



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias del Agua**

**“Ocurrencia de Norovirus, virus de Hepatitis A y  
Reovirus en cuerpos de agua del norte de  
Quintana Roo: predicciones de riesgos para la  
salud”**

Tesis que presenta:

César Ignacio Hernández Flores

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL AGUA**

Cancún, Quintana Roo, México 2018

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*

*POSGRADO EN CIENCIAS DEL AGUA*



### **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de César Ignacio Hernández Flores titulado “OCURRENCIA DE NOROVIRUS, VIRUS DE HEPATITIS A Y REOVIRUS EN CUERPOS DE AGUA DEL NORTE DE QUINTANA ROO: PREDICCIONES DE RIESGOS PARA LA SALUD” fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, línea de Ecología y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda y el Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua del Centro.

Atentamente.



---

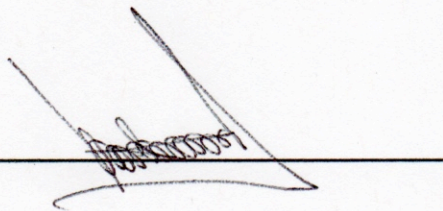
Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 9 de julio de 2018.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre: César Ignacio Hernández Flores

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para realizar este estudio a través de la beca número 575499. El proyecto de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de la convocatoria “Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2013’ con clave 216093 que lleva por título “Detección de virus entéricos presentes en cuerpos de agua de uso recreativo del acuífero noreste de la Península de Yucatán: evaluación del riesgo potencial para la salud”.

A mi familia, por ser un poderoso motivo para crecer como persona y profesional.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado, por confiar en mí, exigirme y motivarme a ser mejor persona, amigo y profesional, hacer de esta etapa en mi vida algo memorable, por enseñarme a pelear por lo justo y ser leal a mis ideales, a mí mismo.

A mis directores de proyecto, la Dra. Cecilia Hernández y el Dr. Oscar Moreno, por motivarme a ser diestro y exigente con mis trabajos de investigación, por su confianza en mis capacidades, su paciencia y apoyo.

A Gabriela Rosiles por todos sus consejos, observaciones, propuestas a mi proyecto, apoyo en mis colectas y sobre todo por su amistad.

Al equipo de estudiantes del laboratorio de biología molecular, mis grandes colegas: Gerardo, Carlos, Tere y Ramón, por siempre dar una mano y una sonrisa incondicional.

## **DEDICATORIA**

***A mi mis padres, por recordarme todos los días de dónde vengo y a donde quiero ir.***

***A mi hermano Edward, como recordatorio de que nos tenemos que ver en unos pocos años, allá en la cima, donde se alcanza a tocar la plenitud con la yema de los dedos.***

***A mis mejores amigos, Emma y Dalí, por enseñarme a transformar mi suerte, en experiencias y fortaleza.***

***A la Dra. Cecilia Hernández y al Dr. Oscar Moreno, porque su rigor, respaldo y confianza en todo momento, me hizo crecer como profesional.***

***Al equipo del laboratorio de biología molecular de la UCIA; Gaby, Gerardo, Carlos, Ramón y Tere, por hacer mi estancia más ligera y llena de muchos buenos recuerdos.***

***El trabajo y la lucha llaman siempre a los mejores.  
Séneca.***

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	14
RESUMEN .....	15
INTRODUCCIÓN .....	18
1. Enfermedades entéricas .....	18
2. Península de Yucatán.....	19
CAPÍTULO I. LOS VIRUS ENTÉRICOS: CARACTERÍSTICAS, EPIDEMIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE ESTUDIO EN AMBIENTES ACUÁTICOS.....	21
ANTECEDENTES .....	21
1. Los virus.....	21
2. Los virus entéricos .....	22
3. Las enfermedades entéricas.....	22
3.1 Transmisión de los virus entéricos.....	24
3.2 Principales factores de riesgo .....	24
3.3 Los Norovirus.....	25
3.3.1 Norovirus en México .....	26
3.4 Virus de la Hepatitis A.....	27
3.4.1 Zonas con altos niveles de infección del VHA .....	29
3.4.2 Hepatitis A en México .....	30
3.4.2.1 Seroprevalencia de hepatitis viral en México .....	30
3.5 Reovirus.....	31
3.6 Riesgo sanitario en cuerpos de agua dulce de uso recreativo.....	33

4	Los virus entéricos presentes en cuerpos de agua .....	34
5	Quintana Roo, polo turístico internacional.....	35
5.1	Cobertura de agua potable y alcantarillado en el Estado de Quintana Roo. 36	
6	Técnicas de detección de virus entéricos en cuerpos de agua .....	37
6.1	Ultrafiltración tangencial.....	39
6.2	PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	39
6.3	Modelos de predicción de riesgo .....	40
	OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
	CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS EN CUERPOS DE AGUA DEL NORTE DE QUINTANA ROO.....	44
	INTRODUCCIÓN .....	44
	OBJETIVOS .....	45
	Objetivo General .....	45
	Objetivos Particulares .....	45
	MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
1.	Área de Estudio .....	46
2.	Colecta de Muestras de Agua y Extracción de ARN total .....	47
3.	Cuantificación por PCR tiempo real (qPCR).....	49
4.	Detección por PCR punto final y clonación.....	53
5.	Análisis de secuencias.....	58
6.	Reconstrucción filogenética .....	59
7.	Análisis de diversidad genética.....	59
	RESULTADOS.....	59
1.	Procesamiento de muestras de agua .....	59

2.	Cuantificación viral por qPCR .....	62
3.	Detección de virus entéricos por PCR punto final.....	64
3.3.	Detección de Hepatitis A por PCR punto final .....	70
4.	Identificación de genotipos virales .....	72
4.1.	Plantas de tratamiento .....	72
4.2.	Genotipos virales aislados de muestras ambientales .....	75
5.	Análisis filogenético .....	76
6.	Análisis de diversidad genética.....	82
	DISCUSIÓN .....	84
	CONCLUSIÓN .....	88
	CAPÍTULO III. ESTIMACIÓN DEL RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD: NOROVIRUS Y REOVIRUS.....	89
	INTRODUCCIÓN .....	89
	OBJETIVOS .....	90
	Objetivo general .....	91
	Objetivos particulares.....	91
	MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
1.	Análisis estadísticos.....	91
1.1.	PERMANOVA.....	91
1.2.	Regresión múltiple .....	92
2.	Análisis de riesgo: Probabilidad de infección .....	92
2.1.	Norovirus .....	93
2.2.	Reovirus .....	94
	RESULTADOS.....	95
1.	Parámetros fisicoquímicos .....	95
1.1.	Análisis estadístico .....	98



