirus	Virus de hepatitis A	Hepatitis tipo A
<i>Caliciviridae</i>	Virus <i>Norwalk-like</i>	Virus Norwalk	Gastroenteritis
	Virus <i>Sapporo-like</i>	Virus Sapporo	
<i>Reoviridae</i>	Ortoreovirus	Reovirus	Gastroenteritis
	Rotavirus	Rotavirus humanos	
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus	Astrovirus	Gastroenteritis
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Coronavirus	Gastroenteritis, enterocolitis
	Torovirus		Gastroenteritis
<i>Birnaviridae</i>	Picobirnavirus		Gastroenteritis

Fuente: Pina, 2001; Griffin *et al.*, 2003

Los virus entéricos pueden sobrevivir durante varios meses en el medio y resistir los tratamientos de desinfección del agua, pudiendo así, encontrarse lejos de la fuente original de contaminación, lo que, constituye un riesgo potencial de nuevas infecciones. Es difícil encontrar la relación entre la presencia de virus en agua y el riesgo para la salud de los usuarios, debido a que, se deben considerar muchos factores como: dosis mínima infecciosa (MID por sus siglas en inglés), tipo de virus, vía de penetración, distribución del virus, inmunidad de las personas, factores ambientales (estación del año, hora del día, temperatura, humedad), geográficos, socioeconómicos y condiciones de higiene (Bitton, 1994; OMS, 2003a). Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que una infección viral adquirida por el consumo de agua contaminada es producida con muy pocas partículas virales (APHA, 1999).

Microorganismos en Estudio

Norovirus

Los Norovirus (NV) son considerados uno de los principales microorganismos patógenos con gran impacto sobre la salud humana, por el consumo de agua o alimentos contaminados (Pepper *et al.*, 2006). En los últimos 30 años, se han asociado a casos esporádicos y brotes epidémicos de gastroenteritis en humanos. La magnitud de su importancia clínica fue reconocida recientemente, ya que, sólo se identifican por

métodos moleculares. Aún así, su identificación es difícil debido a que existen diferencias hasta en un 60% en la secuencia nucleotídica (MSAN, 2004).

Morfología. Los NV son virus ARN de 27-35nm de diámetro, no poseen envoltura y tienen una nucleocápside de 32 cápsomeros de conformación icosaédrica. Pertenecen al género virus Norwalk-like de la familia Caliciviridae y no se ha logrado propagarlos in vitro (Evans *et al.*, 1997).

Genoma y proteínas. El genoma está compuesto por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva de 7.5-7.7kb formado por tres marcos de lectura abierta (ORF; por sus siglas en inglés) (Figura 1). El genoma codifica una proteína estructural VP1 de aproximadamente 56kD (ORF2), la región 3' codifica otra proteína estructural VP2 y la región 5' codifica una poliproteína no estructural que incluye una polimerasa ARN dependiente de ARN (ORF1) (Vinjé *et al.*, 2004).



Figura 1. Organización del genoma de NV

Diversidad genética. Los NV están divididos en cinco genogrupos GI, GII, GIII, GIV y GV; los genogrupos patógenos al humanos son GI, GII y GIV (Parshionikar *et al.*, 2003), GIII sólo ha sido encontrado en ganado vacuno y GV en ratones; éstos genogrupos se han dividido en 22 genotipos (Vinjé *et al.*, 2004).

Estabilidad en el ambiente. Las características que facilitan la transmisión y expansión de NV son su baja dosis infecciosa (menor a 10 partículas virales), la duración prolongada de la excreción de los virus a través de las heces fecales, la estabilidad del virus en el ambiente y la gran diversidad genética de las cepas (CDC, 2001). Los NV permanecen estables en concentraciones \leq 10ppm de cloro, congelamiento y calentamiento a 60°C (CDC, 2001).

Patogenicidad. El principal modo de infección es la vía fecal-oral a través del consumo de agua o alimentos contaminados. Sin embargo, el aire, el vómito y el contacto persona-persona, puede facilitar su transmisión (CDC, 2001). Algunas fuentes de infección son el agua para beber, algunos alimentos como los mariscos y nadar en agua contaminada (Evans *et al.*, 1997). Tiene un período de incubación de 12-48hr con un rango de 4-77hr; provocando náusea, fiebre, dolor de cabeza, dolores abdominales, vómitos y diarrea, sin necesidad de hospitalización. El vómito es más común en niños que en personas adultas. En raras ocasiones produce severas deshidrataciones, sobre

todo en adultos mayores en malas condiciones de salud, llegando a ser fatal. Las personas pueden contagiar a otras después de 48-72hr de su recuperación e incluso la excreción viral en heces continúa en ausencia de síntomas clínicos (CDC, 2001).

Algunas estadísticas muestra que en los países desarrollados las personas adultas son más susceptibles a sufrir severas infecciones (Evans *et al.*, 1997), sin embargo, estudios recientes han demostrado que también afecta a los niños (CDC, 2001). Algunos investigadores afirman que ciertas personas pueden ser genéticamente más susceptibles a infectarse por NV y enfermarse. Lo que explicaría la razón de porqué personas con niveles elevados de anticuerpos, son más susceptibles a enfermarse por una reexposición al virus (CDC, 2001).

Epidemiología. Se considera que los NV son una de las causas más comunes de brotes de gastroenteritis de origen no bacteriano distribuidos alrededor del mundo (Evans *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001; CDC, 2001; Parshionikar *et al.*, 2003; Lodder *et al.*, 2005). Los brotes producidos por NV se presentan predominantemente en los meses fríos, sin embargo, estudios recientes muestran que se pueden presentar durante todo el año (Evans *et al.*, 1997).

La OMS (2003a), reportó en Estados Unidos de 1985-1998, 3 brotes de gastroenteritis por NV y 21 brotes por agentes etiológicos no identificados, sugiriendo que eran infecciones virales, asociados con agua de uso recreativo. Así mismo, Yoder *et*

al. (2004), reportaron en Estados Unidos de 1993 al 2002, 10 brotes de gastroenteritis por NV. Se ha estimado que el 80% de las infecciones gastrointestinales son de origen viral y se calcula que anualmente se presentan 23 millones de casos de gastroenteritis por esta causa (MSAN, 2004).

En Europa Occidental, los NV son la causa más frecuente entre las gastroenteritis de origen viral; en Inglaterra y Holanda, entre un 6% y 11% de todas las infecciones intestinales se deben a este virus (MSAN, 2004). En España, se detectó un aumento del 500% en el número de brotes reportados de 1999 al 2002. A pesar que los NV son altamente infecciosos, estrictas medidas sanitarias como lavado apropiado de manos y desinfección de material contaminado puede disminuir la velocidad de transmisión (Maier *et al.*, 2000). El tratamiento de la gastroenteritis causada por NV consiste en el suministro de líquidos orales (Evans *et al.*, 1997).

Virus de Hepatitis A

El término Hepatitis A fue introducido por primera vez por Krugman en 1967, causada por el virus de Hepatitis A (VHA), cuyo principal sitio de replicación es el hígado (Nainan *et al.*, 2006).

Morfología. Es un pequeño virus ARN de 27-32nm de diámetro, no posee envoltura, contiene una nucleocápside de 32 cápsomeros de conformación icosaédrica, está compuesto de proteínas virales y ARN. Pertenece al género Hepatovirus de la familia Picornaviridae. El VHA requiere un largo periodo de adaptación en cultivo celular, se replica lentamente y en pocas ocasiones produce efectos citopáticos (Nainan *et al.*, 2006).

Genoma y proteínas. El genoma consiste en una cadena lineal sencilla de ARN en sentido positivo de aproximadamente 7.5kb. Contiene una región no codificante 5' de 734-740 nucleótidos que se encuentra unida covalentemente a la proteína viral VPg (2.5kD); una región codificante de 2225-2227 nucleótidos y una región no codificante 3' de 40-80 nucleótidos con una cola de adeninas (Cuthbert, 2001). La región codificante está compuesta por tres regiones distintas P1, P2 y P3 que es traducida en una poliproteína de 2225 a 2227 aminoácidos. Esta poliproteína produce cuatro proteínas de la cápside y varias proteínas no estructurales (Figura 2) (Nainan *et al.*, 2006).

La región P1 codifica 3 de las principales proteínas de la cápside viral: VP1, VP2 y VP3. Una cuarta proteína (VP4), esencial para la formación del virión, no es detectada en proteínas virales maduras. Las proteínas no estructurales codificadas por las regiones P2 y P3 forman parte de la síntesis de ARN y formación del virión. La proteína VPg está

codificada por la región P3 y se encuentra unida covalentemente a la parte terminal 5' del genoma y participa en la síntesis de ARN (Figura 2) (Cuthbert, 2001).

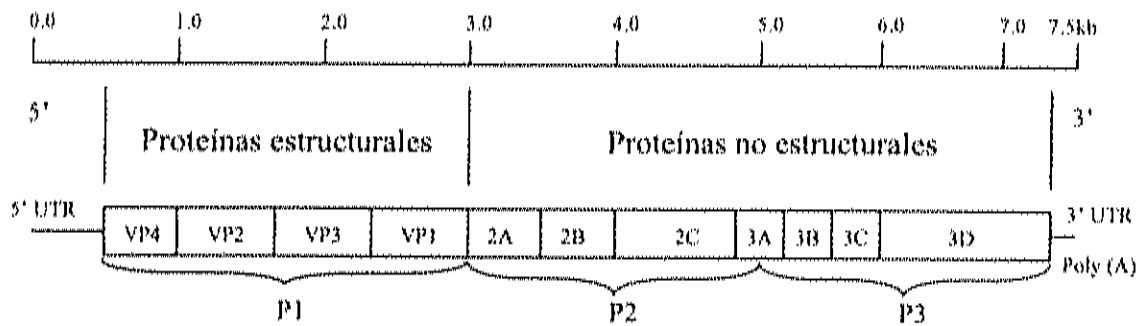


Figura 2. Organización del genoma del VHA

Diversidad genética. Se conoce un solo serotipo de VHA, éste presenta un alto grado de antigenicidad (aminoácidos) y conservación genética (nucleótidos) en su genoma. Sin embargo, existen varios genotipos y subgenotipos de VHA. Las regiones genómicas usadas para definir los genotipos son: la región VP3 y VP1, la intersección VP1/P2A y la región VP1-P2B (Nainan *et al.*, 2006). Cuando la secuencia de la intersección VP1/P2A es usada para definir genotipos y subgenotipos; los genotipos presenta una variación en la secuencia de nucleótidos mayor al 15% y en los subgenotipos tienen una variación de 7-7.5%. Se han identificado 7 genotipos de VHA; 4 genotipos (I, II, III y VII) son de origen humano y 3 (IV, V, VI) son de origen animal (simios) (Nainan *et al.*, 2006).

Estabilidad en el ambiente. El VHA es extremadamente resistente a la degradación en condiciones ambientales, una propiedad que permite su estabilidad y distribución en la población. El virus es resistente a la desnaturalización térmica (10min a 70°C), a un pH ácido (2hr a pH 1), al éter (20%), cloroformo y ácido percloracético (300mg/L durante 15min a 20°C). Es inactivado a 85°C por 1min y 121°C por 20min, es lábil a la radiación ultravioleta, la formalina (8% por 1min a 25°C), permanganato de potasio (30mg/L por 5min), yodo (3mg/L por 5min), cloro libre (2-2.5mg/L por 15min) y compuestos de cloro (3-10mg/L a 20°C por 5-15min) (Tay, 1995; CDC, 2006).

Patogenicidad. Este virus se disemina principalmente por vía fecal-oral, persona-persona y contacto o ingestión de agua o alimentos contaminados; asociándose a hacinamiento, higiene deficiente y a condiciones sanitarias inadecuadas (Tay, 1995). El curso de la Hepatitis A puede ser extremadamente variable, los pacientes pueden tener síntomas desde pasajeros hasta severos o prolongados, de los cuales se pueden recuperar completamente o desarrollar hepatitis fulminante o la muerte (CDC, 2006). El VHA se replica en el intestino, alcanza el hígado e infecta los hepatocitos, produce viremia, es excretado en la bilis y desechado en las heces; las cuales pueden contener hasta 10^9 partículas virales/gr y son consideradas como la principal fuente de infección. La excreción de VHA en la heces puede ocurrir hasta 6 meses después de diagnosticada la infección (Nainan *et al.*, 2006). La Hepatitis A se divide en cuatro etapas clínicas:

1) Periodo preclínico o de incubación: el tiempo promedio de incubación es aproximadamente 30 días, pero puede variar de 10 a 50 días, variación asociada con la dosis. La dosis infecciosa es de 1-10UFP (Bitton, 1994).

2) Fase preictérica: se puede extender de varios días a más de una semana, se caracteriza por la aparición de síntomas como pérdida del apetito, fatiga, dolor abdominal, náusea, vómito, fiebre y diarrea (CDC, 2006).

3) Fase icterica: esta etapa comienza después de 10 días de la aparición de los síntomas iniciales, en ella se desarrollan niveles de bilirrubina que exceden los 20-40mg/L y el paciente requiere atención médica. El análisis del paciente ayuda a determinar las condiciones del hígado y una posible necrosis. La necrosis del hígado se presenta durante las primeras 6-8 semanas de la enfermedad, aunado a fiebre, dolor abdominal, vómito, ictericia, encefalopatía hepática y coma; son signos de hepatitis fulminante que conducen a la muerte en el 70-90% de los pacientes (CDC, 2006), aunque esta manifestación se presenta en muy pocas ocasiones (0.15-0.5%) (Nainan *et al.*, 2006).

Epidemiología. La Hepatitis A ocurre esporádica o epidémicamente alrededor del mundo, presentándose 1.4 millones de casos anualmente y en América Central 162,000 casos por año (CDC, 2006). La severidad y manifestación de la enfermedad está relacionado con la edad. Se estima que un 80 a 95% de niños infectados menores a 5

años no desarrollan síntomas, sin embargo, sí se presentan síntomas en aproximadamente 75 a 90% de adultos infectados. La tasa de mortalidad en niños de 14 años o más es de 0.1%; esta tasa aumenta a 0.3% en individuos entre las edades de 15 y 39 años y 2.1% en personas mayores a los 40 años (Maier *et al.*, 2000).

Métodos de Concentración de Virus Entéricos en el Agua

El monitoreo de virus entéricos en el agua, sólo se recomienda en investigaciones y en la incidencia de brotes de enfermedades asociadas al consumo de agua contaminada, donde se sospeche de un virus como agente causal (APHA, 1999). La detección de virus entéricos en el agua es un proceso complejo, debido a varios factores como: el tipo y calidad del agua (APHA, 1999), la baja concentración viral, el tipo de virus (Pina, 2001), la existencia de componentes susceptibles de interferir en el proceso (materia orgánica) y las limitaciones de los métodos de identificación (APHA, 1999). No existe una metodología universal que se utilice de forma rutinaria en los laboratorios. Actualmente, existen varios métodos que continúan siendo investigados, modificados y mejorados (APHA, 1999; Pina 2001).

Las etapas de análisis de virus en agua son: la colección de la muestra, la elución, la concentración, la eliminación de inhibidores y la detección del virus de interés. La concentración es una de las etapas más críticas del proceso; debe ser técnicamente

simple, rápida, económica, con alta eficiencia de recuperación y debe utilizarse con un amplio rango de virus (Bosch, 1998). En el cuadro 2, se muestran algunos métodos aplicados para la concentración de virus a partir de agua de diversos orígenes.

Cuadro 2. Métodos de concentración de virus en agua

Método	Material de composición	Aplicación
Electroforesis	-	Reconcentración
Electroósmosis	-	Agua limpia
Separación de fases	Sulfato de dextrano Polientilenglicol	Agua residual
Método de las gasas	Gasa hidrófila	Agua turbia
Floculación inorgánica	Sulfato amónico Cloruro férrico Sulfato de amonio	Agua potable, agua residual
Floculación orgánica	Extracto de carne	Cualquier tipo de agua
Adsorción-elución	Filtros electronegativos	Agua turbia
	Filtros electropositivos	Agua potable, agua residual, agua de mar
	Polvo de vidrio	Agua potable, agua residual
	Lana de vidrio	Agua potable
Ultrafiltración	Membranas de celulosa Membranas de poliétersulfona	Cualquier tipo de agua
Ultracentrifugación	-	Agua muy turbia

Fuente: Maier *et al.*, 2000; Pina, 2001

Método Adsorción-Elución

El método de concentración más utilizado es el método adsorción-elución, el cual se ha aplicado en agua potable, agua de pozo, agua superficial, agua marina y agua residual (Maier *et al.*, 2000). El método se basa en la capacidad de los virus para asociarse a diferentes materiales, aprovechando sus propiedades como moléculas proteicas. La composición química de los filtros, la fuerza iónica, el pH del medio y la presencia de materia orgánica, son factores muy importantes en esta asociación (Pina, 2001).

La concentración del virus a partir de agua, consiste en pasar agua por un filtro, los filtros más usados son los VIRADEL (virus adsorption-elution), donde el tamaño del poro del filtro es más grande que el tamaño del virus y la adsorción del virus en el filtro (Maier *et al.*, 2000) se lleva a cabo debido a que, los virus tienen una cápside proteica, compuesta por aminoácidos con grupos ionizables que les confieren una carga eléctrica dependiente del pH, lo que les permite unirse sobre un soporte cargado positiva o negativamente mediante atracciones electrostáticas (Pina, 2001) (Figura 3A).

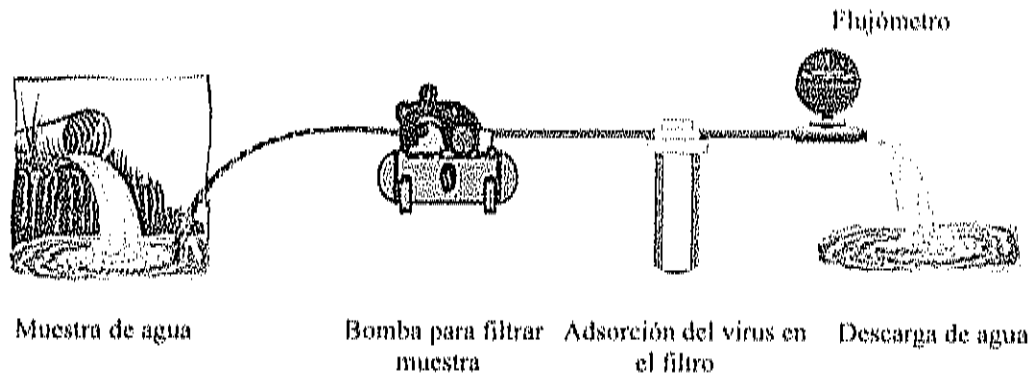
Los filtros electronegativos están compuestos de ésteres de celulosa o fibra de vidrio con resina orgánica (Maier *et al.*, 2000). La utilización de filtros con carga neta electronegativa requiere la acidificación de la muestra de agua o la adición de sales, para promover la adsorción, lo cual contribuye a eliminar las fuerzas electrostáticas de repulsión entre el virus (cargado negativamente) y la superficie del filtro (Pina, 2001).

Comercialmente, el filtro electronegativo más utilizado es Filterite (25.4cm de longitud, 0.22 μ m- 0.45 μ m de tamaño de poro) (Maier *et al.*, 2000).