1.1.1. PERMANOVA.....	98
1.1.2. Regresión múltiple.....	100
2. Análisis de riesgo.....	101
2.1. Norovirus GI.....	101
2.2 Norovirus GII.....	102
2.3 Reovirus.....	103
DISCUSIÓN .....	104
CONCLUSIÓN .....	106
PERSPECTIVAS.....	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distintas metodologías empleadas en la detección de virus en ambientes acuáticos, HAVs, NV y ReoV. ....	37
<b>Tabla 2</b> Sitios de muestreo clasificados por tipo de ambiente (sistema lagunarsalobre, cenote-agua dulce y efluente de agua residual tratada), en el estado de Quintana Roo. ....	47
<b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados en la amplificación por qPCR para Norovirus GI y GII; VHA y ReoV. ....	50
<b>Tabla 4.</b> Programa de qPCR para Norovirus GI y GII; VHA y ReoV. ....	51
<b>Tabla 5.</b> Ecuaciones utilizadas para el cálculo de Pinf/día. ....	52
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados en la amplificación por PCR y PCR semi-anidado, para Norovirus y Virus de la Hepatitis A. ....	54
<b>Tabla 7.</b> Programa de PCR para amplificar Norovirus GI, GII y Virus de la Hepatitis A. Las temperaturas de alineación de los cebadores se encuentran resaltadas en negritas. ....	55
<b>Tabla 8.</b> Programa PCR semianidado para norovirus GI, GII y HAV. Las temperaturas de alineación de los cebadores se encuentran resaltadas en negritas. ....	56
<b>Tabla 9.</b> Rango de los volúmenes obtenidos después de cada proceso de concentración de partículas virales. Las muestras fueron concentradas de 100 litros hasta 5-15 mL aproximadamente. ....	60
<b>Tabla 10.</b> Concentración viral obtenida expresada en Copias del genoma por litro (CG/L) para cada una de las muestras ambientales. Las concentraciones más altas para cada especie por sitio se resaltan en negritas. ....	62
<b>Tabla 11.</b> Resumen de los resultados obtenidos al correr en un gel de agarosa al 1% el producto de las amplificaciones por RT-PCR de NoV GII. ....	67
<b>Tabla 12.</b> Listado de sitios y especies virales detectadas por PCR punto final en cada temporada. ....	72
<b>Tabla 13.</b> Genogrupos y genotipos virales identificados en muestras del efluente de la planta de tratamiento PBP y Tucson. ....	73

<b>Tabla 14.</b> Genogrupos y genotipos virales identificados en muestras ambientales tomadas en Quintana Roo.....	75
<b>Tabla 15.</b> Sumario de parámetros del modelo determinístico para estimar la probabilidad de riesgo de infección por NoV GI, GII. ....	94
<b>Tabla 16</b> Parámetros fisicoquímicos correspondientes a la temporada de lluvias (Agosto-Octubre, 2015). Los valores presentados representan las medias aritméticas obtenidas para cada parámetro tomado por triplicado.....	96
<b>Tabla 17</b> Parámetros fisicoquímicos correspondientes a la temporada de secas (febrero-Mayo, 2016). Los valores presentados representan las medias aritméticas obtenidas para cada parámetro tomado por triplicado. ....	96
<b>Tabla 18</b> Resultados del análisis de PERMANOVA de dos vías para determinar la influencia de la época climática (lluvias y secas) y el tipo de agua (dulce y salobre) en la concentración de NoV GI.....	99
<b>Tabla 19</b> Resultados del análisis de PERMANOVA de dos vías para determinar la influencia de la época climática (lluvias y secas) y el tipo de agua (dulce y salobre) en la concentración de NoV GII.....	99
<b>Tabla 20</b> Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de NoV GI. Se muestra el valor de T para cada variable evaluada.....	100
<b>Tabla 21</b> Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de Norovirus GII. Se muestra el valor de T para cada variable. ....	101
<b>Tabla 22</b> Valores de riesgo diario de infección asociados con Norovirus GI y Norovirus GII, en las muestras de agua del norte de Quintana Roo. ....	102
<b>Tabla 23</b> Probabilidad de infección en base a una dosis de 0.1 L por exposición en los sitios positivos para ReoV diferentes sitios ambientales en temporada de <b>secas</b> . En Negritas se muestran los valores más altos de Pinf % con una ID50 de 100.	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura proteica de la cápside de Norovirus y el material genético. Se denomina T=3 al triplete de estructuras que forman cada uno de las caras simétricas del icosaedro (Tomado de ViralZone, <a href="https://viralzone.expasy.org">https://viralzone.expasy.org</a> ). .....	25
<b>Figura 2.</b> Esquema del material genético y estructura de la cápside de los picoarnvirus (Tomado de Saunders, 2007). ....	28
<b>Figura 3.</b> Número de casos reportados de Hepatitis A, B, C y otras (Hepatitis E) en México. De un total de 192,588 pacientes un 85.3% presentó Hepatitis A (Tomado de Berger, 2008). ....	31
<b>Figura 4</b> Estrategia experimental.....	43
<b>Figura 5.</b> Esquema del Sistema de ultrafiltración tangencial: La muestra es impulsada por una bomba peristáltica a un flujo constante, entra al filtro ejerciendo presión en las paredes de la membrana, el agua filtrada saldrá como permeado, el concentrado será recirculado hasta eliminar aproximadamente el 99% del volumen total de la muestra, concentrando las partículas virales de la muestra en un volumen de 850-1000 mL. ....	48
<b>Figura 6.</b> Mapa mostrando la ubicación de las localidades de colecta (sitios descritos en la tabla 2) (Tomado de Rosiles-González et al., 2017). ....	60
<b>Figura 7.</b> ARN total extraído en temporada de lluvias, de los sitios de muestreo. En el recuadro se observa el ARN total, compuesto por diferentes tipos, como: mARN, rARN, tARN, siARN y miARN.....	61
<b>Figura 8.</b> ARN total extraído en temporada de secas, de los sitios de muestreo. En el recuadro se observa el ARN total compuesto por diferentes tipos, como: mARN, rARN, tARN, siARN y miARN.....	61
<b>Figura 9.</b> Comparación entre los sitios positivos por temporada para NoV GI y GII. .....	64
<b>Figura 10.</b> Detección por PCR anidado de NoV GI de las muestras de agua obtenidas. carril 1) marcador; carril 2) vacío; carril 3) muestra de efluente #2, carril 4 vacío; carril 5) efluente #3, carril 6 vacío; carril 7) ADN del sitio 6. En el gel se	

observa en un cuadro la banda del tamaño esperado de 273 pb aproximadamente. .... 65

**Figura 11.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se corrieron las digestiones enzimáticas de los plásmidos recombinantes digeridos con la enzima EcoRI. Sitio 6: carriles 1-5 (tamaño aproximado del inserto 269), efluente #2: carriles 6-10 (tamaño aproximado del inserto 276pb), efluente #3: carriles 11-15 (tamaño aproximado del inserto 276pb), Marcador: carriles 1 y 16. El inserto se encuentra resaltado en el rectángulo. .... 66

**Figura 12.** Digestiones enzimáticas con EcoRI en muestras positivas para NoV GI por qPCR. Yalkú carriles: 1-10), PBP (carril 12-21), Planta de tratamiento Norte carriles: 23-32). En ningún caso se obtuvieron los insertos del tamaño esperado (235 pb). .... 66

**Figura 13.** Amplicones resultantes de la muestra del efluente de la planta de tratamiento PBP. Se utilizaron cebadores específicos para NoV GII. En los carriles: 3, 5 y 7 se observó la banda del tamaño esperado de 269pb. La banda del carril 7 fue cortada para su elusión, ligación y clonación. .... 68

**Figura 14.** Gel de electroforesis mostrando los productos amplificados correspondientes a NoV GII carril: 1) PBP (carriles 2 y 3), sitio 5 (carril 4), sitio 8 (carril 5), sitio 7 (carril 6) y sitio 2 (carril 7). Marcador 250pb (carril 1). Banda esperada 269pb. Las muestras fueron ligadas y clonadas. .... 68

**Figura 15.** Digestión enzimática con EcoRI para NoV GII en PBP. Banda esperada: 269pb. Carriles positivos que contienen el inserto del tamaño esperado: 5,6,7,9,10,11,13,14, 21, 22, 23,25,26 y 27. Marcador: carril 1, 16, 17 y 28. .... 69

**Figura 16.** Digestión enzimática con EcoRI de los plásmidos recombinantes conteniendo los insertos amplificados con los cebadores específicos para NoV GII para muestras de PBP (carriles 2-16), 7B (carriles 18-32). Marcadores de 250pb: carriles 1 y 17. Carriles positivos: PBP (3, 5,6-9,10-15) y 7B (20-23, 27-30 y 32). 69

**Figura 17.** Gel B: Digestión enzimática con EcoRI de NoV GII para muestras de ambientales de cenotes de agua dulce: LN (carriles 2-16), R96 (carriles 18-32). Marcador 250pb: carriles 1 y 17. Carriles positivos: LN (2,4-7, 10, 13, 14,16) y R96 (18-20, 22-25, 27,28, 30-32). .... 70

<b>Figura 18.</b> Amplificación por PCR punto final utilizando cebadores específicos para virus de Hepatitis A. Muestra: planta de tratamiento PBP (fragmento de 200pb aproximadamente). .....	71
<b>Figura 19.</b> Plásmidos recombinantes digeridos con la enzima EcoRI. ....	71
<b>Figura 20.</b> Reconstrucción filogenética con base en las secuencias obtenidas para NoV GI. El árbol fue construido con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento Tucson (TZ). El clado del genotipo NoV GI.2 se encuentra resaltado en color verde y el clado del genotipo GI.5 se encuentra resaltado en color rojo. La raíz corresponde al genotipo GI.3 reportado en Estados Unidos ( $\Delta$ en color rojo). En los nodos se muestran los valores obtenidos de Bootstrap. Los siguientes acrónimos corresponden al país donde la secuencia fue descrita: US/Estados Unidos, CHN/China, COR/Corea, BEL/Bélgica, JPN/Japón. Los $\Delta$ corresponden a las secuencias obtenidas del GenBank y el resto marcadas con $\bullet$ corresponden a las secuencias obtenidas en el presente trabajo.....	77
<b>Figura 21</b> Mapa mostrando los países en donde se han reportado las secuencias utilizadas para la reconstrucción filogenética del genogrupo NoV GI, que contiene la distribución de los genotipos de NoV GI.2, GI.4, y GI.5 en diferentes países. ....	78
<b>Figura 22.</b> Reconstrucción filogenética con base en las secuencias obtenidas de NoV GII. El árbol fue construido con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento Tucson (TZ) y PBP además de las secuencias obtenidas de las muestras ambientales (marcadas con un $\bullet$ ). El clado del genotipo NoV GII.3 se encuentra resaltado en color azul; el clado del genotipo GII.4 se encuentra resaltado en color rojo y el clado del genotipo GII.17 se encuentra resaltado en verde. La raíz corresponde al genotipo GII.1 ( $\Delta$ en color azul cielo). Los siguientes acrónimos corresponden al país donde la secuencia fue descrita: US/Estados Unidos, BRA/Brasil, CHN/China, COR/Corea, BEL/Bélgica, JPN/Japón. Las secuencias de referencia se encuentran marcadas con un triángulo $\Delta$ . En la parte interior del árbol, se muestran los valores de bootstrap.....	79
<b>Figura 23.</b> Países con presencia de NV GII. 4 y GII.17 cuyos registros fueron usados como referencia para la reconstrucción del árbol filogenético de las secuencias positivas para NV GII en cuerpos de agua en Quintana Roo, México.....	80

<b>Figura 24</b> Árbol filogenético HAV, compuesto con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento PBP (marcadas con un ●). La raíz corresponde al virus de Hepatitis E aviar (Δ en color magenta). Las secuencias base para la construcción del árbol fueron elegidas en base a los hits con mayor porcentaje de identidad con la herramienta BLAST de la NCBI (marcadas con Δ). En la parte interior del árbol, se muestran los valores de bootstrap. ....	81
<b>Figura 25.</b> Países con presencia de VHA cuyas secuencias fueron usadas como referencia para la reconstrucción del árbol filogenético de las secuencias positivas para VHA en efluentes de plantas de tratamiento en el Estado de Quintana Roo, México. ....	82
<b>Figura 26.</b> Análisis de diversidad genética por pares. Se analizaron todas las secuencias que conformaron el árbol filogenético de NoV GII. De manera gráfica se muestran los porcentajes aproximados de diversidad que existe entre las diferentes variedades dentro del GII. ....	83
<b>Figura 28</b> Temperatura media registrada en temporada de lluvias y secas en los diferentes sitios de muestreo. ....	97
<b>Figura 29.</b> pH promedio registrado en la temporada de lluvias y secas en los diferentes sitios de muestreo. ....	98
<b>Figura 30</b> Probabilidad de infección por exposición diaria, expresada en Log en temporada de secas en base al modelo probabilístico “Beta-Poisson”. ....	104

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	ARN
Ácido Ribonucleico mensajero	mARN
Ácido Ribonucleico ribosomal	rARN
Ácido Ribonucleico de transferencia	tARN
Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia	siARN
Mini ácido Ribonucleico	miARN
Norovirus	NoV
Virus de Hepatitis A	VHA
Reovirus	ReoV
Copias de genoma	CG
Dirección General de Epidemiología	DGE
Enfermedades Diarreicas Agudas	EDA'S
Gobierno de Quintana Roo	GOBQROO
Gobierno de Yucatán	GOBYUC
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	IDRE
Infecciones Respiratorias Agudas	IRA
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	INCMNSZ
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	INEGI
Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	INDRE
Intearnl Terminal Repeat	ITR
Marca de Producto Registrada	IDEXX
Norma Mexicana	NMX
Norma Oficial Mexicana	NOM
Organización de Las Naciones Unidas	ONU
Organización Mundial de la Salud	OMS
United States Environmental Protection Agency	USEPA
World Health Organization	WHO

---



## RESUMEN

Las dolinas o cenotes son formaciones geológicas características del acuífero cárstico de la Península de Yucatán, éstas pueden ser utilizadas para actividades recreativas, especialmente en la zona norte de Quintana Roo. El objetivo principal de este estudio fue determinar la ocurrencia de norovirus genogrupo I (NoV GI) y genogrupo II (NoV GII), virus de Hepatitis A (VHA) y Reovirus (ReoV), durante dos temporadas climáticas en un ciclo anual en la zona norte del estado de Quintana Roo. Se realizó la colecta de 100 L de agua en los diez sitios seleccionados, en temporada de secas y en temporada de lluvias del año 2016, la cual fue ultrafiltrada para obtener los concentrados que contienen a las partículas virales. Los concentrados fueron utilizados para extraer ARN total a partir del cual se obtuvo cDNA, el cual fue posteriormente utilizado como templado para amplificar a los virus entéricos por PCR cuantitativo (qPCR). Se realizaron RT-PCRs anidados a partir de muestras seleccionadas para obtener amplicones de HAV, NoV GI y GII los cuales fueron clonados y secuenciados para realizar la identificación de los tipos virales. Los resultados del qPCR demostraron la presencia de NoV GI en el 50% de los sitios durante la temporada de lluvias en concentraciones desde  $1.2 \times 10^2$  copias de genoma por litro (CG/L) hasta  $1.6 \times 10^3$  CG/L. Se detectaron NoV GII en el 30 y el 40% de las muestras durante la temporada de lluvias y de secas, respectivamente, en concentraciones desde  $1.0 \times 10^1$  hasta  $2.9 \times 10^2$  CG/L. Se detectaron simultáneamente NoV GI y GII en el 30% de las muestras durante la temporada de lluvias. Se detectaron ReoV en 70% de las muestras colectadas durante la temporada de secas en concentraciones de  $5.9 \times 10^1$  hasta  $4.6 \times 10^3$  CG/L. No se detectó al HAV en ninguna de las muestras, sin embargo, se obtuvieron secuencias de HAV a partir del efluente de una planta de tratamiento de la región. Las secuencias obtenidas a partir de las muestras de agua demostraron la presencia de Norovirus correspondientes a los genotipos: GI.2, GII.4, GII.P16, y GII.P17. No se detectaron correlaciones entre la ocurrencia de los virus entéricos y el tipo de agua o la temporada ( $p > 0.05$ ). El riesgo diario estimado de infección varió por temporada y por tipo de agua y fue para NoV GI de  $5.7 \times 10^{-1}$  hasta 1; para NoV GII de  $7.0 \times 10^{-2}$  hasta  $8.6 \times 10^{-1}$  y para ReoV de  $3.38 \times 10^{-2}$  hasta  $2.11 \times 10^{-1}$ . Las estimaciones de

los riesgos para la salud indican que existe un mayor riesgo en sitios de uso recreativo para el caso de NoV GI y GII durante la temporada de lluvias.