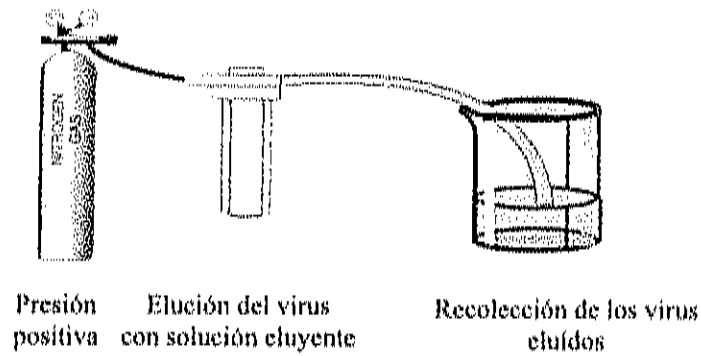
Por otra parte, los filtros electropositivos están compuestos de fibra de vidrio o celulosa con resina orgánica polimérica, que forma una superficie con carga positiva y favorece la adsorción del virus. A diferencia del anterior, la utilización de este filtro no requiere la acidificación del agua, sin embargo, no puede usarse con agua de mar o agua que sobrepase un pH de 8.0-8.5. El más utilizado es 1-MDS Virozorb (Maier *et al.*, 2000). La materia suspendida en el agua puede tapar los filtros, limitando el volumen procesado e interferir en la elución. La materia orgánica disuelta puede interferir en la adsorción de los virus, al competir con éstos por los sitios de adsorción (Maier *et al.*, 2000).

Los virus adsorbidos son eluidos de la superficie del filtro por presión, filtrando de 1 a 2L de una solución eluyente. El eluyente es una solución alcalina proteica (Extracto de carne). El pH de la solución eluyente incrementa la carga negativa del virus y el filtro, provocando la separación del virus. Además, la materia orgánica presente en el eluyente compite con el virus por los sitios de adsorción (Maier *et al.*, 2000) (Figura 3B). El volumen del eluyente empleado se debe reducir mediante una etapa de concentración (reconcentración) hasta 20-30mL, para el análisis posterior del virus (Maier *et al.*, 2000). Los métodos empleados son floculación orgánica (Figura 3C), ultracentrifugación, y ultrafiltración. Por último, la muestra concentrada se analiza por cultivo celular, pruebas inmunológicas o técnicas moleculares (Bitton, 1994).

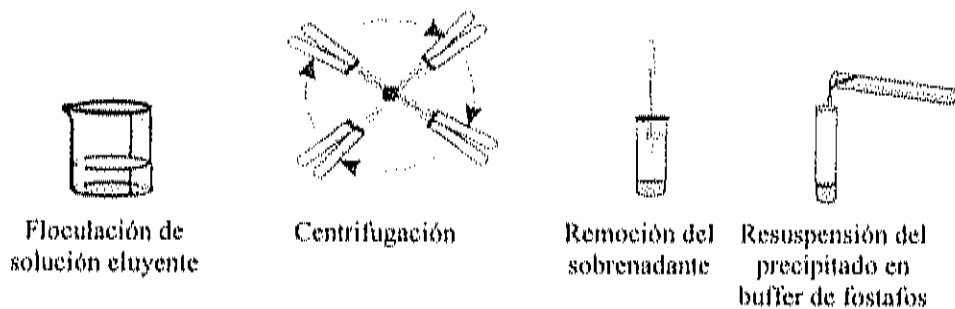
A. Filtración de la muestra



B. Elución



C. Reconcentración



Fuente: Maier *et al.*, 2000

Figura 3. Procedimiento para la recolección de muestra y análisis de virus en agua.

Métodos de Detección e Identificación de Virus en Muestras Ambientales

La detección e identificación de virus, se efectúa después del proceso de concentración. El método tradicionalmente usado para detectar virus entéricos en agua, es el cultivo celular el cual se caracteriza por ser laborioso, presentar baja sensibilidad y caro (Rosenfield *et al.*, 1999); además, sólo algunos virus pueden ser cultivados en líneas celulares (Huang *et al.*, 2000). A pesar de sus limitaciones, no existe otra metodología para determinar si el virus en estudio es viable o es capaz de producir infección (Griffin *et al.*, 2003). Los métodos alternativos que se utilizan para la detección de virus son: pruebas de lesión hepática (Fernández *et al.*, 2001), radioinmunoensayos (ELISA, RIA) y microscopía electrónica, que son rápidos y fáciles, pero son costosos o no son lo suficientemente sensibles para el análisis de muestras ambientales (Rosenfield *et al.*, 1999).

Recientemente, las técnicas moleculares, ofrecen ventajas para detectar virus entéricos en muestras ambientales; en particular, la RT-PCR (Schwab *et al.*, 1995), esta técnica es rápida, sensible y específica (Rosenfield *et al.*, 1999), teóricamente capaz de detectar de 10^2 - 10^4 partículas virales/mL (CDC, 2001), que permiten la detección de virus entéricos en el agua (Huang *et al.*, 2000).

Esta técnica asociada a la posibilidad de caracterizar genéticamente con relativa facilidad los virus detectados, ha permitido obtener una información más completa y real

de muchos de los virus excretados que no pueden cultivarse de forma eficiente en líneas celulares (Bofill-Mas *et al.*, 2005).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR, es una técnica descrita por Kary Mullis en 1985; cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, partiendo de un mínimo en teoría, de una única copia de ese fragmento. Siendo una técnica clave en laboratorios de microbiología ambiental (Maier *et al.*, 2000).

Un ciclo de PCR se compone de tres etapas: La primera etapa consiste en la desnaturalización de la doble cadena de ADN (dsADN) en dos cadenas simples (ssADN). Para la mayoría de las reacciones, la desnaturalización ocurre a temperaturas lo suficientemente elevadas (90-95°C) para romper los puentes de hidrógeno del ADN (Fernández *et al.*, 2001). En la reacción se agregan dos cadenas cortas y simples de ADN, llamadas primers. Los primers son oligonucleótidos sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar, tienen una longitud de 17 a 30pb y pueden ser de secuencias conservadas o universales, se les denomina primer sentido (upstream primer) y primer antisentido (downstream primer) (Maier *et al.*, 2000).

En la segunda etapa, se lleva a cabo, el alineamiento o apareamiento de cada uno de los oligonucleótidos con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Para que

se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. El alineamiento ocurre entre 50–70°C, dependiendo de la composición de los primers. En la tercera etapa, una enzima, la ADN polimerasa extiende los primers, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde, efectuándose regularmente a 72°C (Maier *et al.*, 2000).

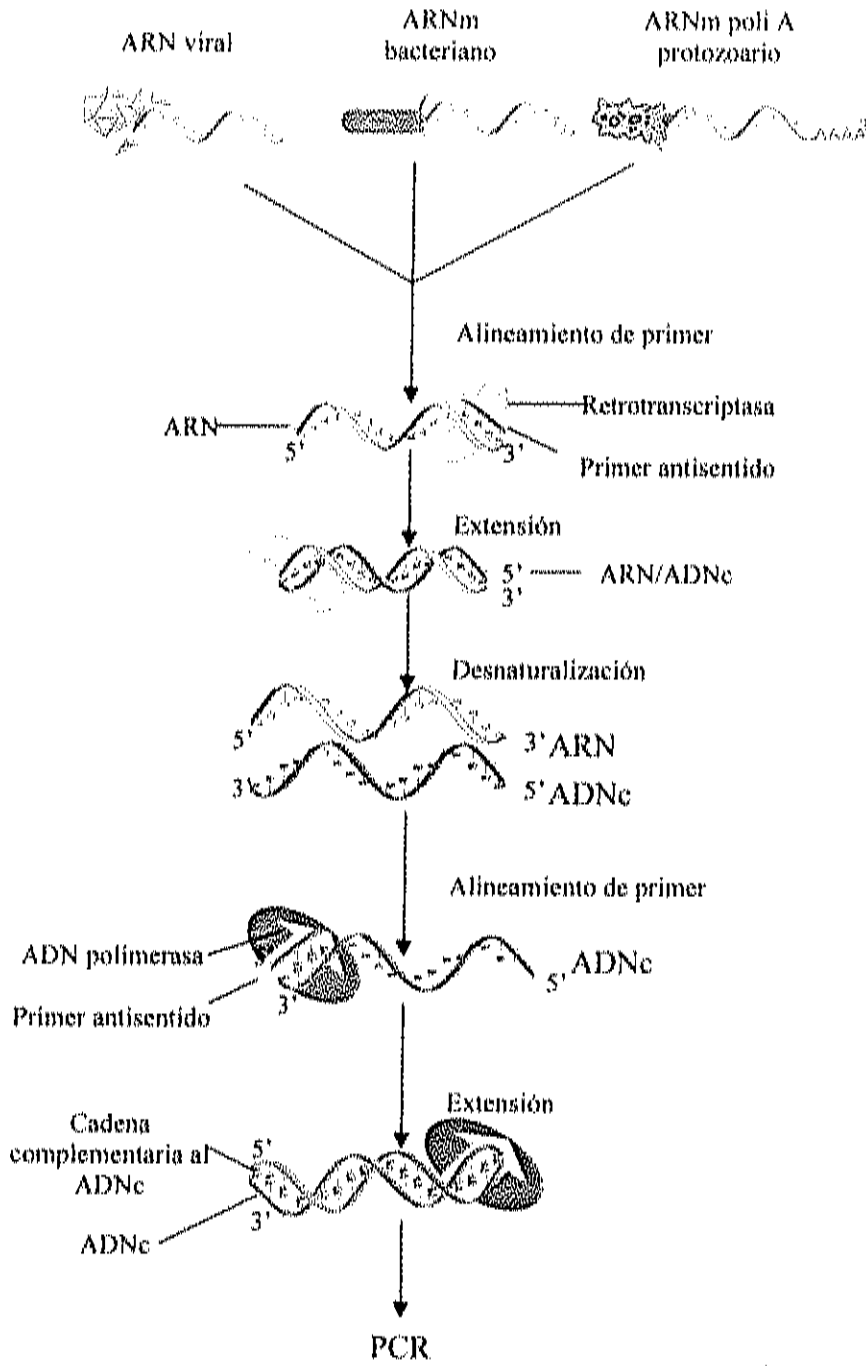
Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, alineamiento, extensión) el fragmento de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. Las reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. El resultado da lugar a un incremento exponencial en el número de copias del segmento de ADN original. Los productos de la amplificación son visualizados por electroforesis en un gel de agarosa.

Debido a que, los primers se unen a sitios específicos de la cadena de ADN, el tamaño del producto amplificado se estima al comparar con ADN estándar de tamaño conocido. Uno de los aportes fundamentales de esta metodología a la investigación, consiste, en la sensibilidad, rapidez y especificidad mediante las cuales se realiza una tarea que antes requería largas y tediosas horas pero su desventaja es que detecta tanto organismos viables como no viables, dejando la pregunta qué tan peligrosa es una muestra (Maier *et al.*, 2000).

Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La RT-PCR es una técnica en la cual una cadena de ARN es transcrita hacia una cadena de ADN complementaria (ADNc), para ser amplificada en la PCR. En la primera etapa de la RT-PCR, se usa un primer antisentido que tiene una secuencia complementaria al ARN. La transcripción de ARN a ADN complementario se hace en presencia de una enzima retrotranscriptasa, que es una ADN polimerasa dependiente de ARN, obteniendo como producto una molécula de ADNc, complementaria a la cadena de ARN. Posteriormente, se sintetiza una cadena de ADN complementaria al ADNc, por lo que, la PCR se lleva a cabo, a partir, de una cadena doble de ADN (Figura 4) (Maier *et al.*, 2000).

Es una técnica importante en el diagnóstico de enfermedades genéticas y es muy utilizada en la microbiología ambiental para la detección de virus ARN, la detección de ARNm y secuencias de ARNr. Debido a la dificultad de cultivar virus en el laboratorio, la PCR provee la oportunidad de detectar el ácido nucleico viral. Los virus causantes de enfermedades por el consumo de agua o alimentos contaminados son ARN, por lo que la RT-PCR es una técnica que provee la facilidad de la detección de estos virus (Maier *et al.*, 2000).



Fuente: Maier *et al.*, 2000

Figura 4. Etapas de la RT-PCR

Técnica de ADN Recombinante

Uno de los más grandes avances de la ciencia contemporánea ha sido el desarrollo de la ingeniería genética y la biotecnología. Por medio de estas dos disciplinas se ha logrado manipular genéticamente a los individuos con el fin de propiciarles nuevas características (Fontúrbel, 2003). Esta tecnología se usa en la microbiología ambiental, para analizar la estructura genética y caracterizar e identificar microorganismos nuevos o que no se pueden cultivar en líneas celulares (Maier *et al.*, 2000).

El principio de la tecnología del ADN recombinante se basa en la unión de un fragmento de ADN foráneo mediante enlaces fosfodiéster a una molécula de ADN vector (plásmido), capaz de replicarse cuando se introduce en un hospedero de clonación molecular. Una vez que el fragmento de ADN foráneo se ha introducido en el hospedero, éste se reproduce junto con el vector (clonación molecular) (Lodish *et al.*, 2003), dando como resultado una población de organismos que poseen moléculas de ADN recombinante (Maier *et al.*, 2000).

Elementos de la tecnología del ADN recombinante

Enzimas de restricción: Son enzimas sumamente específicas que catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos y son capaces de cortar ambas hebras de ADN en lugares específicos, creando una serie de fragmentos (Fontúrbel, 2003).

Estas enzimas hidrolizan al ADN en sitios de restricción determinados por secuencias específicas del ADN (Brooks et al., 2005).

Vectores de clonación: Una vez que los fragmentos de ADN de interés, se han aislado por medio de las enzimas de restricción, el siguiente paso es unirlos a un vector de clonación (Fontúrbel, 2003). Los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario separadas del ADN cromosómico de una célula (Lodish *et al.*, 2003). Permiten la unión de los fragmentos de ADN extraño a su propio ADN por medio de sitios de restricción compatibles, sin afectar su replicación, por medio de un proceso de recombinación (Fontúrbel, 2003), normalmente es una bacteria o una célula eucariota viva. El vector de clonación debe ser capaz de replicarse, introducir ADN foráneo en una célula, fácilmente recuperable e identificar su presencia y además no producir daños (Maier *et al.*, 2000).

Actualmente, se usan diferentes tipos de vectores para la producción de ADN recombinante, los principales son los plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, vectores transbordadores, células eucariotas y cromosomas artificiales, entre otros (Fontúrbel, 2003). Los plásmidos más usados se replican en *E.coli.*, contienen poco más que las secuencias de nucleótidos esenciales para usar en la clonación de ADN: un origen de replicación, un gen de resistencia a fármacos y una región en la cual se pueden insertar fragmentos de ADN exógeno (Lodish *et al.*, 2003).

Hospederos: Una vez introducido el ADN foráneo en el vector, éste se incorpora a un sistema vivo. Este hospedero, normalmente es una bacteria, levadura u organismo eucariota pluricelular (Fontúrbel, 2003). Las células receptoras crecen en medio de cultivo, produciendo varias células idénticas, llamadas clonas. Estas células deben ser aisladas de las recombinantes por medio del uso de medios selectivos como la resistencia a antibióticos (Fontúrbel, 2003).

Transfección: Consiste en la inserción del material genético dentro de un hospedero para que se realice el proceso de clonación de ADN (Tortora *et al.*, 1995). En el proceso de inserción, no todos los intentos son exitosos, y algunas células no reciben el material genético, debido a que, deben estar en un estado competente para poder recibirlo (Fontúrbel, 2003). La inserción del ADN se hace tomando en cuenta que la célula posee una membrana celular que actúa como una barrera que la limita y selecciona qué sustancias penetrarán dentro ella. Para superar esta barrera, se han diseñado técnicas que se encargan de abrir poros en la membrana o inducir la endocitosis (Fontúrbel, 2003) como la electroporación, fusión del protoplasto, microinyección y técnicas de permeabilización celular (Tortora *et al.*, 1995).

Clonación de ADN: Una vez realizado el proceso de transfección comienza la etapa de clonación de ADN dentro de la célula hospedadora (Fontúrbel, 2003). Así, el fragmento

inicial de ADN se replica en la colonia de células en un gran número de copias idénticas. Dado que todas las células de una colonia se originan a partir de una única célula progenitora transformada, constituyen un clon de células. El fragmento inicial de ADN insertado en el plásmido progenitor se denomina ADN clonado (Lodish *et al.*, 2003). En células como *E. coli* el proceso de clonación se da una vez que se obtienen los organismos recombinantes, a partir de los cuales se obtienen clonas por simple división (Fontúrbel, 2003). Por último, se seleccionan las células que sí recibieron el ADN foráneo mediante el vector, y se aíslan en un nuevo medio de cultivo, dándoles condiciones ideales para que crezcan y se reproduzcan (Fontúrbel, 2003).

Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN permite conocer la estructura del gen y deducir sus productos. El análisis de la secuencia del ADN descubre regiones reguladoras que controlan la expresión génica y los puntos susceptibles a la mutación. La comparación de la secuencia del ADN revela interrelaciones evolutivas que proporcionan un marco de referencia para la clasificación inequívoca de los microorganismos y de los virus (Brooks *et al.*, 2005). Los dos métodos empleados para la secuenciación del ADN son la técnica de Maxam-Gilbert y el método de Sanger (Brooks *et al.*, 2005).

Método químico. Este método fue desarrollado por Maxam-Gilbert, en el cual se requiere ADN marcado con ^{32}P en un solo extremo y sobre él se realizan 4 reacciones químicas separadas para cada una de las bases, con el fin de modificar selectivamente purinas con dimetilsulfato y pirimidinas con hidracina. Al modificarse las bases del ADN se rompe fácilmente el enlace N-glucosídico y el enlace fosfodiéster usando piperidina. Los fragmentos marcados y cortados se visualizan en un gel de poliacrilamida. El gel se expone a radioactividad y se obtiene un patrón de bandas (Brooks *et al.*, 2005).

Método enzimático o método de la terminación dideoxi: Desarrollado por Sanger en 1977, el cual se basa en la utilización de ADN polimerasa I para sintetizar una cadena complementaria a un ADN molde de cadena sencilla. La polimerización inicia a partir de un extremo del ADN molde apareado con un iniciador (primer), adicionando dideoxinucleótidos en la dirección 5'-3'. La ADN polimerasa I, también adiciona 2'-3' dideoxinucleótidos (A, C, G o T) (nucleótidos sin OH^{*}, en el carbono 2'-3'), cuando esto sucede, la polimerización no puede continuar, ya que, falta el hidroxilo 3' del dideoxinucleótido incorporado (Brooks *et al.*, 2005).

Para la síntesis de la cadena complementaria se requiere de un iniciador y de la mezcla de los 4 dNTP más el análogo correspondiente para cada reacción. Con esto se genera el término de la cadena y se generan fragmentos de distintos tamaños. Los dNTP

incorporan, son marcados con ^{32}P o ^{35}S . Este método se facilita por la manipulación del bacteriófago M13 de *E. coli*, que contiene ADN de cadena única. Su forma replicativa es ADN de doble cadena, que permite la integración de los fragmentos específicos del ADN identificados previamente (Brooks *et al.*, 2005).