## ABSTRACT

Dolines or cenotes are characteristic features of the karst aquifer of the Yucatan Peninsula. They are used for recreational activities especially in the north of the state of Quintana Roo. The main objective of this work was to determine the occurrence of norovirus genogroup I (NoV GI), genogroup II (NoV GII), hepatitis A virus (HAV) and Reovirus (ReoV), during two climatic seasons over one year. Water samples (100 L) were collected and ultrafiltrated to concentrate viral particles. Concentrates were subjected to isolation of total ARN from which cDNA was obtained and used as template to amplify each enteric virus by quantitative PCR (qPCR). To identify the predominant HAV and NoV genotypes, selected samples were subjected to nested RT-PCR, and amplicons were cloned and sequenced. Quantitative PCR results showed the presence of NoV GI in 50% of the sites only during the rainy season with concentrations ranging from  $1.2 \times 10^2$  to  $1.6 \times 10^3$  genome copies per liter (GC/L). NoV genogroup II (GII) were detected in 30% and 40% of the sites during the rainy and dry season respectively, with concentrations ranging from  $1.0 \times 10^1$  to  $2.9 \times 10^2$  GC/L. NoV GI and NoV GII were detected simultaneously in 30% of the samples during the rainy season. ReoV were detected in 70% of the sites during the dry season, in concentrations ranging from  $5.9 \times 10^1$  to  $4.6 \times 10^3$  CG/L. HAV was not detected in environmental samples, however, HAV amplicons and sequences were obtained from the effluent water of a waste water treatment local facility. Viral sequences obtained from selected water samples, shared the highest percentages of nucleotide identity (>94%) with the following genotypes: GI.2, GII.4, GII.P16, and GII.P17. No significant correlation was observed between NoV GI and NoV GII occurrence by season or water type ( $p > 0.05$ ). The estimated daily risk of infection varied by season and water type and ranged from  $5.7 \times 10^{-1}$  to 1 for NoV GI; from  $7.0 \times 10^{-2}$  to  $8.6 \times 10^{-1}$  for NoV GII; and from  $3.38 \times 10^{-2}$  to  $2.11 \times 10^{-1}$  for ReoV. These findings indicate that NoV GI and GII represent a potential health risk in the YP aquifer, especially during the rainy season.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Enfermedades entéricas

Las enfermedades entéricas, como la diarrea, hepatitis A y E, están asociadas a las infecciones causadas por los virus entéricos y se encuentran entre las causas más comunes de muerte en infantes a nivel mundial. Los virus entéricos son comúnmente transmitidos por agua o comida contaminada fecalmente (Antonio et al., 2010). En niños menores de cinco años, ocasionan aproximadamente 76 millones de muertes cada año por diarrea ("OMS Hepatitis A," 2014). Una vez que los virus entéricos son liberados al ambiente por las excretas de personas enfermas (en concentraciones hasta de  $10^{11}$  partículas virales por gramo de heces fecales), éstos pueden contaminar los cuerpos de agua superficiales o subterráneos y posteriormente causar enfermedades a los usuarios tal como hepatitis A y E, meningitis, poliomielitis, gastroenteritis, miocarditis y diarrea (Antonio et al., 2010).

Actualmente los datos epidemiológicos de los brotes de gastroenteritis causados por agua dulce o por exposiciones que no sean en el baño (por ejemplo, actividades de alta exposición como el surfing, nado o navegar en botes neumáticos), son inadecuados para presentar un análisis paralelo sobre los riesgos de infección viral y fijar un valor estándar con respecto a las concentraciones de virus entéricos que cada cuerpo de agua posee. Esto es difícil ya que las concentraciones de los virus pueden variar por temporada y los tiempos de persistencia dependen de las características hidrodinámicas particulares de cada cuerpo de agua, si bien el estudio hidrodinámico es complejo, el monitoreo de la calidad del agua superficial sería un punto de referencia importante para evitar brotes de enfermedades causadas por los virus (Organización Mundial de la Salud, 2000). Los indicadores bacteriológicos comúnmente utilizados para determinar la calidad del agua, son las bacterias del grupo coliforme, clasificados en totales, fecales y estreptococos fecales (Arcos-Pulido, 2005), sin embargo, estos indicadores bacterianos no siempre se correlacionan con la presencia de otros patógenos que pueden causar enfermedades gastrointestinales, como los virus (Medrano-Félix et al., 2011).

## 2. Península de Yucatán

La Península de Yucatán (PY), es una formación caliza de gran permeabilidad caracterizada por abundantes pozos o cuevas subterráneas de agua dulce llamadas dolinas (o cenotes). Algunos de estos cuerpos han sido habilitados para actividades recreativas (bucear o bañarse) especialmente en la zona norte del estado de Quintana Roo (Secretaría de Turismo, 2012). La habilitación de cuerpos de agua para uso recreativo y la intensa actividad turística a la que están expuestos, plantea distintas problemáticas ecológicas, sociales y de salud pública. Cuando las aguas subterráneas llegan a ser contaminadas por bacterias, virus, productos químicos como solventes, pesticidas y/o hidrocarburos, no pueden depurarse por sí mismas, debido a que las corrientes de las aguas freáticas son lentas y no turbulentas, además, normalmente ocurre poca dilución de contaminantes en las aguas subterráneas. En las aguas subterráneas al no estar a plena vista, la contaminación puede ocurrir sin detección por muchos años, hasta que éstas se extraen para darles un uso (Environmental Protection Agency, 1990).

En la PY, como en otros sitios, los virus entéricos pueden llegar a los ecosistemas acuáticos debido a las actividades humanas; producto de las fallas en el drenaje o en los sistemas sépticos, las escorrentías de origen agrícola, de las actividades urbanas y la descarga de aguas residuales que provienen de los hogares que no se encuentran conectados al drenaje (Fong y Lip, 2005; Espinosa et al., 2009). Los virus entéricos son resistentes a los métodos de desinfección más comunes, como la cloración y una vez descargados en el ambiente pueden ser persistentes y convertirse en contaminantes del agua (Lin et al., 2013). Los virus entéricos son altamente resistentes a condiciones adversas y pueden persistir por varias semanas o meses en el ambiente acuático, facilitando su transmisión hacia y entre las personas (Lin, 2013; Griffin et al., 2003). Los procesos actuales de tratamiento para aguas residuales erradican alrededor de un 50 y un 90% las partículas virales, lo que permite que una carga viral significativa sea descargada y liberada en el agua residual (Ganesh y Lin, 2013). Los virus entéricos están implicados como agentes

causales de varios brotes de gastroenteritis que ocurren por la ingestión de aguas de distribución contaminadas, contacto e ingestión de aguas contaminadas durante actividades recreativas (ríos, lagos, ambientes marinos y costeros) y por la ingestión de invertebrados marinos que crecen o que son cultivados en aguas contaminadas (Fong y Lip, 2005).

El estado de Quintana Roo cuenta con muchos atractivos turísticos-acuáticos. Los cuerpos de agua más importantes están localizados en el norte del el Estado (playas, cenotes y lagunas) (INEGI, 2014), los cuales lo posicionan como líder nacional en el sector turístico (Secretaría de Turismo, 2012). En los últimos años, se han reportado diversos contaminantes orgánicos e inorgánicos producto de la actividad humana y de los asentamiento cercanos (Metcalf et al., 2011; Leal-Bautista et al., 2013; Polanco et al., 2015), los cuales pueden amenazar los ecosistemas, la sustentabilidad del destino turístico y la salud pública (Faust, 2001).

De entre todos los virus entéricos que pueden afectar al humano, existen ciertos grupos predominantes que pueden detectarse en el ambiente acuático y que han sido propuestos como indicadores de contaminación por aguas negras y residuales en el ambiente (Lin et al., 2013). Entre éstos se encuentran los norovirus (NoV), que son los principales agentes causales de las enfermedades gastrointestinales de origen no bacteriano en el humano y son frecuentemente transmitidos por la ingestión de agua contaminada (Vinjé et al., 2004) y en México han sido detectados en ambientes acuáticos costeros del norte del país (Hernández-Morga et al., 2008). Además, el virus de hepatitis A (VHA) está ampliamente distribuido a nivel mundial y se ha reportado frecuentemente en el ambiente acuático por periodos de tiempo prolongado (Ganesh y Lin, 2013). En México se ha detectado en agua marina de uso recreativo y en aguas estuarinas del norte de México (Hernández-Morga et al., 2008; León-Félix et al., 2010). Los *Orthoreovirus* (familia *Reoviridae*), son virus entéricos que se encuentran frecuentemente en el agua negra y que infectan a los hospederos a través de la vía fecal-oral (Betancourt y Gerba, 2016). En humanos, los Reovirus (ReoV) causan frecuentemente enfermedades en niños, que pueden ser asintomáticas o con síntomas muy leves de infecciones intestinales o respiratorias (Dermody et al., 2013) y diarrea (Giordano et al., 2005). Los ReoV se

han reportado frecuentemente y en altas concentraciones en agua superficial y agua subterránea (Sedmak et al., 2005; Symonds et al., 2009; Lim et al., 2015), sin embargo, su presencia en cuerpos de agua en México aún no ha sido documentada.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se utilizarán herramientas moleculares (RT-PCR y *q*PCR) para la detección de tres grupos importantes de virus entéricos Norovirus (NoVs), virus de la Hepatitis A (VHA) y Reovirus (ReoV) presentes en cuerpos de agua de uso recreativo localizados en el acuífero noreste de la Península de Yucatán. El proyecto aportará conocimiento sobre los virus entéricos que son transmitidos por el agua y que causan enfermedades gastrointestinales que afectan a la sociedad mexicana, en particular a los habitantes del estado de Quintana Roo y a turistas nacionales y extranjeros. La presencia de los virus entéricos en el ambiente acuático indica contaminación fecal y representa un riesgo potencial para la población expuesta, sobre todo en sitios recreativos. Es un tema muy importante que incide en la salud pública y que ha sido poco estudiado en México, sobre todo en el sureste del país. Los datos que se obtengan aportarán información valiosa sobre los genotipos que ocurren en el ambiente acuático y sus concentraciones. Además, los resultados ayudarán a realizar predicciones de riesgos para la salud.

## **CAPÍTULO I. LOS VIRUS ENTÉRICOS: CARACTERÍSTICAS, EPIDEMIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE ESTUDIO EN AMBIENTES ACUÁTICOS**

### **ANTECEDENTES**

#### **1. Los virus**

Los virus son parásitos intracelulares obligados que contienen material genético rodeado por una cubierta proteica protectora. Los genomas de los virus están conformados por ARN (ácido ribonucleico) o por ADN (ácido desoxirribonucleico) rodeado por una cápside formada por numerosas copias de una proteína o de un

número limitado de ellas (Contreras, 2003). Algunos grupos de virus presentan por fuera de la cápside una envoltura lipídica de origen celular en la que se insertan glicoproteínas. No presentan sistemas enzimáticos propios, por lo tanto, no son capaces de replicarse por sí solos y requieren de células animales, vegetales o bacterias para cumplir su ciclo de reproducción; esto define su parasitismo celular obligatorio (Fields et al., 2007).

## **2. Los virus entéricos**

Los virus entéricos infectan el aparato digestivo humano y se transmiten predominantemente por la vía fecal-oral. Forman parte de este grupo de virus los enterovirus, los astrovirus, los adenovirus entéricos, los reovirus, los calicivirus y los virus de la hepatitis A y E (Dermody et al., 2013). Varios de ellos son causas importantes de morbilidad y mortalidad mundial. Los virus entéricos difieren entre ellos en la estructura, la composición, el tipo de genoma (ácido nucleico), su morfología, la supervivencia ambiental y la resistencia que poseen a los procesos de tratamiento del agua (Gerba, 2013). Poseen cápsides resistentes que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables y resistir las condiciones de acidez y de actividad proteolítica del estómago en su camino hacia el duodeno, donde infectan las células epiteliales vulnerables (Grabow et al., 2001). A nivel mundial los Norovirus, los Reovirus y los Virus de la Hepatitis A y E son los virus enteropatógenos más reportados como causantes de las toxiinfecciones alimentarias y son transmitidos por agua y alimentos contaminados (Panel y Biohaz, 2013).

## **3. Las enfermedades entéricas**

Mundialmente, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de



los 5 años puede ser de hasta un 50% (influido por factores socioeconómicos y nutricionales) (Hernández-Cortez, 2011). Las enfermedades entéricas se consideran un problema de salud pública, en México son una de las primeras causas de consulta médica y de muerte principalmente en lactantes y niños (Hernández-Cortez, 2011). Las manifestaciones clínicas más destacadas de la gastroenteritis son: fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea moderada o intensa. La mayor incidencia se presenta en personas de 20 a 40 años, los infantes y ancianos son los que suelen sufrir sus efectos fulminantes, debido a la excesiva pérdida de electrolitos que puede causar deshidratación severa (Hernández-Cortez, 2011).

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal (Hernández Cortez et al., 2011) que puede contener bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas) y virus (Rotavirus y Norovirus).

Los principales agentes causales de las enfermedades gastroentéricas no bacterianas son los virus, entre los cuales se encuentran principalmente los rotavirus y la norovirus, especialmente en países en desarrollo (OMS, 2013; Hernández-Cortez et al., 2011). Además de estos virus, los adenovirus, los astrovirus y los sapovirus también son importantes agentes causales de enfermedades gastroentéricas (ver Wihelmi et al., 2003). En México se ha reportado un alto porcentaje de infecciones gastroentéricas causadas por los norovirus y se han identificado varias cepas en la población (da Silva-Poló et al, 2016), además de infecciones asintomáticas en niños (García et al., 2006). El período de incubación de una infección por norovirus es, generalmente, de 24 a 48 horas. La enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%) (Manuel et al., 2010). Los vómitos son muy frecuentes en los niños mayores de 1 año, mientras que en los lactantes se suele desarrollar sólo diarrea. Estos síntomas pueden persistir en pacientes hospitalizados y en niños menores de 11 años, entre 4 y 6 días (Manuel et al., 2010).