Este método se ha optimizado y automatizado, usando iniciadores fluorescentes distintos, unidos a los 4 iniciadores (A, G, C y T) y cada uno con el análogo correspondiente. Entonces, los fragmentos son detectados simultáneamente con un láser que los hace emitir fluorescencia y ésta se detecta en un foto multiplicador que lee el paso de los fragmentos, acoplado a una computadora (Brooks *et al.*, 2005).

Existen instrumentos de electroforesis capilar que proporcionan una alternativa al sistema basado en geles, donde este soporte ha sido sustituido por un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar la muestra de secuenciación; las muestras se van analizando una a una. Este tipo de secuenciadores se utiliza para lecturas no superiores a 450pb (Brooks *et al.*, 2005).

Ambas técnicas producen un grupo de oligonucleótidos unidos entre sí, a partir de un solo origen, e incluyen la separación secuencial en un gel de las cadenas de ADN que difieren entre sí por el incremento de un solo nucleótido. Una secuencia se descubre al poner mezclas de reacciones similares en cuatro carriles, donde cada uno expone un nucleótido específico en la secuencia general (Brooks *et al.*, 2005).

Análisis Filogenético

El análisis filogenético en un sentido estricto determina la descendencia de especies de un ancestro común. En un sentido más práctico, determina la o las especies relacionadas a un organismo. La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas entre organismos, que implica el agrupamiento de los organismos dentro de un taxón basado en interrelaciones fenotípicas (Persing *et al.*, 2004).

El análisis filogenético consta de las siguientes etapas: la primera es la elección de una molécula presente en toda la taxa de interés, la molécula comúnmente usada es una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos. La segunda etapa es identificar secuencias similares a la molécula elegida (Persing *et al.*, 2004); Genetics Computer Group (GCG), FASTA y Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST), proporcionados por National Center for Biotechnology Information (NCBI), son programas, que permiten analizar las secuencias obtenidas (Maier *et al.*, 2000) al compararlas con las secuencias existentes recopiladas en una base de datos, que para su análisis poseen un número de acceso de identificación, además de proveer de información como la investigación de la que se obtuvo y la región codificante (Maier *et al.*, 2000).

Estos programas se usan cuando se desea conocer qué secuencias de la base de datos son similares a la secuencia de interés lo que permite identificar y caracterizar un organismo (Nainan *et al.*, 2006). La tercera etapa es construir un alineamiento múltiple

de todas las secuencias que serán incluidas en el análisis filogenético. Posteriormente, se construye el árbol filogenético, el cual, se presenta como un cladograma o dendograma. Por último, se realiza el análisis del árbol filogenético (Persing *et al.*, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Puntos de Muestreo

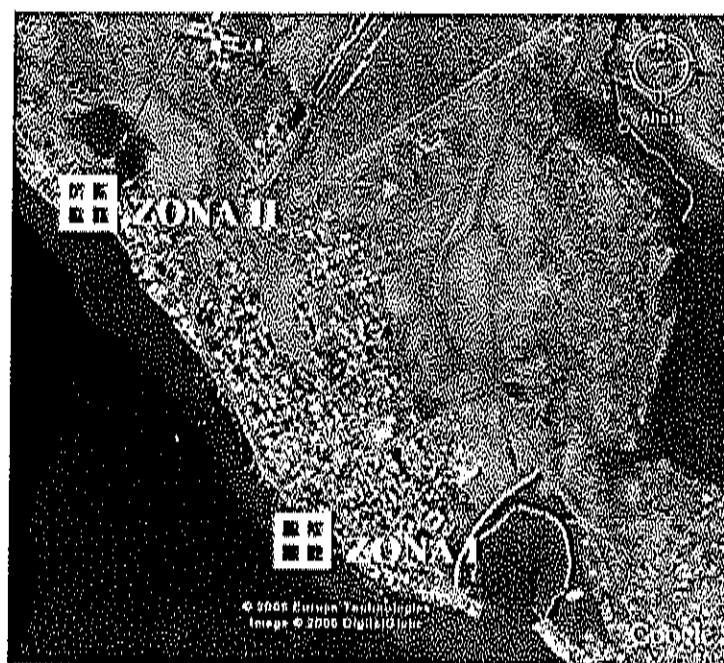
El muestreo se realizó en la Bahía de Altata, Navolato, Sinaloa y en Mazatlán, Sinaloa. La toma de muestras se llevó a cabo en dos periodos, el primero en Noviembre de 2005 y el segundo de Abril a Julio de 2006. Las muestras de agua se tomaron con frecuencia quincenal y se seleccionaron múltiples puntos de análisis en cada playa.

En la Bahía de Altata se seleccionaron dos zonas de análisis: zona 1 (ZI), limitada por las coordenadas 24° 37' 47.11" latitud norte, 107° 55' 45.04" longitud oeste. En esta área se realizan actividades restauranteras, pesqueras y embarcaciones; zona 2 (ZII), 24° 38' 13.33" latitud norte, 107° 56' 5.68" longitud oeste, caracterizada por la presencia de asentamientos humanos y recepción de aguas estuarinas.

En Mazatlán, se seleccionaron tres zonas: zona 1 (ZI), perteneciente a la Playa Gaviotas, localizada en las coordenadas geográficas 23° 14' 35.42" latitud norte, 106° 27' 15.68" longitud oeste, en esta área existe una gran afluencia de turistas nacionales e internacionales, se realizan actividades hoteleras y recreativas; zona 2 (ZII), localizada en la Playa Norte, con coordenadas 23° 12' 40.56" latitud norte, 106° 25' 18.67" longitud oeste, área con afluencia de bañistas y actividades comerciales y zona 3 (ZIII), ubicada en las coordenadas 23° 11' 4.33" latitud norte, 106° 25' 30.33" longitud oeste;

se encuentra localizada a un costado de la planta tratadora de aguas residuales, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Los puntos de muestreo de la Bahía de Altata y Mazatlán, se muestran en la figura 5 y 6, respectivamente. El número de muestras tomadas en cada una de las zonas seleccionadas, se aprecia en el cuadro 3.



Fuente: <http://earth.google.es/>

Figura 5. Localización de los puntos de muestreo en la Bahía de Altata



Fuente: <http://earth.google.es/>

Figura 6. Localización de los puntos de muestreo en Mazatlán.

Cuadro 3. Número de muestras recolectadas en la Bahía de Altata y Mazatlán

Playa	Zona	Número de muestras
Altata	I	6
	II	6
Mazatlán	I	7
	II	7
	III	6
Total		32

Procedimiento de Muestreo

El muestreo se realizó de acuerdo a los lineamientos para determinar la calidad de agua de mar para uso recreativo con contacto primario de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA, 2004), que incluye los siguientes requisitos:

Zonas de oleaje tranquilo: Las muestras se tomaron a una distancia aproximada de 15m a partir de la orilla y 30cm bajo la superficie del agua (SSA, 2004).

Zonas con rompiente cercana a la orilla: Las muestras se tomaron pasando la rompiente a una profundidad del agua de 1-1.5m y 30cm bajo la superficie del agua (SSA, 2004).

Se tomó una muestra adicional en cada zona de muestreo para determinar la temperatura, pH (Waterproof pHTest 3+ Double Junction), salinidad (Salintest HI98203 Hanna) y turbidez (Portable Turbidímetro HACH, 2100P).

Recuperación de Virus a Partir de Agua de Mar

Las muestras se procesaron de acuerdo al método 9510-C, establecido por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1999), para la concentración de virus a partir de grandes volúmenes de agua en un proceso de dos etapas: adsorción – elución; con base a los Procedimientos para la Recolección de Muestras de Protozoarios y Virus

Entéricos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 1995) y con base al Manual de Métodos de Virología de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 1984; 2001).

Filtración-Adsorción. Se recolectaron 250L de agua de mar en un recipiente estéril, con una bomba de gasolina (Honda, modelo WX10). A la muestra se le ajustó el pH a 3.5 ± 0.1 con HCl 6N (Anexo IA) (EPA, 1984; 1995; APHA, 1999). La muestra de agua se pre-filtró en un filtro de polipropileno de 25.4cm de longitud con un tamaño de poro de $1\mu\text{m}$ (EPA, 1984; 1995). Posteriormente, se pasó por un filtro electronegativo (DFN 0.45-10UN; Filterite/ PALL Corporation) de 25.4cm de longitud con un tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ (EPA, 1984; APHA, 1999) con una velocidad de flujo de 5gal/min. Finalmente, el filtro se colocó en una bolsa de plástico estéril y se almacenó a 4°C (APHA, 1984; EPA, 1995; 2001) hasta su traslado al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos (LMAA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) para su análisis. Las muestras se procesaron después de 24 horas de su recolección.

Elución. Las partículas virales retenidas en el filtro se eluyeron con una solución de extracto de carne al 3% ajustando su pH 9.0 ± 0.1 (Anexo IA) con NaOH 5N (Anexo IA) (EPA, 1984). Se colocó un litro de extracto de carne en la base del filtro (EPA, 2001), manteniéndolos en contacto por 10min. El extracto de carne se pasó por el filtro

aplicando una presión positiva no mayor a 0.4kg/cm^2 con una bomba de vacío (Felisa FE-1600FE-1600L) (EPA, 1984). Esta etapa se repitió dos veces (APHA, 1999).

Concentración. La concentración se realizó mediante la técnica de floculación orgánica de Katzenelson (APHA; 1999, EPA; 1984; 2001) como se describe a continuación: Se ajustó el pH del eluido a 3.5 ± 0.1 con HCl 1N (Anexo IA), se agitó lentamente por 30min para formar un precipitado (flóculos) (APHA, 1999; EPA, 1984; 2001) y se centrifugó a $2450 \times g$ por 20min/4°C (Thermo IEC Multi RF, rotor # 8947). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 30mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15M, pH 9.0-9.5 (Anexo IA). La suspensión se mezcló hasta disolverse completamente y se le ajustó el pH en un rango de 7-7.5 con HCl 1N o NaOH 1N (Anexo IA) según se requirió (APHA, 1999; EPA, 2001). Los 30mL de la suspensión se concentraron por ultrafiltración con un Centricon 100 microconcentrador (100,000 NMWL; Amicon Ultra-15; Millipore), colocando 15mL de muestra en el microconcentrador y centrifugando a $2450 \times g$ por 40min (Centra CL3 Thermo IEC, rotor #243). El proceso se repitió dos veces. La muestra se almacenó a -20°C hasta la etapa de extracción de ARN viral.

Detección de NV y VHA

Extracción de ARN viral. Para la extracción del ARN viral, se usó el kit de aislamiento de ARN Viral QIAamp Viral RNA (QIAGEN), como lo recomienda el fabricante. Se mezclaron 560µl de solución tampón AVL/Carrier ARN (Anexo IB) con 140µl de la muestra concentrada. La solución se homogenizó con pulsos en el vórtex por 15s y se incubó a temperatura ambiente por 10min. Posteriormente, se le añadieron 560µl de etanol (96-100%) (Anexo IB), se homogenizó con pulsos en el vórtex por 15s y se centrifugó brevemente (Eppendorf 5415D). En la columna spin QIAamp se colocaron 630µl de la solución y se centrifugó a 6000 x g/1min. La solución restante se colocó sobre la columna spin QIAamp y se centrifugó nuevamente a 6000 x g/1min. En la columna spin QIAamp se agregaron 500µl de la solución tampón AW1 (Anexo IB) y se centrifugó a 6000 x g/1min. Posteriormente, se agregaron 500µl de solución tampón AW2 (Anexo IB) y se centrifugó a 16,100 x g/3min. Por último, el ARN extraído se eluyó de la membrana, añadiendo 60µl de solución tampón AVE (Anexo IB), incubando a temperatura ambiente por 1min y centrifugando a 6000 x g/1min. El ARN viral extraído de la muestra se almacenó a -70°C hasta la reacción de RT-PCR.

Retro-Transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). La RT-PCR, se efectuó usando primers específicos de gen y en una sola etapa con el kit One-Step RT-

PCR (QIAGEN) para NV y con el kit Access RT-PCR System (Promega) para VHA, como lo recomienda el fabricante. La mezcla maestra se realizó a un volumen total de 50µl por reacción para cada muestra (Cuadro 4 y 5). En cada reacción de RT-PCR, se usó un control positivo (Cuadro 4 y 5) y un blanco (Cuadro 4 y 5) para la verificación de resultados, con un volumen de 25µl por reacción. Para el control positivo de VHA se usó la cepa ATCC VR-1402 y para el control positivo de NV, se usaron partículas virales provenientes de muestras fecales de un brote en Panamá, llamadas PAN II, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Ambiental a cargo del Dr. Charles P. Gerba de la Universidad de Arizona.

Cuadro 4. Mezcla maestra para RT-PCR de NV

Mezcla maestra para RT-PCR				
Reactivos (µl)	Muestra	Control positivo	Blanco	Concentración final
Buffer 5x	10	5	5	1x
dNTP's (10mM c/u)	2	1	1	400µM/dNTP
Oligonucleótido sentido (100µM)	3	1.5	1.5	0.6 µM
Oligonucleótido antisentido (100µM)	3	1.5	1.5	0.6 µM
Retrotranscriptasas (Omniscript and sensiscript), Taq DNA polimerasa	2	1	1	-
Inhibidor de rnasas (40u/µl)	0.25	0.125	0.125	10u
Agua libre de rnasas	-	13.875	14.875	-
ARN molde	29.75	1	-	-
Volumen total	50	25	25	-

Cuadro 5. Mezcla maestra para RT-PCR de VHA

Mezcla maestra para RT-PCR				
Reactivos (μ l)	Muestra	Control positivo	Blanco	Concentración final
Buffer 5x	10	5	5	1x
dNTP's (10mM c/u)	1	0.5	0.5	200 μ M/dNTP
Oligonucleótido sentido (100 μ M)	0.25	0.125	0.125	1 μ M
Oligonucleótido antisentido (100 μ M)	0.25	0.125	0.125	1 μ M
MgSO ₄ (25mM)	2	1	1	1mM
Retrotranscriptasa AMV (5u/ μ l)	1	0.5	0.5	0.5u
Polimerasa Tfl DNA (5u/ μ l)	1	0.5	0.5	0.5u
Inhibidor de masas (20u/ μ l)	0.25	0.125	0.125	5-10u
Agua libre de nucleasas	-	15.125	15.125	-
ARN molde	34.25	2	2	-
Volumen total	50	25	25	-

Las secuencias de los oligonucleótidos usados en la reacción de RT-PCR, se muestran en el Cuadro 6 y 7, para NV y VHA, respectivamente:

Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados para la detección de NV por RT-PCR

Secuencia	Región de amplificación	Tamaño del producto
MJV12 (Sentido): 5'-TAYCAYTATGATGCHGAYTA-3'	Región A del genoma (Vinjé <i>et al.</i> , 2004)	327pb
REGA (Antisentido): 5'-CTCRTCATCICCATARAAIGA-3'		

Cuadro 7. Oligonucleótidos utilizados para la detección de VHA por RT-PCR

Secuencia	Región de amplificación	Tamaño del producto
HEPA U (Sentido): 5'-CAGCACATCAGAAAGGTGAG-3'	Interfase de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 (Griffin <i>et al.</i> , 1999)	192pb
HEPA D (Antisentido):		
5'-CTCCAGAATCATCTCCAAC-3'		

La muestra y los controles positivo y negativo, se colocaron en un termociclador de gradiente (Eppendorf 5331), el cual se programó como se indican en los Cuadros 8 y 9 para NV y VHA, respectivamente. El proceso se repitió durante 40 ciclos.

Cuadro 8. Condiciones de amplificación para NV

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Retro-transcripción	30	50
Activación Hot start Taq DNA polimerasa	15	95
Desnaturalización	1	94
Alineamiento	1	45
Extensión	1	72
Extensión final	10	72

Cuadro 9. Condiciones de amplificación para VHA

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Retro-transcripción	45	45
Inactivación de retrotranscriptasa AMV/Desnaturalización híbrido ARN/ADNc	2	94
Desnaturalización	0.5	94
Alineamiento	1	60
Extensión	2	68
Extensión final	7	68

Los productos obtenidos por RT-PCR, se analizaron en un gel de agarosa al 1% (Anexo IC), elaborado con TAE 1X (Anexo IC). El gel se colocó en una cámara electroforética (Thermo EC105) y las muestras (10µl de muestra, 2µl de colorante de carga Blue/Orange 6X, Promega) se depositaron en los pocillos. Se utilizaron 3 µl de marcador 100pb ladder ADN (Promega). La electroforesis se realizó a 90volts por 30min. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline). Las muestras positivas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Identificación de NV y VHA

Clonación

PCR. Las muestras positivas se amplificaron por PCR, usando el kit PCR Core Systems I (Promega), para incrementar la cantidad de producto para la clonación. Se preparó la mezcla maestra y se llevó a un volumen total de 50 μ l por reacción (Cuadro 10). En cada reacción, se incluyó un control positivo (Cuadro 10) y un blanco (Cuadro 10). El control positivo consistió en ADNc obtenido de RT-PCR y en el blanco se sustituyó ADNc por agua.

Cuadro 10. Mezcla maestra para PCR de NV y VHA

Mezcla maestra para PCR				
Reactivos (μ l)	Muestra	Control positivo	Blanco	Concentración final
MgCl ₂ (25mM)	5	5	5	2.5mM
Buffer (10x)	5	5	5	1x
dNTP's (10mM c/u)	2	2	2	400 μ M/dNTP
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	3	3	3	0.6 μ M
Oligonucleótido antisentido (10 μ M)	3	3	3	0.6 μ M
Taq DNA Polimerasa, (5u/ μ l)	0.4	0.4	0.4	2u
Agua libre de nucleasas	26.6	30.6	31.6	-
ADNc	5	1	-	-
Volumen Total	50	50	50	-

La muestra y los controles positivo y negativo, se colocaron en un termociclador de gradiente (Eppendorf 5331), el cual se programó con las condiciones que se indican en el Cuadro 11 y 12 para NV y VHA, respectivamente. El proceso se repitió durante 40 ciclos.

Cuadro 11. Condiciones de amplificación para NV

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Activación Hot start Taq DNA polimerasa	15	95
Desnaturalización	1	94
Alineamiento	1	45
Extensión	1	72
Extensión final	10	72

Cuadro 12. Condiciones de amplificación para VHA

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Activación Hot start Taq DNA polimerasa	15	95
Desnaturalización	1	94
Alineamiento	1	52
Extensión	1	72
Extensión final	10	72

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. El gel se colocó en una cámara electroforética (Thermo EC105) donde se colocaron 15µl de producto de PCR, 2µl de colorante de carga Blue/Orange 6X (Promega) y 3µl del marcador 100pb ADN (Promega). La electroforesis se realizó a 90volts por 30min. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline).

Poliadenilación. Se colocaron 25µl del producto obtenido por PCR en un vial sobre hielo, se añadió 0.4µl(2u) de ADN Taq Polimerasa (Promega) y 1µl de nucleótidos (PCR Nucleotide Mix, Promega). La reacción se mezcló suavemente y se incubó 72 °C/10 min.

Las muestras positivas, se clonaron utilizando el kit TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen), como describe el fabricante.

Reacción de ligación. La reacción de ligación se realizó al poner en contacto el fragmento de ADN amplificado de las muestras positivas poliadeniladas, con el vector de clonación pCR 4-TOPO (Invitrogen), bajo las siguientes condiciones (Cuadro 13):

Cuadro 13. Reacción de ligación

Componentes de la reacción	Volumen (μ l)
Producto PCR	4
Solución Salina	1
Vector pCR 4-TOPO	1
Volumen total	6

La reacción se incubó 5min a temperatura ambiente y se colocó sobre hielo. Posteriormente, se procedió con la transformación de las células competentes.

Transformación de bacterias. En un vial con células de *Escherichia coli* (TOP 10) químicamente competentes se colocaron 2 μ l de la reacción de ligación. La mezcla se incubó en hielo por 15min, se sometió a choque térmico por 30s/42°C (Termo baño Felisa FE-373) sin agitación e inmediatamente se colocó sobre hielo. A la mezcla se le añadieron 250 μ l de medio SOC y se incubó por 1hr/37°C con agitación a 100rpm (Shak-r-bath Lab line 3580R). Se tomaron 100 μ l de la suspensión bacteriana y se extendieron en placa sobre agar LB (Luria Bertani)-Ampicilina (50 μ g/mL) (Anexo IIE). Las placas se incubaron por 24hrs / 37°C.

Análisis de bacterias transformadas. De las células transformadas obtenidas se tomaron 10 colonias aleatoriamente, se estiraron de manera independiente sobre placas con agar LB-ampicilina (50µg/mL) y se incubaron por 24hrs/37°C.

Aislamiento y Purificación de ADN Plasmídico

Protocolo de lisis alcalina. Se tomaron cada una de las 10 colonias de las células transformantes, se inocularon en 10mL de medio LB-ampicilina (50µg/mL) y se incubaron por 18hrs/37°C/250rpm. Se empastilló todo el cultivo bacteriano, a la pastilla celular obtenida se le agregaron 200µl de la solución 1 fría (Glucosa 0.5 M, Tris-Base 0.25M, EDTA 0.1M) (Anexo ID), se resuspendió hasta mezclar completamente. Se agregaron 200µl de la solución 2 recién preparada (NaOH 1N, SDS 10%) (Anexo ID), se mezcló suavemente por inversión y por último se le agregaron 150µl de la solución 3 fría (Acetato de sodio 5M, Ácido acético glacial, Agua destilada) (Anexo ID), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5min. La suspensión se centrifugó a 16,100 x g por 5min. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo estéril, se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1) (Anexo ID), se agitó y se centrifugó a 16,100 x g por 5min. La fase superior se transfirió (sin disrumpir interfase) a un tubo limpio, se le agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% frío, se dejó precipitar 24hrs/-20°C y se centrifugó a 16,100 x g por 20min. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con etanol al 70% frío (Anexo ID), se centrifugó a 16,100 x g por 1min para retirar el etanol

remanente y se secó a temperatura ambiente. La pastilla seca se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril, se le agregaron 0.5 μ l de Ribonucleasa A (20 μ g/mL; Promega) y se incubó por 2hrs/37°C. El ADN plasmídico obtenido se analizó en un gel de agarosa al 1%.

Digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. El ADN plasmídico obtenido en la etapa anterior se sometió a una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega) para verificar la presencia del inserto (Cuadro 14), llevándola a un volumen final de 20 μ l por reacción.

Cuadro 14. Digestión del ADN plasmídico con *EcoRI*

Reactivo	Vol/reacción (μ l)	Concentración final
ADN plasmídico	7	-
Solución tampón H, 10X	2	1X
BSA, 10mg/mL	0.2	1X
Enzima <i>EcoRI</i> , 12u/ μ l	0.66	8u/20 μ l
Agua	10.13	-

La reacción se incubó por 24hrs/37°C y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

Aislamiento y purificación de ADN plasmídico para secuenciación. El aislamiento y purificación de ADN plasmídico para secuenciación de cada una de las clonas obtenidas, se efectuó con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), como lo recomienda el fabricante. La clona seleccionada, se inoculó en 10mL de medio de cultivo LB con ampicilina (50µg/mL) (Anexo IE) y se incubó 18hrs/37°C/100rpm (Shak-r-Bath Labline 3580R). Se determinó la densidad óptica (OD₆₀₀) del medio de cultivo. Si la lectura arrojaba un valor entre 2 y 4, se proseguía con la siguiente etapa. El medio de cultivo (10mL) se centrifugó 5min a 10,000 \times g (Termo IEC Multi RF, rotor #8850), el sobrenadante se desechó y a la pastilla celular obtenida se le agregaron 250µl de solución de resuspensión celular y se mezcló completamente. A la suspensión celular se le agregaron 250µl de solución de lisis celular, se mezcló por inversión 4 veces y se incubó 5min. Posteriormente, se le añadieron 10µl de solución proteasa alcalina y se repitió el mismo proceso.

Se agregaron 350µl de solución de neutralización Wizard Plus SV, se mezcló por inversión 4 veces y se centrifugó a 16,100 \times g por 10min. El sobrenadante se transfirió a la columna spin por decantación y se centrifugó a 16,100 \times g por 1min. La columna spin se lavó con 750µl de solución de lavado centrifugando a 16,100 \times g por 1min, repitiendo el lavado con 250µl de solución y centrifugando a 16,100 \times g por 2min. El ADN plasmídico se eluyó con 100µl de agua libre de nucleasas, centrifugando a 16,100 \times g por 1min. El ADN plasmídico se analizó en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó por

absorbancia en un biofotómetro (Eppendorf 6131). El ADN plasmídico se envió al Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México para su secuenciación. El equipo utilizado fue ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

Purificación de ADN a partir de agarosa para secuenciación. El ADN de las muestras positivas que se observó con gran intensidad en un gel de agarosa al 1%, se purificó a partir del gel de agarosa, usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), como lo recomienda el fabricante, con algunas modificaciones. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%, el gel se colocó en una cámara electroforética (Thermo EC105), las muestras (volumen variable) se depositaron en los pocillos con el colorante de carga Blue/Orange 6X (Promega), se utilizaron 3µl de marcador 100pb ladder DNA (Promega) y la electroforesis se realizó a 90volts por 30min. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline). El fragmento de ADN se cortó en un volumen mínimo de agarosa, se pesó y se añadió solución de unión a membrana en una relación de 10µl de solución por cada 10mg de gel. La mezcla se incubó por 10min a 55°C, agitando constantemente hasta disolver el gel. En la columna SV sobrepuesta en un tubo de 2ml., se colocó el gel disuelto, se incubó 1min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000 x g por 1min. La columna se lavó dos veces con 700µl y 500µl de la solución de

lavado de membrana (Anexo IF) y se centrifugó a $16,000 \times g$ por 1min y 5min respectivamente. La columna se centrifugó a $16,000 \times g$ en tres tiempos 1 min, 5min y 1min, para remover cualquier residuo de alcohol. Por último, el ADN purificado se eluyó de la columna SV al añadir $25\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por 1min y se centrifugó a $16,000 \times g$. Una vez que el ADN purificado, se visualizó en un gel de agarosa al 1% al cargar $5\mu\text{l}$, se envió al Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México para su secuenciación. El equipo utilizado fue ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystem)

Análisis Filogenético

La secuencia de nucleótidos obtenida, se analizó por comparación en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997), para identificar secuencias similares y/o con relación genética con la secuencia bajo estudio. Las secuencias identificadas se alinearon con el programa Multialin (Corpet, 1988) en formato FASTA. Posteriormente, se hizo un alineamiento múltiple de secuencias con el programa BioEdit (Hall, 2005). Por último, se realizó el análisis filogenético con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 3.1) (Kumar *et al.*, 2004), presentando los resultados

mediante un árbol filogenético (cladograma) con el Método Neighbor-Joining y el Modelo Jukes-Cantor (Cuadro 15 y Cuadro 16).

Cuadro 15. Cepas de NV usadas para el análisis filogenético

Cepa	Genogrupo	No. Acceso
8FIIa	GI	M87661
Southampton	GI	L07418
Hesse	GI	AF093797
Chiba407	GI	AB022679
Hawai	GII	U07611
Lordsdale	GII	X86557
KY89	GII	L23828
Melksham	GII	X81879
Bristol	GII	X76716
Mexico	GII	U22498
Arg320	GII	AF190817
Virginia 207	GII	AY038599
Jena	GIII	AJ011099
Fort	GIV	AF414426
Saudi	GIV	AF414427
Murine Calicivirus	GV	AR862950

Cuadro 16. Cepas de VHA usadas para el análisis filogenético

Cepa	Genotipo	No. Acceso
FH1	IA	AB020567
LY6	IA	AF485328
GBM	IA	X75215
CR-326	IA	M10033
FG	IA	X83302
HM-175	IB	M14707
HM-175/18f	IB	M59808
MBB	IB	M20273
LA1	IB	AF314208
HAF-203	IB	AF268396
CF53/Berne	IIA	AY644676
PB8	IIA	DQ141214
NOR-21	IIIA	AJ299463
HA-JNG06-90F	IIIB	AB258387
CY-145	IV	M59286
AGM-27	V	D00924
JM-55	VI	-
SLF88	VII	AY644670

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados se dividió en dos partes, un análisis estadístico y un análisis filogenético. El análisis estadístico consistió en un análisis descriptivo de la presencia/ausencia de NV y VHA en agua de mar en la Bahía de Altata y playas de Mazatlán presentando los datos gráficamente y en la aplicación de la Regresión Logística Binaria para la predicción del riesgo de la presencia de NV y VHA en función de los parámetros fisicoquímicos del agua temperatura, turbidez y salinidad. La segunda parte consistió en un análisis filogenético con el programa Molecular Evolutionary Genetic Análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas.

Análisis Estadístico

Regresión Logística Binaria

La Regresión Logística Binaria es un modelo matemático que se usa para estimar el comportamiento de una variable dependiente binaria (Y) en función de una o más variables independientes o explicativas (x_1, x_2, \dots, x_k) . El modelo es estimativo, ya que, estima la relación entre las variables independientes y la variable dependiente. También, es predictivo porque ayuda a predecir valores de la variable dependiente en función de los valores de las variables independientes (Kleinbaum *et al.*, 1998).

La expresión matemática general de una Función Logística es:

$$f(z) = \frac{1}{1 + e^{-z}} \quad (1)$$

Gráficamente tiene una forma sigmoide (Figura 7).

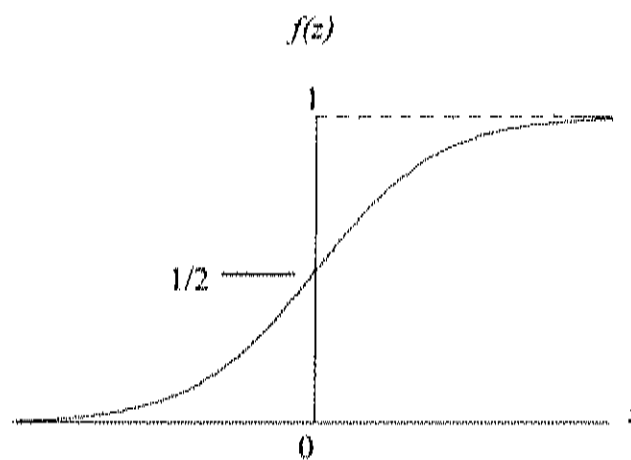


Figura 7. Función logística

donde $f(z)$ toma valores de 0 a 1, cuando z varía de $-\infty$ a $+\infty$, permitiendo modelar la probabilidad de ocurrencia de un evento de interés, razón por la que ha sido ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos (Kleinbaum *et al.*, 1998).

El modelo de regresión logística se obtiene de la función logística al expresar z como una suma lineal: $z = \beta_0 + \beta_1 + \beta_2 + \dots + \beta_k$. Se representa con la ecuación:

$$f(x_1, x_2, \dots, x_k) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)}} \quad (2)$$

donde, x_1, x_2, \dots, x_k son las variables independientes, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ son los parámetros del modelo. Estos parámetros permiten expresar la relación entre las variables independientes y la variable dependiente (Kleinbaum *et al.*, 1998).

La variable dependiente Y toma dos posibles valores 1 ó 0, que describen la probabilidad de que ocurra Y cuando toma el valor de 1 (presencia) y la probabilidad de que no ocurra Y cuando toma el valor 0 (ausencia) (Kleinbaum *et al.*, 1998). El modelo de regresión logística se representa con la ecuación:

$$P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)}} \quad (3)$$

Después de simplificar algebraicamente el modelo:

$$P(Y = 1) \left[1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)} \right] = 1 \quad (4)$$

$$P(Y = 1) + e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)} P(Y = 1) = 1 \quad (5)$$

$$e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)} P(Y = 1) = 1 - P(Y = 1) \quad (6)$$

$$\frac{1 - P(Y = 1)}{P(Y = 1)} = \left[\frac{P(Y = 0)}{P(Y = 1)} \right] = e^{-(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k)} \quad (7)$$

Tomando logaritmos en ambos lados de la ecuación:

$$\text{Ln} \left[\frac{1 - P(Y = 1)}{P(Y = 1)} \right] = -(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k) \quad (8)$$

Aplicando las propiedades de los logaritmos:

$$\text{Ln}[P(Y = 1)] - \text{Ln}[1 - P(Y = 1)] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k \quad (9)$$

$$\text{Ln}\left[\frac{P(Y = 1)}{1 - P(Y = 1)}\right] = \text{Ln}\left[\frac{P(Y = 1)}{P(Y = 0)}\right] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k \quad (10)$$

Definiendo $\text{Logit}[P(Y = 1)] = \text{Ln}\left[\frac{P(Y = 1)}{P(Y = 0)}\right]$ obtenemos una expresión lineal

llamada forma *Logit* del modelo, definida como el logaritmo natural de la razón de momios, que nos permitirá estimar los parámetros del modelo mediante el método de máxima verosimilitud (Kleinbaum *et al.*, 1998), obteniendo la forma siguiente:

$$\text{Logit}[P(Y = 1)] = \text{Ln}\left[\frac{P(Y = 1)}{P(Y = 0)}\right] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k \quad (11)$$

La razón $\left[\frac{P(Y = 1)}{P(Y = 0)}\right]$ se denomina razón de momios (Odds Ratio) y se utiliza

para comparar razones de riesgo para diferentes valores de las variables independientes, como se ilustrará en la discusión de resultados. A partir del modelo *Logit* anterior, la razón de momios puede expresarse formando antilogaritmos, como:

$$\left[\frac{P(Y = 1)}{P(Y = 0)}\right] = e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k} \quad (12)$$

En este estudio el modelo de regresión logística binaria usado fue:

$$P(\text{presencia}) = P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S)}} \quad (13)$$

donde, $P(\text{presencia})$ es la probabilidad de la presencia de NV o VHA, T es la temperatura, Tu es la turbidez y S la salinidad. La forma *Logit* para estimar los parámetros del estudio queda expresada como:

$$\text{Logit} [P(\text{presencia})] = \text{Ln} \left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right] = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S \quad (14)$$

La razón indica la probabilidad que el virus esté presente sobre la probabilidad de que esté ausente.

$$\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right] = e^{\beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S} \quad (15)$$

El cociente de razón de momios de un factor hace referencia al incremento unitario del factor, cuando los otros factores permanecen constantes. Un cociente de razón de momios, mayor que uno indica aumento en la probabilidad del evento y un cociente de razón de momios menor que 1 implica una disminución. La ecuación toma la forma siguiente:

$$\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right] = e^{\beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S} \quad (16)$$

El modelo nos permitió estimar la probabilidad de riesgo de la presencia de NV y VHA, bajo ciertas condiciones de temperatura, turbidez y salinidad. El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Minitab versión 14.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Estadístico

Análisis Descriptivo

El número de muestras de agua de mar analizadas fue de 32. Se tomaron 20 muestras de agua de mar en Mazatlán; de las cuales, 7 corresponden a la zona 1 (ZI), 7 a la zona 2 (ZII) y 6 a la zona 3 (ZIII). En la Bahía de Altata se tomaron 12 muestras; de las cuales, 6 muestras corresponden a la zona 1 (ZI) y 6 muestras a la zona 2 (ZII).

Los resultados obtenidos por RT-PCR se reportaron como presencia o ausencia. Se encontró la presencia de virus en el 56.25% (18/32) de las muestras analizadas y sólo en el 6.25% (2/32) se detectaron simultáneamente ambos virus (NV y VHA) (Figura 8).

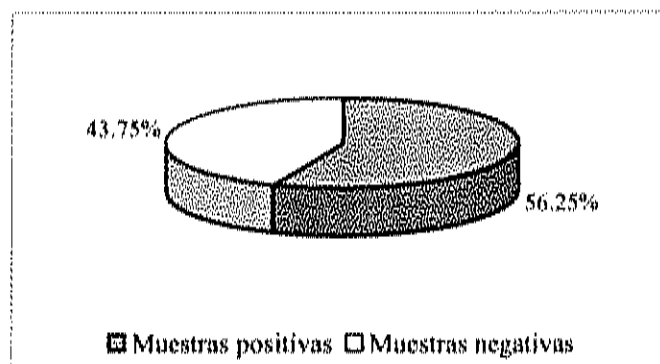


Figura 8. Porcentaje de muestras positivas y negativas

El 12.5% (4/32) de las muestras positivas se encontraron en la Bahía de Altata y el 43.75% (14/32) en Mazatlán (Figura 9).

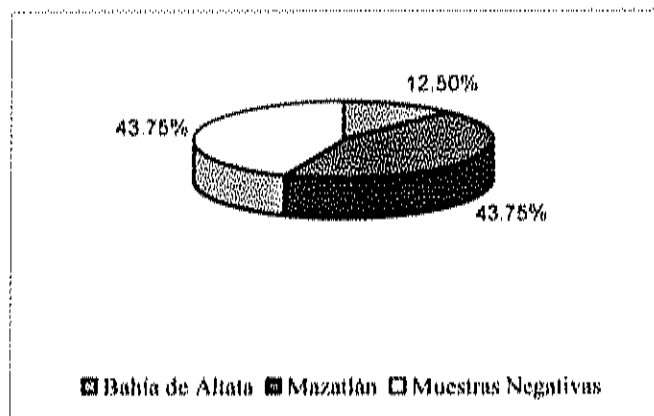
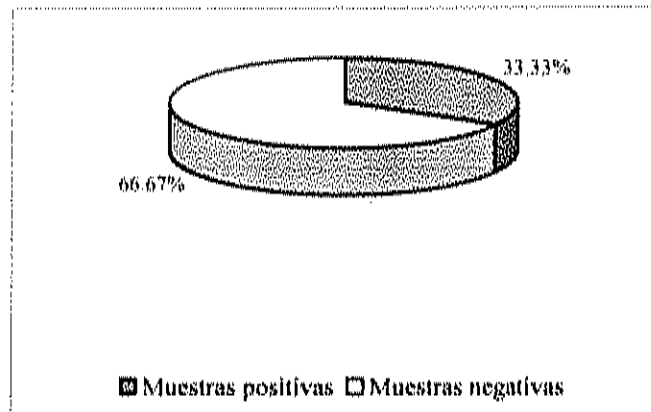


Figura 9. Porcentaje de muestras positivas en la Bahía de Altata y Mazatlán

Se detectó la presencia de NV en 15 de las 32 muestras analizadas (46.875%). En la Bahía de Altata se detectó en 4 de 12 muestras (33.33%) y en Mazatlán en 11 de 20 muestras (55%) (Figura 10).