### **3.1 Transmisión de los virus entéricos**

Los enterovirus se transmiten principalmente por la vía fecal-oral, esto es, cuando una persona no infectada ingiere alimentos o agua contaminados por las heces de una persona infectada. Los brotes transmitidos por el agua, suelen estar relacionados con casos de contaminación por aguas residuales o de abastecimiento de agua insuficientemente tratada (OMS Hepatitis A, 2014). Éstos pueden llegar al ambiente acuático introducidos por diversas actividades humanas como pueden ser las fallas en los drenajes o fosas sépticas, escorrentías o descarga de aguas negras y aguas tratadas (ver Fong y Lipp, 2005). Una persona infectada puede excretar de  $10^5$  hasta  $10^{13}$  partículas virales/g de materia fecal, con potencial para infectar diferentes fuentes de agua (Chigor y Okoh, 2012). La excreción viral es intensa en individuos enfermos y persiste durante un período prolongado de hasta 2 semanas, incluso después de que hayan desaparecido los síntomas (Manuel et al., 2010). Los brotes aparecen frecuentemente tras la exposición al agua o a los alimentos contaminados y el contacto posterior de persona a persona propagan la infección (Manuel et al., 2010).

### **3.2 Principales factores de riesgo**

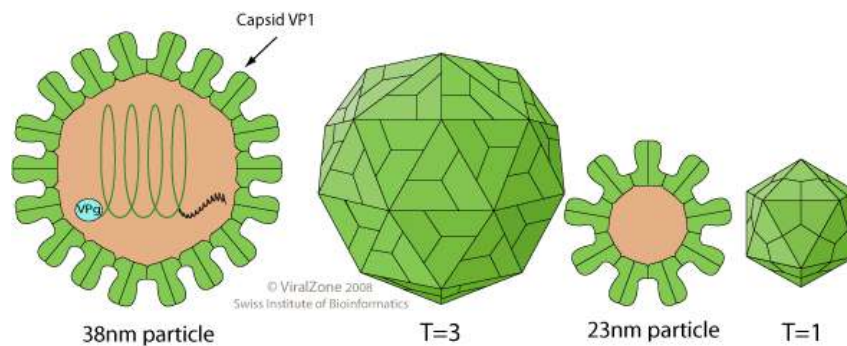
Entre los principales factores de riesgo de contraer enfermedades gastroentéricas cabe citar los siguientes reportados por la Organización mundial de la salud (OMS Hepatitis A, 2014):

- Saneamiento deficiente.
- Falta de agua salubre.
- Drogas inyectables.
- Convivencia con una persona infectada.
- Relaciones sexuales con una persona con infección aguda por HAV.

- Viajes a zonas de alta endemicidad sin inmunización previa
- Aerosoles.
- Alta mortalidad en infantes y adultos de la tercera edad.

### 3.3 Los Norovirus

Los norovirus (NoV) junto con los *Sapovirus* son virus pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, dentro de los calcivirus humanos se encuentran dos géneros que son importantes agentes causales de enfermedades gastroentéricas. Los NoV están clasificados en cinco genogrupos entre los cuales los I, II y IV contienen virus que afectan al ser humano (Dermody et al., 2013). Son virus no envueltos, presentan una cápside de aproximadamente 38 a 40 nm de diámetro, con simetría icosaédrica. La cápside está compuesta de 180 proteínas VP1 (Figura 1), su genoma es monopartita, lineal de ARN de cadena simple positiva, de 7.3 a 8.3 kilobases (Kb). El extremo 5' está ligado a una proteína viral unida al genoma (VPg) y el extremo 3'-terminal está poliadenilado. La proteína VPg se une covalentemente al genoma (Carter y Saunders, 2007). La diversidad dentro del género permite a éste persistir en las poblaciones humanas, aunque actualmente el genogrupo II (GII) es el agente causal de aproximadamente el 80% de todas las infecciones (Messner, 2014).



**Figura 1.** Esquema de la estructura proteica de la cápside de Norovirus y el material genético. Se denomina T=3 al triplete de estructuras que forman cada uno de las caras simétricas del icosaedro (Tomado de ViralZone, <https://viralzone.expasy.org>).

Los NoV se unen a los antígenos polimórficos sanguíneos que actúan como el receptor celular putativo y las cepas de diferentes genogrupos se unen a antígenos polimórficos sanguíneos. Existen variaciones importantes en los receptores de unión diferencial a los antígenos polimórficos sanguíneos, así como antigenicidad alterada (Betancourt, 2016). Estas observaciones sugieren que la cápside de los norovirus evoluciona para evadir la respuesta inmune de memoria celular, mientras que conserva su capacidad para unirse a cualquiera de varios antígenos polimórficos sanguíneos (Bosch et al., 2008; Donaldson et al., 2008). Estos virus persisten a temperaturas de 60 °C durante tres minutos y de 100 °C durante un minuto en condiciones controladas; soportan dosis de rayos ultravioleta superiores a 103 mJ/cm<sup>2</sup>, e incluso, resisten dosis de radiación gamma de 2 a 4 kGy, que se utilizan para tratar alimentos y pH ácidos (pH 2 durante 30 minutos a 37 °C) o básicos (pH 12 durante 30 minutos a 37 °) (Fong y Lipp, 2005).

Los NoV son importantes patógenos humanos conocidos por causar brotes epidémicos de gastroenteritis graves en las comunidades, cuarteles militares, cruceros, hospitales y comunidades de vida asistida, lo que resulta en más de 267 millones de infecciones anuales en todo el mundo (Donaldson et al., 2008). En Estados Unidos se registran anualmente entre 500 y 800 muertes por infecciones causadas por NoV (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2016). En general, en los países en desarrollo, como en el caso de México, se presentan más casos de gastroenteritis aguda causada por patógenos de tipo viral (Hernández Cortez et al., 2011).

### **3.3.1 Norovirus en México**

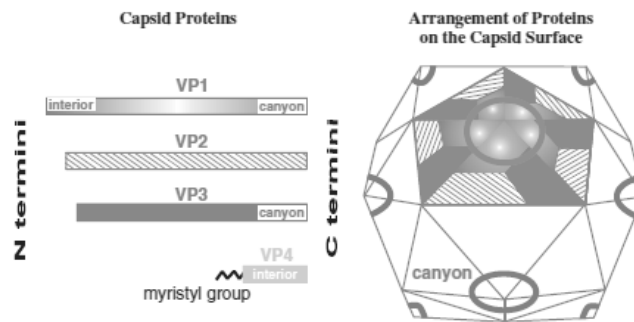
En el 2007 utilizando técnicas moleculares como RT-PCR, se detectó la infección por NoV genogrupo II (GII) en el 31% (n= 407) de las muestras diarreicas de niños menores de 5 años de edad obtenidas en diversos estados de la República Mexicana pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP). El análisis filogenético de las cepas detectadas en este estudio demostró

la importancia que tienen las cepas pertenecientes a NoV GII al estar asociados con la mayoría de los casos esporádicos de gastroenteritis aguda. Los NoV se han perfilado como el segundo agente viral de importancia a nivel nacional después de los Rotavirus como causante de diarreas en la población (Nova-Ocampo, 2010). En México el 13% de episodios de diarrea en niños menores de dos años han estado relacionados con miembros de la familia *Calciviridae* (Farkas et al., 2000), y la detección de anticuerpos contra norovirus se ha relacionado con la aparición esporádica por grupos de edad en la población (Peasey et al., 2004).