Bahía de Altata



Mazatlán

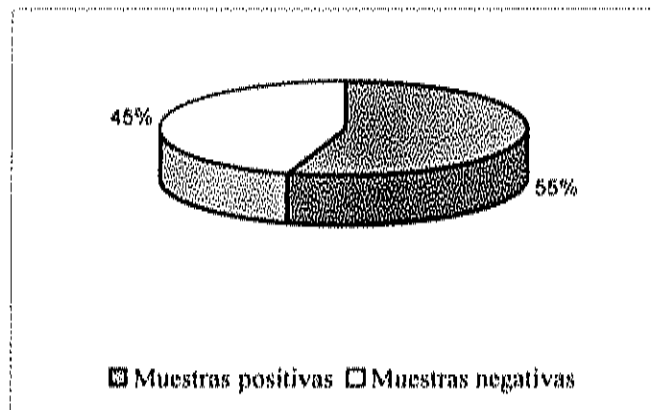


Figura 10. Porcentaje de muestras positivas de NV en la Bahía de Altata y Mazatlán

En la Bahía de Altata se analizaron 2 zonas, en la zona 1 (ZI) se encontraron 1/6 (16.66%) y en la zona 2 (ZII) 3/6 (50%) muestras positivas de NV. En Mazatlán, se

muestrearon 3 zonas, en la zona 1 (ZI) se encontraron en 4/7 (57.14%), en la zona 2 (ZII) 6/7 (85.71%) y en la zona 3 (ZIII) 1/6 (16.66%) muestras positivas (Figura 11).

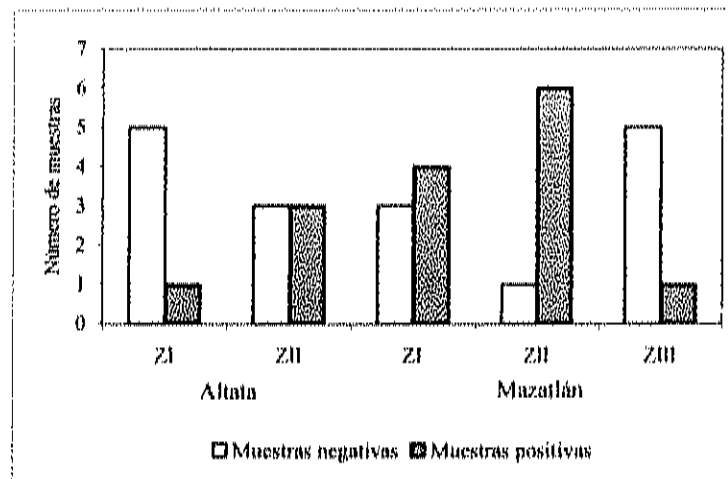


Figura 11. Presencia de NV por zonas en la Bahía de Altata y Mazatlán

La presencia del VHA se demostró en 3 de las 32 muestras analizadas (9.375%). En la Bahía de Altata todas las muestras analizadas resultaron negativas y en Mazatlán 3 de 20 muestras (15%) resultaron positivas (Figura 12).

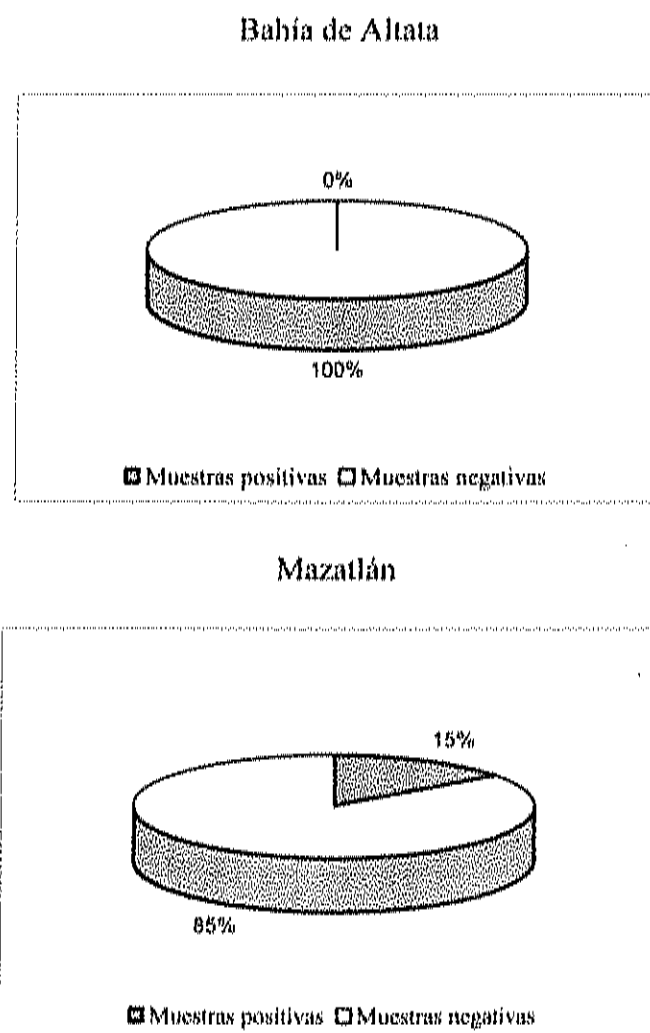


Figura 12. Porcentaje de muestras positivas de VHA en la Bahía de Altata y Mazatlán

Sólo en 1/7 (14.28%) muestras de la zona 1 (ZI) y 2/7 (28.57%) muestras de la zona 2 (ZII) de Mazatlán, se detectó VHA (Figura 13).

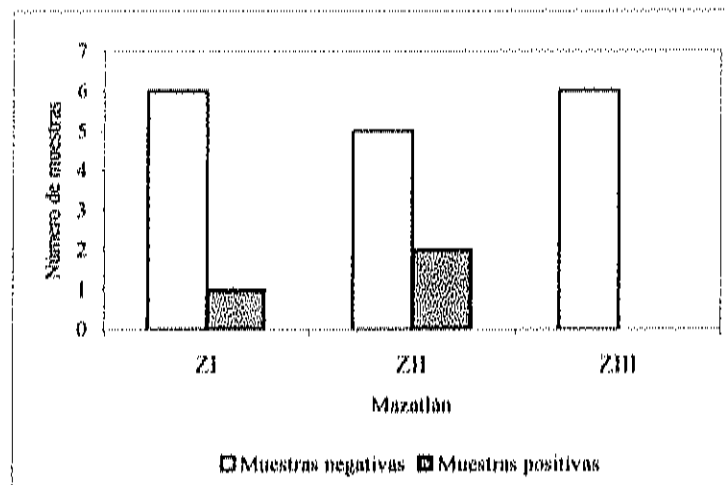


Figura 13. Presencia de VHA por zonas en Mazatlán

El estudio de la presencia de virus entéricos en aguas costeras se inició hace 30 años aproximadamente en diversas regiones del mundo como: Italia, Estados Unidos y España, reportando la presencia de Enterovirus (Pianetti *et al.*, 2000), Poliovirus (Muscillo *et al.*, 1999), Reovirus (Aulicino *et al.*, 2000), Adenovirus (Vantarakis *et al.*, 2005), VHA (Pina, 2001) y Virus Norwalk (Katayama *et al.*, 2002), entre otros.

Su importancia ha adquirido un mayor auge en los últimos años, debido a que, la presencia de virus patógenos como NV, Astrovirus, Rotavirus y VHA en agua costera

para uso recreativo, representa un problema de salud pública. Existen diversos estudios epidemiológicos que demuestran el riesgo de adquirir enfermedades infecciosas asociadas con agua de uso recreativo (Pina, 2001; Griffin *et al.*, 2003).

En México, desde el 2003 se realiza el análisis microbiológico del agua de las principales playas turísticas del país, en el que sólo se monitorean los enterococos fecales. Por lo que, este trabajo de investigación es el primero que se realiza en Sinaloa, incluso en México, con el propósito de evaluar la presencia de NV y VHA en agua de mar de uso recreativo en la Bahía de Altata y playas de Mazatlán.

La mayor presencia de NV se detectó en la zona 2 de la Bahía de Altata y en la zona 2 de Mazatlán. Mientras que, la mayor presencia de VHA se detectó en la zona 2 de Mazatlán. La presencia de estos virus en la Bahía de Altata y Mazatlán, puede estar asociada a diferentes factores, entre ellos, que la Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón, recibe aportaciones de aguas residuales vertidas por 15 drenes, además, es cuerpo receptor del Río Culiacán, que fluye hacia el interior de la bahía adoptando características estuarinas, esta zona también recibe aguas de desecho de uso doméstico de la población y se encuentra cercana a un área con actividad restaurantera y embarcaciones. En Mazatlán dicha presencia, se puede atribuir a que es una zona con gran afluencia de bañistas y ellos mismos pueden contaminarla, además es receptora de aguas pluviales y se encuentra a escasos metros de una intensa actividad hotelera y restaurantera.

Está reportado que una de las rutas de entrada de microorganismos patógenos de heces humanas y animales en aguas costeras, es la descarga de los desechos a los ríos y la subsecuente descarga de éstos a los estuarios y por último a las zonas costeras (Pommepuy *et al.*, 2006), otra ruta es la descarga directa en las zonas costeras de aguas residuales tratadas o parcialmente tratadas y la descarga de agua de desecho de áreas urbanas o rurales (Dorfman, 2004). También, existen modelos estadísticos que se usan para predecir la calidad del agua y algunos consideran que el agua de lluvia está relacionada con la contaminación fecal (Pommepuy *et al.*, 2006), ya que, arrastra contaminación hacia los cuerpos de agua (Dorfman, 2004).

El virus que se detectó con mayor frecuencia en las 32 muestras fue NV (46.875%). En un estudio previo se detectaron Enterovirus(79%), VHA(63%) y NV(10%) en 19 muestras de agua costera analizadas por RT-PCR con condiciones de temperatura y salinidad similares (29-33°C y 27-34ppt) a las de este estudio (25-38°C y 23-35ppt), encontrando con mayor frecuencia VHA (Griffin *et al.*, 1999). Por lo que, debemos considerar que la viabilidad y estabilidad de los virus en agua de mar es impredecible (Bitton, 1994). Atribuyendo, la presencia de estos microorganismos a contaminación fecal proveniente de la descarga de aguas residuales. En Japón, Katayama *et al* (2002), analizaron 14 muestras de agua de mar de 2 playas para determinar la presencia de Enterovirus, NV y VHA, encontrando sólo la presencia de NV en 4 de las muestras analizadas. Asociando dicha contaminación a que estas playas

reciben agua de río, agua de desecho de un área urbana y son de las playas de mayor afluencia turística.

El comportamiento de los virus en el medio acuático es muy variable entre estaciones del año, días e incluso horas. Por lo que, la estabilidad de las partículas virales se verá afectada por la variación estacional en la temperatura del agua (Pina, 2001). Al analizar los datos de presencia de NV y VHA en las muestras de agua, se observa que NV aparece sólo en el otoño, primavera y verano, mientras que el VHA sólo en el otoño, considerando que no hubo muestreo en los meses de invierno. Se puede apreciar una mayor frecuencia de NV en la primavera seguida del verano y por último el otoño; tomando en cuenta que sólo se tomaron dos muestras durante esa estación. Sin embargo, el modelo nos permitió estimar que hay un alto riesgo de presencia de NV en el otoño.

Considero que este comportamiento se debe principalmente a la temperatura del agua, ya que, entre más baja sea la temperatura se favorece la presencia y estabilidad del virus. La temperatura del agua en el otoño se mantuvo en un rango de 25-26.5°C, en la primavera de 25-31°C y en el verano de 30-38°C. Aunque, el análisis hubiese sido más representativo con un mayor número de muestras.

Estudios previos realizados de 1978-1998 en 8 países, señalaron la presencia de NV a lo largo de todo el año. Reportaron un mayor índice de casos de gastroenteritis en los meses de invierno, afectando principalmente a los adultos, sugiriendo a NV como el agente causal. De los 12 estudios, uno en Inglaterra y otro en Australia, también

reportaron incidencia de NV en la primavera y el verano (Mounts *et al.*, 2000). En España (2002), se notificaron brotes durante todo el año, con frecuencia elevada en el verano y el otoño (MSAN, 2004). Por lo tanto, la temperatura del agua en ambientes marinos es un factor crítico en la viabilidad e infectividad de los virus en agua, siendo éstos más resistentes en temperaturas bajas que altas (Lo *et al.*, 1976).

De acuerdo a los resultados obtenidos, incluyendo las muestras de las zonas con menor frecuencia de presencia de los virus de interés y aquellas que dieron resultados negativos, es muy importante considerar que, un resultado negativo no asegura la ausencia del virus. Ya que, los virus están sometidos a diferentes condiciones de inactivación natural en el medio acuático que afectan su viabilidad y estabilidad. Estas condiciones aunadas al método de concentración y detección, determinarán si el virus puede ser detectado al estar presente en el agua.

El análisis de virus en agua, implica el desarrollo y aplicación de métodos de concentración, que en ocasiones no son lo suficientemente sensibles, eficaces y confiables (Pina, 2001), siendo, un proceso complejo, por la baja concentración de los virus y su dilución en grandes volúmenes de agua (Bofill-Mas *et al.*, 2005). El método de concentración empleado en este estudio fue el método adsorción-elución que se basó en la utilización de filtros con microporos (filtros electronegativos) para la adsorción del virus, uso de extracto de carne para la elución seguido de floculación orgánica. Éste es uno de los métodos más utilizados, sin embargo, presenta algunos problemas, que pueden interferir en la concentración y posterior detección del virus.

Uno de estos problemas es la adsorción de los virus sobre la superficie del filtro que se ve afectada por características del agua como pH, turbidez, concentración de materia orgánica suspendida y el tipo de virus (punto isoelectrico), que hacen variar la eficiencia de recuperación (Maier *et al.*, 2000). También, algunas investigaciones muestran que el extracto de carne puede interferir con los métodos de detección, aunque es el eluyente tradicionalmente usado (Schwab *et al.*, 1995). En nuestro estudio, se utilizó extracto de carne al 3%, pH 9.0, el cual, presenta un porcentaje de recuperación entre 83-90%, según lo reportado por Huang *et al* (2000), quienes inocularon agua con *Calicivirus* y compararon dos concentraciones de extracto de carne (3% y 1.5%), encontrando que el extracto de carne al 3% y pH 9, presentaba una mayor recuperación del virus.

En nuestro caso, no se determinó la eficiencia de recuperación del método, sin embargo, al inocular distintos volúmenes de agua de mar (8, 100, 250 y 250L) con volúmenes conocidos de suspensiones de NV y VHA (250 y 200µl de VHA, 600 y 400µl de NV, respectivamente) en experimentos individuales, se lograron detectar los virus al final del proceso. Aunque, al evaluar cada una de las etapas (filtración, elución y concentración), se detectaron virus en cada una de ellas, indicando pérdida de partículas virales, por lo que, no se obtuvo una recuperación del 100%. Este procedimiento se ha aplicado en otras investigaciones, donde se ha reportado una eficiencia de recuperación entre 60% y 80% en la concentración de enterovirus a partir de 400L de agua de mar (Farrah *et al.*, 1977).

Otro de los problemas que se presentan es que los métodos de concentración recuperan sustancias inhibidoras de diversa naturaleza (ácidos húmicos y fúlvicos, contaminantes químicos, fluidos biológicos, detergentes, polisacáridos, proteínas, etc) que interfieren en las técnicas de detección, al inhibir la acción de las enzimas utilizadas en la reacción (Schwab *et al.*, 1995). Con el propósito de reducir los niveles de esas sustancias inhibidoras del extracto de carne y las muestras, se utilizó una etapa adicional de purificación de la muestra por ultrafiltración usando un microconcentrador (Amicon Ultra Filter Units). Su uso está reportado en estudios previos para la concentración y purificación de Enterovirus, VHA y NV (Schwab *et al.*, 1995; Mocé-Llivina *et al.*, 2005).

La detección de virus usando técnicas moleculares como PCR, dependerá de la eficiencia de recuperación del método de concentración y de la pureza del virus concentrado (Bosch, 1998). Debido a los problemas que presenta el método de concentración que se utilizó en esta investigación, para descartar la posibilidad de falsos negativos, falsos positivos y confirmar los resultados, se efectuó PCR de RT-PCR para aumentar la cantidad de ADNc, visualizarlo en el gel de agarosa y emitir un resultado. Así, obtuvimos que en la RT-PCR, 8 muestras presuntamente negativas dieron positivas por PCR. Cabe mencionar que en esta situación, lo más recomendable es el uso de primers anidados, debido a que, éstos aumentan la sensibilidad y especificidad de la reacción. Además, los niveles de sensibilidad o límites de detección de un juego de primers

usados en un tipo de muestra, pueden variar cuando esos primers se utilizan con otra muestra (Griffin *et al.*, 1999).

La técnica de RT-PCR, detecta sólo la presencia, sin determinar la viabilidad de los virus. En este trabajo, no se determinó la viabilidad en ninguna de las muestras analizadas; sin embargo, se considera que cualquier virus con genoma de ARN demuestra la presencia de ARN del virión, puesto que el ARN libre sería rápidamente degradado en condiciones ambientales (Tsai *et al.*, 1995). Además, muchos análisis en cultivo celular, han mostrado la presencia de virus humanos patógenos viables en agua marina contaminada por desechos de origen humano (Griffin *et al.*, 2003).

Dentro de los factores que determinan la presencia, estabilidad y distribución de los virus en el agua se encuentran: la densidad de la población, brotes epidemiológicos, clima (lluvia), factor de dilución (marea, presión atmosférica) (Pommepuy *et al.*, 2006), radiación solar, sedimentación, concentración de nutrientes, predadores y condiciones fisicoquímicas del agua (temperatura, turbidez, salinidad y pH) (Fong *et al.*, 2005).

Los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras analizadas en este estudio fueron temperatura, salinidad, turbidez y pH. La temperatura del agua en la Bahía de Altata estuvo en un rango entre 25 y 38°C y en Mazatlán entre 25 y 36°C. La salinidad varió en un rango de 23-35ppt en la Bahía de Altata y de 25-35ppt en Mazatlán. La turbidez varió de 1.46-8UNT en la Bahía de Altata y de 1.1-5.1UNT en Mazatlán. El pH se mantuvo de 7.92-8.18 en la Bahía de Altata y de 7.91-8.2 en

Mazatlán, debido a que, sus valores no variaron significativamente, no se consideró dentro del modelo (Cuadro 17 y 18).

Cuadro 17. Parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio en la Bahía de Altata

Zona	T (°C)	pH	Turbidez (UNT)	Salinidad (ppt)
I	26-38	7.92-8.11	1.46-8	27.5-33.5
II	25-38	7.98-8.18	2.2-5	23-35

Cuadro 18. Parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio en Mazatlán

Zona	T (°C)	pH	Turbidez (UNT)	Salinidad (ppt)
I	25-31	8.06-8.2	1.56-3.892	25-33.5
II	26-31	7.94-8.1	1.1-5	25-35
III	26-36	7.91-8.12	1.46-5.1	28-32.5

El análisis de estos parámetros se consideró para predecir la presencia/ausencia de NV y VHA en el agua de mar de las playas bajo estudio. Los resultados obtenidos se muestran en el análisis estadístico.

Predicción de Riesgos

El análisis de riesgos del efecto de los factores fisicoquímicos en la presencia/ausencia de NV y VHA en agua de mar, se realizó con el modelo de Regresión

Logística Binaria. En el modelo se ingresaron 32 observaciones para cada uno de los factores analizados temperatura (T), turbidez (Tu) y salinidad (S).

Predicción de riesgos para NV

En el cuadro 19 se muestra para cada parámetro de la función de regresión logística el valor estimado, el error estándar, el valor del estadístico de prueba Z (significancia de cada parámetro) y su correspondiente valor p. Así como, la razón de momios (Odds Ratio) y un intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 19. Análisis de regresión logística. NV vs T, Tu, S

<i>Predictor</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>SE Coeficiente</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>	<i>Odds Radio</i>	<i>IC (95%)</i>	
<i>Constante</i>	28.1909	11.8572	2.38	0.017			
<i>Temperatura</i>	-0.416947	0.174817	-2.39	0.017	0.66	0.47	0.93
<i>Turbidez</i>	-0.883599	0.505309	-1.75	0.080	0.41	0.15	1.11
<i>Salinidad</i>	-0.442970	0.224038	-1.98	0.048	0.64	0.41	1.00

El análisis muestra los valores estimados de los parámetros del modelo ($\beta_0 = 28.1909, \beta_1 = -0.416947, \beta_2 = -0.883599, \beta_3 = -0.442970$). Así mismo, se muestran sus valores p asociados (0.017, 0.017, 0.080 y 0.048 respectivamente) y el

cociente de razón de momios (0.66, 0.41 y 0.64) para cada variable explicativa. Los valores p asociados a la temperatura, turbidez y salinidad son 0.017, 0.080 y 0.048 respectivamente, por lo que, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en la presencia de NV en agua de mar.

Para predecir el riesgo de presencia de NV en función de la temperatura, turbidez y salinidad se sustituyeron los valores de los estimadores en el modelo de regresión logística, obteniendo la forma siguiente:

$$P(\text{presencia}) = P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-28.19 + 0.417T + 0.884Tu + 0.443S}}$$

Respecto a la temperatura, el hecho de que tenga un coeficiente negativo (-0.417), indica que incrementos en la temperatura del agua disminuyen el riesgo de presencia del virus. El cociente de razón de momios (0.66) significa que el riesgo de ausencia estimado es 1.51 (=1/0.66) veces el riesgo de presencia. El estimador de la turbidez tiene un signo negativo (-0.884), lo cual indica que, incrementos en la turbidez disminuyen la probabilidad de presencia. El cociente de razón de momios (0.41) implica que el riesgo de ausencia es 2.44 (=1/0.41) veces el riesgo de presencia.

Por último, la salinidad presenta el mismo comportamiento que la temperatura y la turbidez, dado que, su coeficiente es negativo (-0.443) es decir, que incrementos en la salinidad del agua disminuyen la probabilidad de presencia y el cociente de razón de momios correspondiente (0.64), indica que el riesgo de ausencia es 1.56 (=1/0.64) veces el riesgo de presencia. En general, dado que, los tres coeficientes resultaron negativos,

incrementos unitarios en las variables temperatura, turbidez y salinidad disminuyen el riesgo de presencia de NV en agua de mar.

Efecto de la Temperatura

Se comparó el riesgo presencia/ausencia de NV en agua de mar, considerando la temperatura más baja (25°C) y más alta (38°C) encontradas en las muestras evaluadas, para salinidad y turbidez constantes, aplicando la fórmula 16 (pp.74), donde $T_1 < T_2$:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{T_2}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{T_1}} = e^{-0.417(T_2 - T_1)}$$

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{38}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{25}} = e^{-0.417(38 - 25)} = 0.0044$$

A fin de facilitar su interpretación, se calculó el recíproco del cociente de la razón de momios, quedando:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{25}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{38}} = \frac{1}{0.0044} = 227.27$$

Por lo que, el riesgo de presencia de NV a 25°C es 227.27 veces el riesgo de presencia a 38°C. Indicando que el riesgo de presencia es mayor a una temperatura de 25°C que a 38°C. Por tanto, incrementos en la temperatura del agua de mar afectan la presencia de la partícula viral.

Allwood *et al* (2003), analizaron agua potable inoculada con Calicivirus Felinos (FCV; por sus siglas en inglés, utilizado como modelo experimental de NV por su similitud en propiedades fisicoquímicas y su capacidad de multiplicarse en cultivo celular) a 4, 25 y 37°C, durante un periodo de 28 días. Encontrando, que a medida que aumentaba la temperatura de incubación disminuía el tiempo requerido para la reducción del 90% de la concentración viral en 7.3, 5.2 y 2 días respectivamente, es decir, la viabilidad del virus disminuía en menos tiempo a temperaturas elevadas. Kadoi *et al* (2001), mostraron que otra cepa de FCV mantuvo una reducción ≤ 1 Log durante un mes en agua de mar a 4°C y de 1 Log durante 25 días a 20°C.

Al compararlo con los resultados del presente estudio, la presencia de NV fue mayor a temperaturas entre 25 y 31°C, determinadas durante las estaciones otoño y primavera, mientras que se observó menor presencia a temperaturas de 30-38°C medidas en el verano. Por lo que, la probabilidad de presencia de NV aumenta a medida que disminuye la temperatura, permaneciendo estables y resistentes por más tiempo.

El rango de temperatura y salinidad determinados, así como, el comportamiento de NV son similares con lo reportado por Lo *et al* (1976), quienes determinaron el efecto de la temperatura (4, 15, 25, 37°C) y la salinidad (10, 20, 34ppt) en la presencia de

Poliovirus 1, Echovirus 6 y Coxsackievirus B5 (virus icosaédricos) inoculados en agua de mar; mostrando que a mayor temperatura los virus perdían más rápido su viabilidad. No se detectaron virus viables a 37°C después de 7 días de incubación. Además, los virus son menos estables en agua de mar natural que en agua preparada artificialmente, por otros factores aunados a la temperatura del agua.

La temperatura es el factor más importante que determina la presencia de virus en el agua de mar, la viabilidad y estabilidad de éstos disminuye a medida que aumenta la temperatura (Bitton, 1994), ya que, las temperaturas elevadas provocan la desnaturalización de las proteínas de la cápside y el rompimiento de los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico viral, inhibiendo la adsorción del virus en su hospedero e inactivando las enzimas requeridas para su replicación (Bhattacharya *et al.*, 2004).

Efecto de la turbidez

Al igual que para la temperatura, se estimó el riesgo presencia/ausencia de NV en agua de mar considerando la turbidez más baja (1.1UNT) y más alta (8UNT) para temperatura y salinidad constantes, con la fórmula 16 (pp.74), donde $Tu_1 < Tu_2$:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{Tu_2}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{Tu_1}} = e^{-0.884(Tu_2 - Tu_1)}$$

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_8}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{1.1}} = e^{-0.884(8-1.1)} = 0.0022$$

A fin de facilitar su interpretación, se calculó el recíproco del cociente de la razón de momios, quedando:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{1.1}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_8} = \frac{1}{0.0022} = 454.54$$

Por tanto, el riesgo de presencia de NV a 1.1UNT es 454.54 veces el riesgo de presencia a 8UNT. Es decir, el riesgo de presencia a una turbidez de 1.1UNT es mayor que a 8UNT. Por tanto, al incrementar la turbidez, es menor el riesgo de presencia de NV en agua de mar.

La turbidez es uno de los factores que determina la presencia de los virus en el agua. Ésta es causada por la presencia de partículas suspendidas (polímeros) y disueltas (aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y ácidos nucleicos) (Maier *et al.*, 2000), que pueden incluir tierra, arena, materia orgánica e inorgánica, plancton y otros organismos microscópicos (APHA, 1999). En diversos estudios de laboratorio se ha mostrado que la presencia de algunos de los componentes que causan la turbidez en el agua de mar son responsables de la inactivación, remoción y disminución de la presencia de los virus en el medio acuático. Tales como, la presencia de sustancias termolábiles

(enzimas) y coloidales, la predación por la microflora natural del agua (bacterias, protozoarios) y la adsorción a partículas suspendidas (Bongiorni *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2000; Patti *et al.*, 1987). De tal forma que, a medida que aumenta la turbidez, aumenta la concentración de estos componentes y por tanto disminuye la probabilidad de presencia de los virus.

Noble *et al* (1997), demostraron que la infectividad de los virus en agua costera disminuye por la presencia de sustancias termolábiles (enzimas) y microorganismos como bacterias y protozoarios, ya que, al inocular agua de mar previamente filtrada con un filtro de 0.2µm para la remoción de bacterias, protozoarios y partículas de mayor tamaño (partículas suspendidas, moléculas orgánicas), además sometida a un tratamiento térmico para desnaturalizar enzimas, ADN y otras sustancias. Encontraron que los virus permanecían infectivos por más tiempo en el agua filtrada y el agua tratada térmicamente que en la no filtrada y sin tratamiento térmico. Esto se debe a que los virus son susceptibles a la degradación por sustancias termolábiles en agua de mar y a que existen algunas bacterias y protozoarios flagelados que son predadores de virus, debido a que, las bacterias son el principal hospedero de los virus y los protozoarios pueden ingerir las bacterias infectadas (Bongiorni *et al.*, 2005).

Además, otro factor que influye en la presencia de los virus en el agua es la adsorción a partículas sólidas suspendidas provenientes principalmente de la descarga de aguas residuales, que pueden acumularse en el sedimento en concentraciones más elevadas que en la columna de agua (Bitton, 1994), lo cual, está directamente

relacionado con la capacidad de concentración y detección del virus por dos aspectos; el primero, es que la sedimentación de las partículas suspendidas aumenta la dificultad de poder detectar los virus asociados, ya que, en este trabajo se analizaron muestras de agua y no de sedimento. Y segundo, la adsorción del virus en el filtro se ve disminuída a medida que aumenta la turbidez (Huang *et al.*, 2000), dado que, la materia suspendida puede tapar los filtros limitando el volumen procesado e interferir en la elución y la materia orgánica disuelta puede interferir en la adsorción de los virus en el filtro al competir con éstos por los sitios de adsorción (Maier *et al.*, 2000). Lo que probablemente, influyó en gran medida en los resultados obtenidos.

Efecto de la salinidad

Finalmente, al analizar el riesgo presencia/ausencia de NV en agua de mar tomando la salinidad más baja (23ppt) y más alta (35ppt) para una temperatura y turbidez constantes, con la fórmula 16 (pp.74) donde $S_1 < S_2$:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{S_2}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{S_1}} = e^{-0.443(S_2 - S_1)}$$

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{35}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{23}} = e^{-0.443(35-23)} = 0.0049$$

A fin de facilitar su interpretación, se calculó el recíproco del cociente de la razón de momios, quedando:

$$\frac{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{23}}{\left[\frac{P(\text{presencia})}{P(\text{ausencia})} \right]_{35}} = \frac{1}{0.0049} = 204.08$$

Lo que indicó que el riesgo de presencia de NV a 23ppt es 204.08 veces el riesgo de presencia a 35ppt. Es decir, que el riesgo de presencia a una salinidad de 23ppt es mayor que a 35ppt. Por tanto, incrementos en la salinidad del agua afectan la estabilidad del virus.

Esto se explica si consideramos a los virus como partículas proteicas, ya que, las sales modifican la estructura del agua e influyen en la conformación de las proteínas mediante interacciones electrostáticas; esto hace que en función de la temperatura, el pH, la concentración de la proteína, el tipo de sal y la fuerza iónica; las sales puedan solubilizar o precipitar las proteínas (Badui, 1999). Está reportado que en los sistemas salinos con concentraciones menores a 1M, las proteínas incrementan su solubilidad, esto se debe a que, tanto los cationes como los aniones de la sal, reaccionan con los grupos ionizables de la proteína y evitan que éste se asocie, por atracciones

electrostáticas, con otros de su misma especie; además, los iones salinos tienen capacidad de hidratación y provocan un aumento en la cantidad de agua retenida por la proteína. Cuando las soluciones salinas son más concentradas ($>1M$), las proteínas precipitan debido a que, los iones tienden a hidratarse fuertemente y le quitan el agua que rodea a la proteína, obligándola a interactuar con otra proteína (Badui, 1999).

La concentración salina en las muestras analizadas varió de 1.66-2.53M/L de NaCl. Dado que, las condiciones de salinidad estaban por encima de la concentración óptima (1M), se puede favorecer un aumento en la velocidad de desnaturalización de las proteínas y como consecuencia su precipitación y por tanto, provocar la disminución de la estabilidad del virus a medida que aumenta la salinidad.

Aunado al incremento de la solubilidad de las proteínas en soluciones salinas con concentración $<1M/L$ de NaCl, algunos virus son protegidos contra la inactivación térmica (Brooks *et al.*, 2005). Lee *et al* (1973), determinaron que algunos FCV se inactivan a una velocidad de 0.5-2.75Log durante 30min y de 2-3.25Log durante 60min en una solución de NaCl con una concentración de 1-2M sometida a 50°C, es decir, a pesar de la inactivación que sufre el virus, la solución salina la hace más lenta. Algunos estudios demuestran que los virus no se inactivan incluso por calentamiento a 50°C durante 1hr (Brooks *et al.*, 2005). En términos generales, las proteínas son muy solubles dentro de un intervalo de 10-45°C, y alcanzan su máximo alrededor de los 35° C; cuando se exceden estos límites los polímeros tienden a la desnaturalización y, en ocasiones, a la precipitación (Badui, 1999).

Predicción de riesgos de NV en condiciones ambientales

El modelo de regresión logística permitió estimar el riesgo de presencia de NV en agua de mar bajo distintas condiciones de temperatura, turbidez y salinidad dentro del rango de los valores medidos durante el periodo de muestreo (Cuadro 20).

Cuadro 20. Riesgo de presencia de NV

T (°C)	Tu (UNT)	S (ppt)	Riesgo
26	4	25	0.94
27	3	31	0.63
33	2.5	30	0.26

El riesgo de presencia/ausencia de NV en agua de mar se ve afectada por efecto de la temperatura, turbidez y salinidad. Al estimar el riesgo bajo el efecto de la temperatura, turbidez y salinidad asociados, se observó que a medida que aumentan estos factores, disminuye el riesgo de presencia de NV. Al estimar el riesgo a 26°C, 4UNT, 25ppt, observamos que el riesgo de presencia es mayor, si se compara con 27°C, 3UNT, 31ppt y 33°C, 2.5UNT, 30ppt. En ambos casos esto se debió a que hubo un aumento en la temperatura, siendo el factor principal que determina la estabilidad y viabilidad de los virus en el agua.

El comportamiento de los virus en el agua es muy variable y va a depender de factores ambientales como el clima y la estación del año. Cabe mencionar que las condiciones medidas se presentaron en la primavera y el verano para el primero y segundo caso respectivamente. En general, durante los meses de marzo, abril y mayo (primavera) debido a la escasez de lluvias, existe un descenso en el volumen de agua, aumentando la salinidad y temperatura, lo cual, puede provocar una disminución en la contaminación viral (Pommepuy *et al.*, 2006). Mientras que en los meses de junio, julio y agosto (verano), durante el periodo de lluvias, la salinidad disminuye por dilución debido a los aportes de agua dulce, presentándose un aumento en la turbidez por el arrastre de materia orgánica e inorgánica hacia los cuerpos de agua. Por lo que, el aumento en la temperatura y turbidez afectan la presencia de NV en agua de mar.

Predicción de riesgos para VHA

En el cuadro 21 se muestra para cada parámetro de la función de regresión logística el valor estimado, el error estándar, el valor del estadístico de prueba Z (significancia de cada parámetro) y su correspondiente valor p. Así como, la razón de momios (Odds Ratio) y un intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 21. Análisis de regresión logística. VHA vs T, Tu, S

<i>Predictor</i>	<i>Coficiente</i>	<i>SE Coficiente</i>	<i>Z</i>	<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	<i>IC (95%)</i>	
<i>Constante</i>	12.6555	0.5552	1.20	0.231			
<i>Temperatura</i>	-0.189913	0.200749	-0.95	0.344	0.83	0.56	1.23
<i>Turbidez</i>	0.0238666	0.472424	0.05	0.960	1.02	0.41	2.59
<i>Salinidad</i>	-0.323008	0.234872	-1.38	0.169	0.72	0.46	1.15

El análisis muestra los valores estimados de los parámetros del modelo ($\beta_0 = 12.6555, \beta_1 = -0.189913, \beta_2 = 0.0238666, \beta_3 = -0.323008$). Así mismo, se muestran sus valores p asociados (0.231, 0.344, 0.96 y 0.169 respectivamente) y el cociente de razón de momios (0.83, 1.02 y 0.72) para cada variable explicativa. El análisis de regresión logística mostró que los valores p para cada uno de las variables temperatura, turbidez y salinidad son mayores a 0.05 (0.344, 0.960, 0.169, respectivamente). Indicando, que ninguno de estos parámetros tuvo efecto estadísticamente significativo sobre la presencia de VHA en agua de mar. Probablemente, debido a que, el periodo de muestreo fue muy corto (Abril-Julio) o el número de muestras muy pequeño (32 muestras), también se puede atribuir a que con base a los resultados no se encontró una fuerte de presencia de VHA, por lo que, el modelo no hace distinción entre la probabilidad de presencia/ausencia, indicando que la probabilidad de encontrarlo es igual a la probabilidad de no encontrarlo.

Los mismos resultados se observan en un trabajo realizado por Vantarakis *et al* (2005), quienes analizaron la presencia de Enterovirus, Adenovirus y VHA en agua de mar de uso recreativo. Su periodo de muestreo y parámetros fisicoquímicas del agua fueron similares a las de este trabajo. Su análisis estadístico mostró que los parámetros fisicoquímicos no tenían efecto significativo en la presencia de los virus, atribuyéndolo a que el periodo de muestreo fue muy corto y que las condiciones ambientales permanecieron estables durante ese tiempo.

El análisis de riesgos de presencia/ausencia de VHA, nos mostró que ningún o de los parámetros tuvo efecto estadísticamente significativo, sin embargo, está demostrado que la temperatura, pH, turbidez y salinidad tienen efecto sobre el riesgo de presencia/ausencia de virus en el agua. Y su modo de acción se presentó en el análisis de riesgo de NV.

Análisis Filogenético

Análisis de secuencia de NV

Se secuenciaron tres muestras positivas de NV (M1, M19 y M20), dos (M1 y M19) a partir de la clonación de una porción del gen que amplifica para la ARN polimerasa (Región A del genoma) y otra muestra (M20) a partir de la purificación del producto de amplificación de un gel de agarosa al 1%. La secuencia de 327 nucleótidos se comparó con secuencias de NV reportadas previamente en la base de datos NCBI, mostrando asociación con NV.

Las muestras M1 y M19 mostraron una identidad de 99.0% mutuamente, mayor que la mostrada con M20 (91.7% y 92.3%, respectivamente). El análisis comparativo entre las secuencias de NV y las secuencias de la base de datos, mostraron una identidad de 55.0-61.7% con el genogrupo I, 55.0-81.8% con el genogrupo II, 57.6-61.7% con el genogrupo III y 55.4-66.2% con los genogrupos IV y V (Cuadro 22). Por lo que, se sugiere que los NV detectados (M1, M19 y M20) en el agua de mar pertenecen al genogrupo II.