En México, el uso de metodologías como ELISA y métodos moleculares como la RT-PCR para la detección de NoV son limitadas en el área de salud pública, donde son principalmente requeridas para el diagnóstico de la gastroenteritis viral. La detección de virus entéricos en niños que presentan síndrome diarreico, no se realiza de forma rutinaria en los laboratorios de salud pública, originando un “sub-registro” en la epidemiología de la enfermedad, por lo cual, tampoco existe basta información sobre la recombinación genética de las diferentes cepas o genotipos de NoV en México (Gómez-Santiago, 2011).

### **3.4 Virus de la Hepatitis A**

El virus de la Hepatitis A (HAV) pertenece a la familia *Picoarnviridae*, son virus pequeños que poseen genomas de ARN de cadena sencilla de un tamaño de 7-8 Kb (Fields et al., 2007) y poseen una estructura relativamente simple que consiste en una cápside esférica con un diámetro de aproximadamente 25-30 nm (Carter y Saunders, 2007). Su cápside tiene simetría icosaédrica, está compuesta por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas que conforman al virus, que a su vez está constituido por 3 polipéptidos de gran tamaño VP1, VP2, VP3 y otra proteína de menor tamaño VP4 (**Figura 2**). Las tres proteínas mayores que forman la cápside del HAV poseen sitios antigénicos inmunodominantes que están altamente conservados en todas las cepas humanas. El HAV tiene un solo serotipo y no reacciona de manera cruzada con anticuerpos específicos para enterovirus.



**Figura 2.** Esquema del material genético y estructura de la cápside de los picoarnvirus (Tomado de Saunders, 2007).

El HAV es más resistente al calor que otros picoarnvirus, siendo todavía infeccioso luego de ser sometido a 60 ° C durante 10-12 horas (Cordeiro, 2008). Al tratarse de un virus desnudo, no presenta lípidos en su estructura y por lo tanto es resistente a aquellos agentes usados para inactivar virus envueltos (solventes). Por lo tanto, es estable al tratamiento con éter, cloroformo y ácido (es resistente a extremos de pH, manteniéndose estable a pH 3 y requiriéndose un pH superior a 10 para inactivarlo). La inactivación total de la partícula viral se da casi de inmediato a temperaturas superiores a los 90°C. La actividad viral se inhibe por ebullición durante 5 minutos, con formalina a altas concentraciones y por radiación UV. A 4°C permanece estable durante semanas a meses, mientras que conservado de -20 a -70°C mantiene su infectividad por años. Se inactiva por la esterilización con autoclave (121 °C durante 20 min.) y la exposición al cloro durante 15 minutos en concentraciones de 2.5 -10.5 mg/L (Cordeiro et al., 2008).

El virus de la hepatitis A (VHA) es uno de los agentes causales de la enfermedad hepática conocida como hepatitis. Éste se transmite principalmente cuando una persona no infectada (y no vacunada) come o bebe algo contaminado por heces de una persona infectada por ese virus. La enfermedad está estrechamente asociada a la falta de agua salubre, un saneamiento deficiente y una mala higiene personal. A diferencia de las hepatitis B y C, la hepatitis A no causa hepatopatía crónica y rara vez es mortal, pero puede causar síntomas debilitantes y hepatitis fulminante (insuficiencia hepática aguda), que se asocia a una alta mortalidad, se presenta esporádicamente y en epidemias en el mundo entero, y tiende a reaparecer

periódicamente. A nivel mundial, las infecciones por el VHA ascienden aproximadamente a 1.4 millones de casos al año (Franco y Zaratti, 2012).

El periodo de incubación de la hepatitis A suele ser de unos 14 a 28 días. Los síntomas de la hepatitis A tienen carácter moderado o grave y comprenden fiebre, malestar, pérdida de apetito, diarrea, náuseas, molestias abdominales, coloración oscura de la orina e ictericia (coloración amarillenta de la piel y la esclerótica ocular). Las personas infectadas no siempre presentan todos esos síntomas. Los adultos desarrollan signos y síntomas con mayor frecuencia que los niños y la gravedad de la enfermedad, así como la mortalidad, aumentan con la edad. Los menores de seis años infectados no suelen tener síntomas apreciables y solo el 10% muestran ictericia. Entre los niños más mayores y los adultos la infección suele causar síntomas más graves, con ictericia en más del 70% de los casos (Shapiro y Margolis, 1993).

La hepatitis A es una de las causas más frecuentes de infección por ingestión de alimentos contaminados. Las epidemias asociadas a alimentos o agua contaminados pueden aparecer de forma explosiva, como la epidemia registrada en Shanghái en 1988, que afectó a unas 300 000 personas (O'ryan et al., 1991). Los virus de la hepatitis A persisten en el medio y pueden resistir los procesos de producción de alimentos usados habitualmente para inactivar y/o controlar las bacterias patógenas. La enfermedad puede tener consecuencias económicas y sociales graves en las comunidades. Los pacientes pueden tardar semanas o meses en recuperarse. La repercusión en los establecimientos de comidas contaminados por el virus y en la productividad local en general pueden ser graves (Letaief et al., 2005)

### **3.4.1 Zonas con altos niveles de infección del VHA**

En los países en desarrollo con condiciones de saneamiento y prácticas de higiene deficientes, la mayoría de los niños (90%) han sufrido una infección por VHA antes de los 10 años. Los infectados durante la infancia no padecen síntomas visibles.

Las epidemias son poco frecuentes porque los niños mayores y los adultos suelen estar inmunizados. En estas zonas las tasas de morbilidad sintomática son bajas y los brotes epidémicos son raros (OMS, 2014)

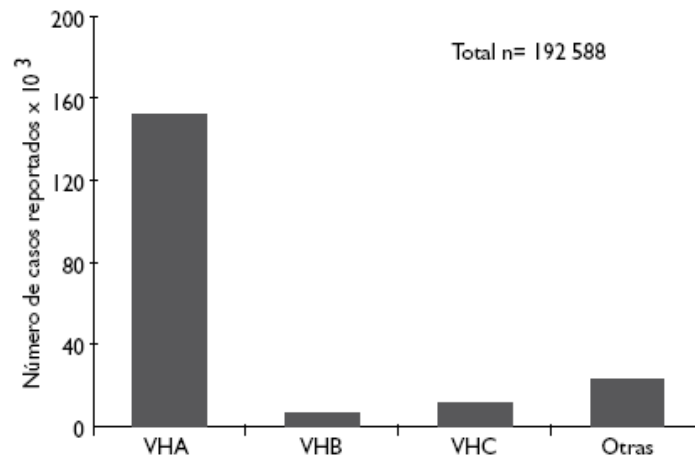
### **3.4.2 Hepatitis A en México**

Los datos de la Secretaría de Salud reportan que en los últimos 10 años la Hepatitis A ha ido descendiendo, ya que en el 2000 se presentaron 21,231 casos y en el 2009 se presentaron 18,082 casos con una incidencia de 16.8 por cada 100,000 habitantes. Una de las entidades más afectadas fue Yucatán con una incidencia de 44.8/100,000 habitantes, en el caso de Quintana Roo los registros no ascienden de los 50 casos anuales (Berger, 2008).

#### **3.4.2.1 Seroprevalencia de hepatitis viral en México**

A partir de 1990 se comenzó a tener acceso a la información que reporta el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) de la Secretaría de Salud de México. De 1990 a 1999 se reportó un total de 217, 513 casos de hepatitis causados por virus en el país, de los cuales el 85.3% estuvieron asociados con el VHA y el 3.7% con el virus de la hepatitis B (VHB). Desde 2000 hasta 2007 se registraron un total de 192, 588 casos de hepatitis, de los cuales el 79% estuvieron asociados con el VHA (Panduro et al., 2011) (**Figura 3**).