Cuadro 22. Alineamiento de secuencias de la región A del genoma de cepas de NV

Cepa	Genogrupo	Identidad (%)		
		M1	M19	M20
SFIIa	GI	61.1	60.5	56.0
Southampton	GI	60.5	60.5	55.4
Hesse	GI	59.2	59.8	55.0
Chiba407	GI	61.7	61.7	57.0
Hawai	GII	75.4	75.4	70.7
Lordsdale	GII	77.7	78.6	72.6
KY89	GII	59.8	59.8	55.0
Melksham	GII	75.7	75.4	71.0
Bristol	GII	77.7	78.6	72.6
Mexico	GII	81.8	81.8	75.7
Arg320	GII	75.4	75.1	69.1
Virginia 207	GII	68.1	68.7	65.9
Jena	GIII	60.8	61.7	57.6
Fort	GIV	66.2	66.2	61.4
Saudi	GIV	59.5	60.5	56.0
Murine calicivirus	GV	59.8	60.8	55.4

El cladograma basado en el alineamiento múltiple de la RNA polimerasa (Región A del genoma) de diversas cepas de NV, confirmó que las muestras M1, M19 y M20 se encuentran genéticamente relacionadas al genogrupo II (Figura 14). Y mostró que existe una variación aproximada del 10% en los nucleótidos de la secuencia analizada entre las cepas de NV. Se observó un 40-50% aproximadamente de diversidad entre las cepas de

las muestras analizadas y las cepas de origen animal del genogrupo III y V (Jena y Murine calicivirus).

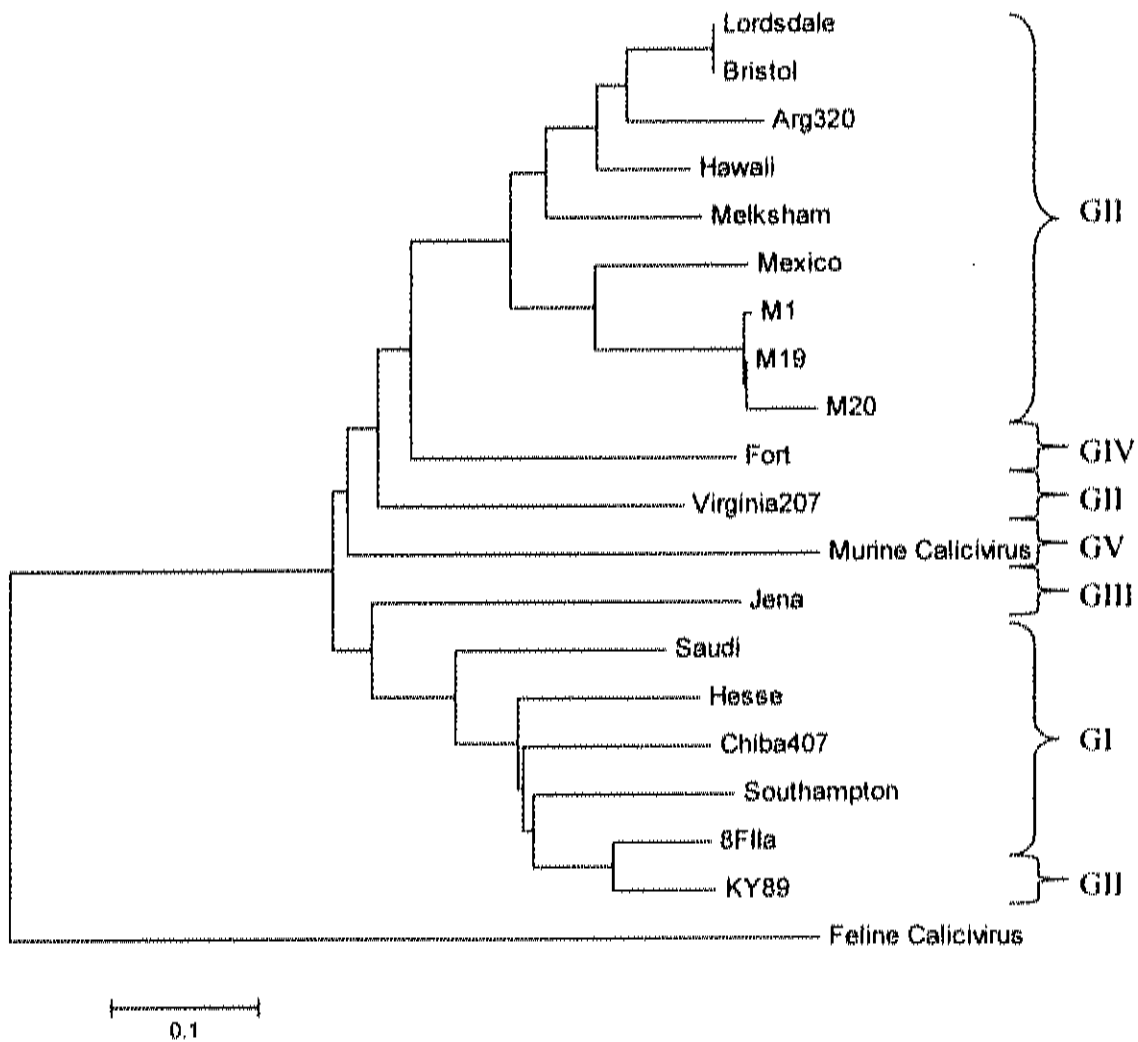


Figura 14. Análisis filogenético de cepas de NV

Las cepas de NV encontradas en las muestras de agua de mar corresponden al genogrupo II, por lo que, es importante considerar el riesgo que representa para los usuarios de estas playas, ya que, este genogrupo afecta la salud de los humanos (I, II y IV) (Vinjé *et al.*, 2004). Además, algunos estudios han reportado que cepas de NV del genogrupo II se encuentran ampliamente distribuidas y que se han encontrado en brotes recientes (Parshionikar *et al.*, 2003). Nishida *et al.* (2003), analizaron 191 ostras tomadas de dos áreas de una playa en Japón, detectando NV en 17 de ellas, de las cuales, 3 se clasificaron dentro del genogrupo I y 14 dentro del genogrupo II. Lodder *et al.* (2005), detectaron fagos F-específicos y somáticos, rotavirus, reovirus, enterovirus y NV en muestras de agua de los ríos Maas y Waal y agua residual tratada y no tratada en los países bajos, encontrando principalmente cepas del genogrupo II.

La comparación de la secuencia de nucleótidos de diferentes cepas de NV permitió determinar el origen geográfico del virus. Las cepas de NV del genogrupo II analizadas provienen de distintos países; Hawai y Virginia207 de Estados Unidos; Lordsdale, Melksham y Bristol del Reino Unido; KY89 de Japón; Arg320 de Argentina y la cepa México de México. Un dato interesante fue que la cepa México presentó un mayor porcentaje de identidad con las cepas bajo estudio (81.8% con M1 y M19 y 75.7% con M20), considerando que todas son del mismo país de origen. Esta cepa proviene de muestras de heces fecales de niños mexicanos, donde de 54 muestras analizadas 6 resultaron positivas para NV. En una de ellas se detectó la cepa México, la

cual, presentó un mayor porcentaje de identidad al virus Snow Mountain Agent (SMA) (Jiang *et al.*, 1995).

En el cladograma se observaron dos cepas del genogrupo II (Virginia207 y KY89) que no estaban agrupadas dentro del genogrupo correspondiente, esto se debió posiblemente a que la región A del genoma analizado para la comparación de secuencias, no permitió distinguir entre estos genogrupos y el resto, ya que, usualmente esta región no es utilizada para dividir las cepas de NV en genogrupos, para ello se utilizan ampliamente regiones del ORF 2, que codifica para las proteínas de la cápside (Vinjé *et al.*, 2004).

Análisis de secuencia de VHA

Se secuenciaron dos de las tres muestras positivas de VHA, después de la clonación del gen que amplifica la interfase VP1-VP2 de las proteínas de la cápside viral. La secuencia de 192 nucleótidos se comparó con secuencias de VHA reportadas por estudios previos en la base de datos NCBI y con la cepa control HM-175/18f (ATCC VR-1402), mostrando asociación con el VHA.

Las muestras M1 y M2 mostraron una identidad de 99.4% mutuamente en la interfase VP1-VP2, con la diferencia de un nucleótido en la posición 47; la M1 tiene

timina y la M2 tiene citosina. Con respecto a la cepa control HM-175/18f, las muestras presentaron una identidad de 99,4% y 98,9% respectivamente en la interfase VP1-VP2.

El análisis comparativo entre las secuencias de las muestras con las secuencias de la base de datos mostró una identidad de 90,1-93,7% con el subgenotipo IA, 94,2-99,4% de identidad con el subgenotipo IB y 79,6-85,9% de identidad con los genotipos II, III, IV, V, VI y VII (Cuadro 23). Por lo que, se concluyó que las muestras M1 y M2 se encuentran dentro del genotipo I subgenotipo B.

Cuadro 23. Alineamiento de secuencias de la interfase VP1-VP2 de cepas de VHA.

Cepa	Genotipo	Identidad (%)	
		M1	M2
FH1	IA	93.7	93.2
LY6	IA	90.6	90.1
GBM	IA	91.6	91.1
CR-326	IA	92.1	91.6
FG	IA	92.1	91.6
HM-175	IB	99.4	98.9
HM-175/18f	IB	99.4	98.9
MBB	IB	94.7	94.2
LA1	IB	94.7	94.2
HAF-203	IB	99.4	98.9
CF53/Berne	IIA	85.9	85.4
PB8	IIA	84.3	83.8
NOR-21	IIIA	83.8	83.3
HA-JNG06-90F	IIIB	84.8	84.3
CY-145	IV	81.2	80.7
AGM-27	V	80.2	79.6
JM-55	VI	81.2	80.7
SLF88	VII	81.7	81.2

El cladograma basado en el alineamiento múltiple de la interfase VP1-VP2 de diversas cepas de VHA, confirmó que las muestras M1 y M2 se encuentran genéticamente relacionadas al subgenotipo IB (Figura 15). Y mostró que existe una

variación aproximada del 2% en los nucleótidos de la secuencia analizada entre las cepas de VHA.

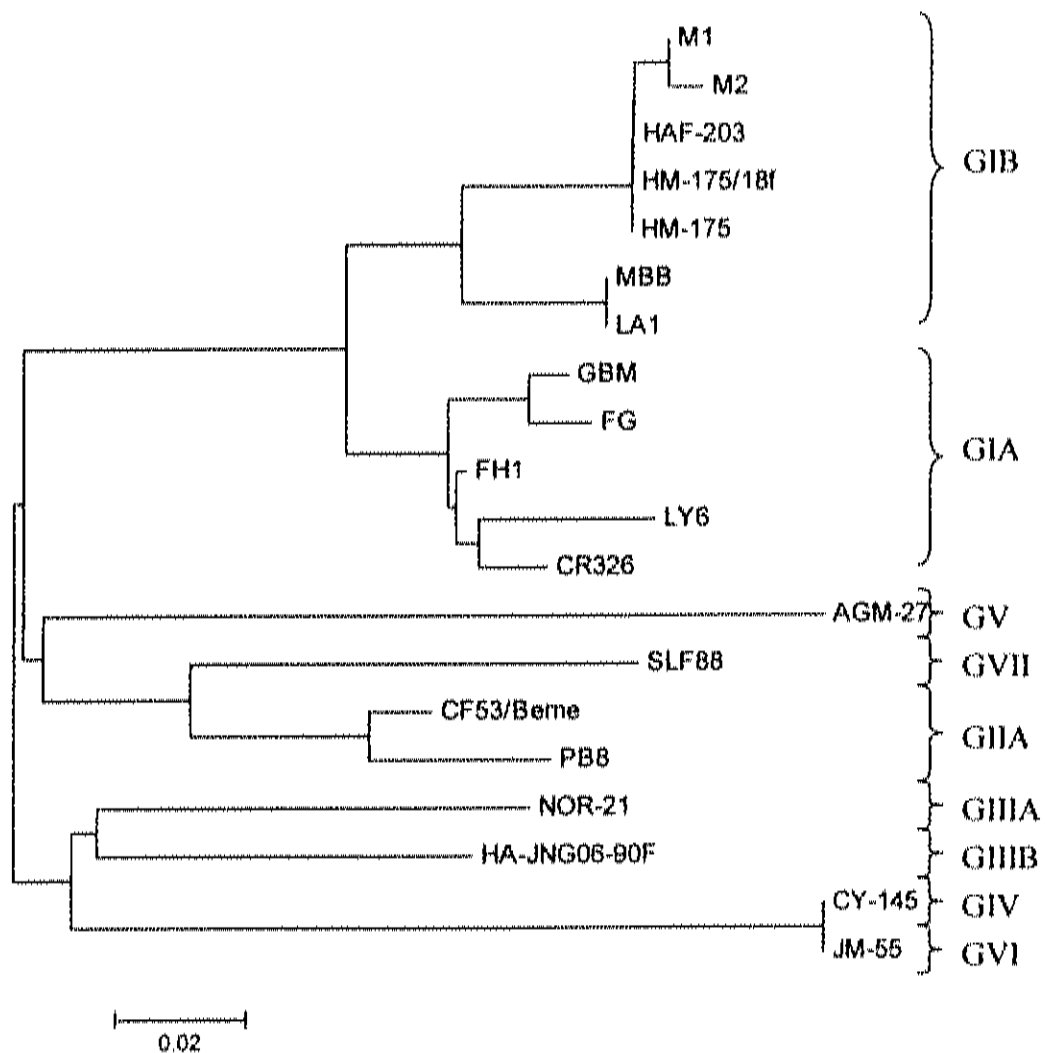


Figura 15. Análisis filogenético de cepas de VHA

El análisis filogenético mostró que las cepas de VHA encontradas en las muestras de agua de mar corresponden al subgenotipo IB, información que debe ser considerada de gran importancia, dado que, este subgenotipo se encuentra dentro de los genotipos que infectan a los humanos (I, II, III y VII) (Costa-Mattioli *et al.*, 2003). Además que, junto con el genotipo III probablemente son los más abundantes alrededor del mundo (Nainan *et al.*, 2006).

Los resultados muestran que las cepas de VHA del subgenotipo IB HM-175 se aisló en Australia, MBB en Estados Unidos, LA1 en China y HAF-203 en Brasil. Un análisis de cepas de VHA de diversos países, mostró que el genotipo I, particularmente el IA es el más abundante, el cual incluyó cepas de Centroamérica, Suramérica y Norteamérica. En un estudio realizado en Brasil y Perú se encontraron cepas de los subgenotipos IA y IB. El subgenotipo IB también se ha encontrado en África del Norte, Australia, Europa y Japón (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

- ✓ Los resultados obtenidos, indican la presencia de NV y VHA en agua de mar en la Bahía de Altata y playas de Mazatlán. El 12.5% (4/32) de las muestras positivas se encontraron en la Bahía de Altata y el 43.75% (14/32) en Mazatlán.
- ✓ El virus que se detectó con mayor frecuencia fue NV. En la Bahía de Altata se detectó en un 33.33% (4/12) y en Mazatlán en un 55% (11/20).
- ✓ El VHA no se detectó en la Bahía de Altata, mientras que, en Mazatlán el 15% (3/20) de las muestras resultaron positivas.
- ✓ Al analizar la distribución de las muestras en las playas por zonas, los resultados indican que ambos virus (NV y VHA) se encontraron con mayor frecuencia en la zona II (ZII) de la Bahía de Altata y Mazatlán.
- ✓ Los resultados obtenidos del análisis de riesgos, permiten concluir que el riesgo de presencia de NV, disminuye en función del incremento de la temperatura, turbidez y salinidad del agua.

- ✓ Los parámetros temperatura, turbidez y salinidad, no mostraron efecto estadísticamente significativo en la presencia/ausencia del VHA.

- ✓ El análisis filogenético de las muestras M1, M19 y M20, mostró asociación con NV y que las muestras se encuentran genéticamente relacionadas al genogrupo II, con una variación del 10% en los nucleótidos de la secuencia analizada entre las cepas de NV.

- ✓ El análisis filogenético de las muestras M1 y M2, mostró asociación con VHA y que las muestras se encuentran genéticamente relacionadas al genotipo I, subgenotipo B, con una variación del 2% en los nucleótidos de la secuencia analizada entre las cepas de VHA.

SUGERENCIAS

La práctica de actividades recreativas en aguas costeras, que implican el contacto directo o ingestión del agua por los usuarios, exige el análisis de riesgos de la presencia de microorganismos patógenos como los virus entéricos, mediante la realización de estudios epidemiológicos y monitoreos periódicos en el agua de mar sobre todo de aquellas playas con gran afluencia turística, para determinar las concentraciones de virus en el agua y los efectos a la salud de los propios usuarios.

Es necesario el desarrollo de metodologías más prácticas, rápidas y económicas que permitan la realización de los monitores en forma constante y en mayor número de muestras. Así como, la optimización de las técnicas de detección, mediante el uso de PCR anidada y RT-PCR en tiempo real.

Aunado a las técnicas de detección, se sugieren estudios sobre la viabilidad de las virus presentes en el agua de mar, mediante la utilización de cultivo celular, que permitan estimar riesgos de infección y establecer normas o regulaciones sobre la presencia de virus entéricos en el agua de mar de uso recreativo.

La información generada en este trabajo puede servir como pauta para el desarrollo de investigaciones futuras sobre la presencia de NV y VHA en agua de mar de uso recreativo, para determinar la fuente de contaminación y prevenir la diseminación de infecciones.

ANEXO I

Preparación de soluciones

A continuación se detalla la composición y modo de preparación de las soluciones y medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo.

A) Soluciones utilizadas para la recuperación de partículas virales

Solución	Fórmula química	Marca comercial	Modo de preparación
Ácido clorhídrico 1N	HCl	Fermont	HCl 82.44mL Aforar a un 1Lt con agua destilada
Ácido clorhídrico 6N	HCl	Fermont	HCl 494.623mL Aforar a un 1Lt con agua destilada
Hidróxido de sodio 1N	NaOH	Faga-Lab	NaOH 40gr Aforar a un 1Lt con agua destilada
Hidróxido de sodio 5N	NaOH	Faga-Lab	NaOH 200gr Aforar a un 1Lt con agua destilada
Extracto de carne 3%	-	BD Bioxon	Extracto de carne 60gr Glicina 7.5gr Aforar a 2Lt con agua destilada Esterilizar a 121°C por 15min Ajustar pH a 9.0 con NaOH 5N Almacenar a 4°C
Fosfato de sodio dibásico 0.15M	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	Sigma-Aldrich	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 40.2105gr Aforar a un 1Lt con agua destilada estéril

B) Soluciones utilizadas para la extracción de ARN

Solución	Marca comercial	Modo de preparación
Buffer AVL/Carrier ARN	Qiagen	Añadir 1mL de solución Buffer AVL a un tubo de Carrier ARN liofilizado. Mezclar la solución Buffer AVL/Carrier ARN obtenida con la solución Buffer AVL restante. Almacenar la solución de 2-8°C.
Buffer AW1	Qiagen	Añadir 25mL de etanol (95-100%) a 19mL de Buffer AW1
Buffer AW2	Qiagen	Añadir 30mL de etanol (95-100%) a 13mL de Buffer AW2

C) Soluciones utilizadas para la electroforesis de ADN

Solución	Marca comercial	Modo de preparación
Tris Acetato E.D.T.A. 1X (TAE 1X)	Promega	TAE 25mL Aforar a un 1Lt con agua destilada Agregar 0.3g de agarosa a 30mL de buffer TAE 1X
Gel de agarosa 1%	Promega	Fundir la solución en un horno microondas Añadir 1µl de bromuro de etidio (10mg/mL) Solidificar

D) Soluciones utilizadas para la extracción de ADN plasmidico

Solución	Fórmula química	Marca comercial	Modo de preparación
Glucosa 0.5M	$\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO}$	Faga-Lab	Glucosa 9.008gr Aforar con agua destilada a 100mL
Tris-Base 0.25M pH 8	-	Promega	Tris-base 3.0285gr Aforar con agua destilada a 100mL Ajustar pH 8 con HCl 6N Esterilizar 121°C/15min
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1M pH 8	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fermont	EDTA 3.7224gr Aforar con agua destilada a 100mL Ajustar pH a 8 con NaOH
Hidróxido de sodio 0.2N	NaOH	Faga-Lab	NaOH 8gr Aforar a un 1Lt con agua destilada
Dodecil sulfato sódico (SDS) 10%	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$	Sigma-Aldrich	SDS 10gr Aforar con agua destilada a 100mL
Acetato de sodio trihidratado 5M	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Fermont	Acetado de sodio 40.824gr
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Usb	La solución de fenol utilizada viene equilibrada comercialmente con Tris a pH 8. Antes de usarlo se recomienda mezclar las dos fases agitando por inversión y dejar reposar hasta que se vuelvan a separar.
Cloroformo	CHCl_3	Sigma-Aldrich	-
Etanol 70%	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Fermont	Etanol absoluto 70mL Agua destilada 30mL
Etanol 95%	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Fermont	Etanol absoluto 95mL

	Agua destilada 5mL
Solución 1.	Glucosa 0.5M, 5mL Tris-Base 0.25M, 5mL EDTA 0.1M, 5mL Aforar a un volumen de 50mL
Solución 2.	NaOH 1N, 1.6mL SDS 10%, 0.8mL Aforar a un volumen de 8mL
Solución 3.	Acetato de sodio 5M, 60mL Ácido acético glacial 11.5mL Agua destilada 28.5mL Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15min
Fenol:Cloroformo (1:1)	Fenol 1 volumen Cloroformo 1 volumen Preparar la mezcla inmediatamente antes de utilizar

E) Medios de cultivo para bacterias

Solución	Marca comercial	Fórmula química	Modo de preparación
Ampicilina 5mg/mL	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₄ SNa	Qbiogene	Ampicilina 5mg Agua de ampolleta 1ml Esterilizar por filtración. Alicuotar y guardar -20°C
Medio Luria-Bertani (LB)			Triptona 10gr Cloruro de sodio 5gr Extracto de levadura 5gr Añadir agua destilada 1000mL Ajustar pH a 7 con NaOH 1N Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15min Almacenar a 4°C
LB agar			Preparar medio LB como se indicó anteriormente y añadir agar a una concentración final de 15g/L. Esterilizar a 121°C por 15min Añadir ampicilina a una concentración de 50µg/mL. Llevar a una temperatura de 55°C y vaciar en placas de Petri Almacenar a 4°C

F) Reactivos para purificación de ADN a partir de gel (Wizard SV Gel PCR Clean-up System)

Solución	Marca comercial	Modo de preparación
Solución de lavado de membrana	Promega	Añadir 75mL de etanol 95% a 15mL de solución de lavado de membrana

LITERATURA CITADA

Allwood, P.B., Y.S. Malik, C.W. Hedberg, S.M. Goyal (2003) Survival of F-specific RNA coliphage, Feline Calicivirus and *Escherichia coli* in water: a comparative study. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9): 5707-5710.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402. (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) (01 Diciembre 2006).

American Public Health Association (APHA) American Water Works Association, Water Environment Federation (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Ed.

Aulicino, F., L. Mauro, M. Marranzano, M. Biondi, A. Ursino, M. Carere (2000) Microbiological quality of the Catania coastal seawater. *Ann. Ig.* (12): 533-541.

Badui, D.S. (1999) *Química de los alimentos*. 4ta. Edición. Addison Wesley Longman de México, S. A. de C. V. México. pp: 154-166.

Bergh, O., K.Y. Borsheim, G. Bratbak, M. Høndal (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. (340): 467-468.

Bhattacharya, S.S., M. Kulka, K.A. Lampel, T.A. Cebula, B.B. Goswami (2004) Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*. (116): 181-187.

Bitton, G. (1994) *Wastewater Microbiology*. Department of Environmental Engineering Sciences. University of Florida, Gainesville. Wiley-Liss, Inc. United States of America. pp: 87-92, 363-369.

Bofill-Mas, S., P.C. Casares, N. Albiñana-Giménez, C.M. de Motes Porta, A. Hundersdoerfer, R. Girones Llop (2005) Efectos de la contaminación de agua y alimentos sobre la salud por virus emergentes humanos. *Revista especializada en Salud Pública*. (79): 253-269.

Bongiorni, L., M. Magagnoli, M. Armeni, R. Noble, R. Danovaro (2005) Viral production, decay rates and life strategies along a trophic gradient in the North Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 6644-6650.

Bosch, A. (1998) Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International microbiology*, (1):191-196.

Brooks, M. D. G. F., J. S. Butel, S. A. Morse (2005) *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 18va. Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. pp: 109-110, 414-415.

Castillo, E.I. (2003) *Problemas de calidad del agua en México*. México, D. F. <http://www.jne.gob.mx/ueajci/publicaciones/estudios/397/castillo.html> (31 Agosto 2006)

Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2001). "Norwalk-like viruses": Public health consequences and outbreak management. *MMWR* 50 (No. RR-9): 1-18.

Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2006) *Viral Hepatitis. Historical Perspective*. Department of Health and Human Services.

Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS) (2000) *Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino*. *Water Science Technology*. 18(11): 1-25.

Cheung, W.H.S., K.C.K. Chang, R.P.S. Hung (1990) Health effects of beach water pollution in Hong Kong. *Epidemiology infection* (105): 139-162.

Consejo Nacional de Población (CONAPO) (1999) La situación demográfica de México. La situación sociodemográfica de las zonas costeras. <http://www.conapo.com> (05 Diciembre 2005)

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering (Multialin). *Nucleic Acids Research*. 16(22): 10881-10890.

Costa-Mattioli, M., A. Di Napoli, V. Ferré, S. Billaludel, R. Pérez-Bercoff, J. Cristina (2003) Genetic variability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology*. (84): 3191-3201.

Craun, G.F., P.S. Berger, R.L. Calderón (1997) Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *Journal Am. Water Works Association*. (89): 96-104.

Cuthbert, J.A. (2001) Hepatitis A: old and new. *Clinical microbiology reviews*. 14(1): 38-58.

Dorfman, M. (2004) Testing the waters. A guide to water quality at vacation beaches. Natural resources defense council. pp: 6-14. www.nrdc.org (06 Julio 2006)

Environmental Protection Agency (EPA) (1984) Manual of Methods for Virology. Chapter 6. Virus adsorption-elution (VIRADEL) cartridge filter procedures for recovering viruses from sewages, effluents and waters. Office of Research and Development. Washington, D.C.

Environmental Protection Agency (EPA) (1995) Information Collection Requirements Rule Protozoa and Enteric Virus Sample Collection Procedures. Office of Ground Water and Drinking Water. Washington, D.C.

Environmental Protection Agency (EPA) (2001) Manual of Methods for Virology. Chapter 14. Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge IMDS cartridge filters and Organic Flocculation. Office of Research and Development. Washington, D.C.

Evans, A.S., R.A. Kaslow (1997) Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control. 4ta. Edición. Plenum Publishing Corporation. Estados Unidos de América. pp: 293-319.

Farrah, S.R., M. Goyal, C.P. Gerba, C. Wallis, J.L. Melnick (1977) Concentration of enteroviruses from estuarine water. *Applied and Environmental Microbiology*. (33): 1192-1196.

Fernández, M.M.C., A.A. Alcántara, M.E. García (2001) Transmisión feco-hídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental*. (1): 8-18.

Fong, T.T., E.K. Lipp (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *American Society for Microbiology*. 69(2): 357-371.

Fontúrbel, R.F. (2003) La tecnología de DNA recombinante: principios y aplicaciones. El portal de Biología y Ciencias de la Salud. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. 11: 1-13. www.biologia.org/?pid=5000&page=0&id=65 (21 Octubre 2005)

Fuhrman, J.A., X. Ling, R.T. Noble (2005) Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4523-4530.

Gesche, E., M.V.A. Vallejos, T.M.M. Saez (2003) Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). Archivos Médicos de Veterinaria. 35(1): 99-107.

Google Earth (2006) <http://earth.google.es> (19 Junio 2006)

Griffin, W.D., C.J. Gibson, E.K. Lipp, K. Riley, J.H. Paul, 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. Applied and Environmental Microbiology. 65(9): 4118-4125.

Griffin, W.D., K.A. Donaldson, J.H. Paul, J.B. Rose (2003) Pathogenic human viruses in coastal waters. Clinical Microbiology Reviews. 16(1): 129-143.

Guidelines for Canadian Drinking Water Quality (1992) Federal-Provincial Working Group on Recreational Water Quality of the Federal-Provincial Advisory Committee on Environmental and Occupational Health. Minister of National Health and Welfare. Canada, Ottawa.

Haile, R., J. Witte, J. Alamillo, K. Barrett, R. Cressey, J. Dermond, C. Ervin, A. Glasser, N. Harawa, R. Harmon, J. Harper, C. McGee, R. Millikan, M. Nides (1996) An

epidemiological study of possible health effects of swimming in Santa Monica Bay. Santa Monica Bay restoration Project.

Hall, T. (2005) Biological sequence alignment editor (BioEdit) Ibis Therapeutics. Carlsbad, CA. 92008. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html (28 Noviembre 2006)

Haramoto, E., H. Katayama, S. Ohgaki (2004) Detection of Noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4): 2154-2160.

Huang, P.W., D. Laborde, V.R. Land, D.O. Matson, A.W. Smith, X. Hang (2000) Concentration and detection of caliciviruses in water samples by Reverse Transcription-PCR. *American Society for Microbiology*. 66(10): 4383-4387.

Instituto Nacional de Ecología (INE) (2000) Coordinación de Turismo y Zonas Costeras. Programa de Medio Ambiente 1995-2000. Diagnóstico ambiental y desarrollo de una base de datos para la zona costera de la República Mexicana. La calidad del agua en los ecosistemas costeros de México. <http://www.ine.gob.mx> (07 Febrero 2005)

Jiang, X, D.O. Matson, F.R. Velázquez, J.J. Calva, W.M. Zhong, J. Hu, G.M. Ruiz-Palacios, L.K. Pickering (1995) Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *Journal Medical Virology*. 47(4):309-16.

Jiang, S., R. Noble, W. Chu (2001) Human adenovirus and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1): 179-184.

Kadoi, K., B.K. Kadoi (2001) Stability of feline caliciviruses in marine water maintained at different temperatures. *New Microbiology* 24(1):17-21.

Katayama, H., A. Shimasaki, S. Ohgaki (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(3): 1033-1039.

Kittigul L., A. Uthaisin, S. Ekchaloemkiet, F. Utrarachkij, P. Luksamijarulkul (2006) Detection and characterization of hepatitis A virus in water samples in Thailand. *Journal of Applied Microbiology*. (100): 1318-1323.

Kleinbaum, D.G., L.L. Kupper, K.E. Muller, A. Nizam (1998) Applied regression analysis and other multivariable methods. 3th. Edition. Duxbury Press, United States of America. pp: 656-671.

Kumar, S., K. Tamura, M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. (5):150-163.
www.megasoftware.net/ (28 Noviembre 2006)

Labelle, R.L., C.P. Gerba, S. M. Goyal, J.L. Melnick, I. Cech, G.F. Bogdan (1980) Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology. 39(3): 588-596.

Lee, K.M., J.H. Gillespie (1973) Thermal and pH stability of Feline Calicivirus. Infection and Immunity. 7(4): 678-679.

Lo, S., J. Gilbert, F. Hetrick (1976) Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. Applied and Environmental Microbiology. (32): 245-249.

Lodder, W.J., A.M. de Roda Husman (2005) Presence of Noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3): 1453-1461

Lodish, H., J. Darnell, D. Baltimore, S.L. Zipursky, A. Berk, P. Matusdaira (2003) *Molecular Cell Biology*. 4th. Edition. W. H. Freeman and Company. United States of America. pp: 208-211.

Maier, R.M., I.L. Pepper., C.P. Gerba (2000) *Environmental Microbiology*. Academic Press. United States of America. pp: 123, 137-138, 186-190, 294-307, 448, 508.

Ministerio de salud y ambiente de la nación (MSAN) (2004) Dirección de epidemiología. *Boletín epidemiológico periódico* (11):1-13.

Mocé-Llivina, L., F. Lucena, J. Cofre (2005) Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 6838-6844.

Mounts, A.W., T. Ando, M. Koopmans, J.S. Breese, J. Noel, R.I. Glass (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(2): S284-7.

Muscillo, M., G. La Rosa, A. Carducci, L. Cantiani, C. Marianelli (1999) Molecular and biological characterization of poliovirus 3 strains isolated in Adriatic seawater samples. *Water Research*. (33): 3204-3212.

Nainan, O.V., G. Xia, G. Vaughan, H.S. Margolis (2006) Diagnosis of Hepatitis A Virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(1): 63-79.

Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, T. Munemura, T. Mikami, A. Kawamoto, M. Akiyama, Y. Kato, K. Nishi, K. Kozawa, O. Nishio (2003) Detection, quantitation and phylogenetic analysis of Noroviruses in Japanese oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10): 5782-5786.

Noble, R.T., J.A. Fuhrman (1997) Virus decay and its causes in coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(1): 77-83.

Norma Oficial Mexicana: NMX-AA-120-SCFI-2006. Establece los requisitos y especificaciones de sustentabilidad de calidad de playas. *Diario Oficial*, 2006.

^aOrganización Mundial de la Salud (OMS) (2003) Guidelines for Safe Recreational-Water Environments. *Coastal and Fresh-Waters*. 1(1): 1-19.

^bOrganización Mundial de la Salud (OMS) (2003) Guidelines for Safe Recreational-Water Environments. Coastal and Fresh-Waters. 1(4): 51-74.

Parshionikar, S.U., S. William-True, G.S. Fout, D.E. Robbins, S.A. Seys, J.D. Cassady, R. Harris (2003) Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a Norovirus. Applied and Environmental Microbiology. 69 (9): 5263-5267.

Patti, A.M., A.L. Santi, R. Gabrieli, S. Fiamma, M. Cauletti, A. Paná (1987) Hepatitis A virus and Poliovirus 1 inactivation in estuarine water. Water Research. 21(11): 1335-1338.

Pepper, I.L., C. P. Gerba, M. L. Brusseau (2006) Environmental and pollution science. 2th. Edition. Academic Press. Canada. pp: 25, 165-166.

Persing, D.H. (2004) Molecular Microbiology. Diagnostic principles and practice. ASM Press. Washington, D. C. United States of America. pp:161-179.

Pianetti, A., W. Baffone, B. Citterio, A. Casaroli, F. Bruscolini, L. Salvaggio (2000) Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. Epidemiology Infections. (125): 455-462.

Pina, P.S. (2001) Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Tesis doctoral. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0322102-123038/> (21 Octubre 2006)

Pommepuy, M., D. Hervio-Heatj, M.P. Caprais, M. Gourmelon, J.C. Le Saux, F. Le Guyader (2006) Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. *Oceans and Health: Pathogens in the marine environment*. Edited by Belkin and Colwell, Springer, New York. pp: 331-359.

Rosenfield, S.I., L.A. Jaykus (1999) A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of foodborne viruses. *Journal of Food Protection*. 62(10): 1210-1214.

Schwab, K.J, R. de Leon, M.D. Sobsey (1995) Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of Enteroviruses, Hepatitis A Virus and Norwalk Virus by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2): 531-537.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recursos Pesqueros (SAGARPA) (2005). www.sagarpa.com.mx (08 Junio 2005)

^aSecretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2005) Programa Integral de Playas Limpias. <http://www.SEMARNAT.gob.mx/> (29 Diciembre 2005)

^bSecretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2005) Calidad del agua. Dirección General de Estadística e Información Ambiental. http://www.SEMARNAT.gob.mx/sniarn/recursos_hidraulicos.shtm(29 Diciembre 2005)

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) (2004). Lineamientos para determinar la calidad de agua de mar par uso recreativo con contacto primario.

Secretaría de Turismo (SECTUR) (2004) Programa Playas Limpias. Evaluación 2003 y perspectivas 2004-2006. México, D. F. www.sectur.gob.mx/wb2/sectur/sect_Programa_de_Playas_Limpias (26 Julio 2005)

Secretaría de Turismo (SECTUR) (2005) Turismo en México. <http://www.sectur.gob.mx> (22 Julio 2006)

Tay, Zavala J. (1995) Microbiología y Parasitología Médicas. 2da. Edición. Méndez Editores, México, D.F, pp: 2.1-2.61.

Tejedor, J.M.T., M.L.P. Toledo, C.V. Sosa, L.M. De León, M.G. Martín, C.F. González, M.M. Delgado (2005) Calidad bacteriológica de las aguas de playas de Gran Canaria (Islas Canarias, España). *Higiene y Sanidad Ambiental*. (5): 120-122.

Toledo, A. (2005) El agua en México y el mundo. Dirección general de investigación de ordenamiento ecológico y conservación de los ecosistemas del Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. <http://atoledo@ine.gob.mx> (21 Agosto 2006)

Tortora, G.J., B.R. Funke, C.L. Case (1995) *Microbiology an introduction*. 5th Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. United States of America. pp: 228-235.

Tsai, Y., B. Tran, C.J. Palmer (1995) Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1): 363-366.

Vantarakis, A.C., A. Tsibouxi, D. Veniere, G. Komninou, A. Athanassiadou, M. Papapetropoulou (2005) Evaluation of microbiological of coastal waters in Greece. *Journal of Water and Health*. 3(4): 371-380.

Vinjé, J., R.A. Hamidjaja, M.D. Sobsey (2004) Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II genogroup. *Journal of Virological Methods*. (116): 109-117.

Yoder, J.S., B.G. Blackburn, G.F. Craun, V. Hill, D.A. Levy, N. Chen, S.H. Lee, R.L. Calderon, M.J. Beach. In: *CDC Surveillance Summaries*, October 22, 2004. *MMWR* 2004; 53(SS08): 1-22.

Vinjé, J., R.A. Hamidjaja, M.D. Sobsey (2004) Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II genogroup. *Journal of Virological Methods*. (116): 109-117.

Yoder, J.S., B.G. Blackburn, G.F. Craun, V. Hill, D.A. Levy, N. Chen, S.H. Lee, R.L. Calderon, M.J. Beach. In: *CDC Surveillance Summaries*, October 22, 2004. *MMWR* 2004; 53(SS08): 1-22.