**Figura 3.** Número de casos reportados de Hepatitis A, B, C y otras (Hepatitis E) en México. De un total de 192,588 pacientes un 85.3% presentó Hepatitis A (Tomado de Berger, 2008).

El grupo de edad más afectado por el VHA es el de niños de 5-9 años con una incidencia de 69.0 por cada 100 000 habitantes seguido del de 1-4 años y del 10-14 años con una incidencia del 52 y del 29 por cada 100 000 habitantes, respectivamente. La mortalidad varía del 0.1 al 0.3 % y en adultos mayores de 50 años aumenta al 1.8% (Jacobsen y Wiersma, 2010).

### 3.5 Reovirus

Los Reovirus (por su acrónimo en inglés *respiratory enteric orphan virus* ReoV) son el grupo más diverso de virus no envueltos con genomas de doble cadena de ARN (dsARN), clasificado dentro de la familia Reoviridae, género *Orthoreovirus* (Betancourt, 2014). Existen 15 géneros de la familia Reoviridae (ReoV) que infectan mamíferos, aves y reptiles (Dermody et al., 2013). Los viriones tienen un tamaño aproximado de 85 nm de diámetro, no poseen envoltura (Dermody et al., 2013) y se componen en un 15% de ARN y un 85% de proteínas (estructurales y no estructurales) (Silverstein et al., 1976). Todos los miembros del género poseen ARN segmentado en 10 cadenas lineales complementarias, contenido dentro de la

cápside icosaédrica (Dermody et al., 2013). Los 10 segmentos de dsARN codifican para 12 proteínas virales, de las cuales ocho tienen funciones estructurales.

Se tienen registrados 3 serotipos: tipo 1 Lang (T1L), tipo 2 Jones (T2J) y tipo 3 Dearing (T3D) y recientemente se ha aislado un cuarto serotipo putativo proveniente de ratones, llamado tipo 4 Ndelle (T4N) (Dermody et al., 2013). Los primeros tres serotipos están estrechamente relacionados con mamíferos y en sus genomas puede ocurrir la recombinación de fragmentos de dsARN (Estrada-Acosta et al., 2014; Tong et al., 2011). Las regiones más conservadas del genoma (entre el 90-98%) se encuentran en las regiones que codifican proteínas asociadas a la cápside para cada serotipo (Douville et al., 2008).

La replicación ocurre en el citoplasma del huésped dentro de cuerpos de inclusión viral (VIBs) (Dermody et al., 2013). El tamaño de su genoma es de aproximadamente 23,500 pares de bases (pb) (Dermody et al., 2013), el 75% del ARN está contenido en los 10 fragmentos principales del genoma, mientras que el 25% restante, son oligonucleótidos residuales de 2-20 pb, producto de procesos de transcripción abortiva.

Los ReoV son la principal causa de enfermedades diarreicas en neonatos (Giordano et al., 2005) y son ubicuos en su distribución geográfica (Dermody et al., 2013). Infectan a sus huéspedes a través de rutas fecal-oral y respiratorias. Las partículas virales entran al cuerpo por ingestión de comida, agua o aerosoles que contengan partículas virales e infectan las células epiteliales (Tong et al., 2011). Los ReoV son estables en el medio ambiente y pueden permanecer viables durante 1 año a 4-8°C (Berard y Coombs, 2009; McDaniels et al., 1983). En condiciones controladas usando agua destilada y agua residual se encontró que los ReoV y los Rotavirus pueden sobrevivir durante 30 días a 26°C (McDaniels et al., 1983). Los ReoV resisten temperaturas de hasta 55°C por periodos cortos de tiempo (McVey et al., 2013) y en condiciones de humedad de hasta 40% (Sattar et al., 1999). El serotipo tipo 3 de ReoV, ha demostrado una mayor resistencia a la exposición a radiación UV que los otros dos serotipos. En general, la resistencia está dada por la estructura del genoma (dsARN), siendo más resistentes que los enterovirus, los cuales poseen material genético de ARN de cadena sencilla (ssARN) (Adams et al., 1987). Se sabe

que la supervivencia de los ReoV y los enterovirus está estrechamente relacionada con el tamaño y el número de agregados virales, los cuales consisten en una aglomeración de partículas virales, que pueden unirse o separarse por cambios de pH, concentración salina y diferentes tipos de sales disueltas (Floyd et al., 1977), se han reportado agregados virales de hasta 1000 viriones (Floyd, 1979). Los ReoV pueden llegar a formar agregados virales con Poliovirus, sin embargo, estas asociaciones no alteran la prevalencia de los viriones (Floyd, 1979).

### **3.6 Riesgo sanitario en cuerpos de agua dulce de uso recreativo**

Uno de los principales tipos de contaminación en los cuerpos de agua de uso recreativo es la presencia de desechos humanos de tipo fecal, la cual tiene una carga alta de patógenos de tipo bacteriano y viral (Flores-Mejía et al., 2001). La presencia de estos contaminantes biológicos pone en riesgo la salud de los usuarios. Cuando los cuerpos de agua están contaminados, los usuarios quedan expuestos a bacterias y virus patógenos que pueden infectar la piel y si son ingeridos durante la actividad acuática, en concentraciones suficientes y condiciones de no inmunidad, pueden causar enfermedades gastrointestinales (como los virus entéricos y el virus de la Hepatitis A) (Venter et al., 2007), que se ven potenciadas en infantes de 0 a 9 años, adultos mayores y personas no inmunes (Panduro et al., 2011). Los modelos probabilísticos usados actualmente usan un volumen estándar de 100 mL como la cantidad media de agua consumida al realizar alguna actividad acuática, sin embargo, se sabe que la dosis de infección de los virus entéricos puede ser muy baja, como en el caso del VHA en el que solo son necesarios de 5 a 10 viriones para causar una infección (Venter et al., 2007).

#### **4 Los virus entéricos presentes en cuerpos de agua**

Existen cientos de estudios sobre detección de virus entéricos en cuerpos de agua, los cuales indican la presencia de estos en diversos rangos de concentraciones que van desde 1 partícula viral por litro de agua hasta la escala de cientos o miles por litro (Bofill-Mas et al., 2010; Johnson et al., 2011). Los rangos de concentración suelen ser sumamente variables debido a las características físicas, químicas y de exposición a contaminantes que cada cuerpo de agua presente. Por otro lado, la probabilidad de contraer una infección por el consumo de agua contaminada también tiene variables importantes que van más allá de la concentración, ya que debe tomarse en cuenta el tipo de virus (su persistencia en el ambiente) y el número de exposiciones que la población o los individuos tengan en un tiempo determinado (Estrada-Acosta et al., 2014; Ganesh y Lin, 2013). La presencia de patógenos virales en cuerpos de agua (principalmente en los destinados para consumo humano) es alarmante ya que cada día va creciendo la probabilidad de brotes virales en comunidades o regiones que dependen directamente de ciertos cuerpos de agua para abastecerse del recurso, generando condiciones insalubres que afecta directamente a la calidad de vida y la morbilidad de la población, especialmente a los infantes y los ancianos (Chigor y Okoh, 2012; Fong y Lipp, 2005).

Los Norovirus pertenecen al grupo de agentes infecciosos más prevalentes que se transmiten por el agua y que causan gastroenteritis a nivel mundial. Sus concentraciones en el ambiente acuático también son muy variables, por ejemplo, se han reportado concentraciones entre 4 a 4,900 Unidades detectables por PCR (UDP) por litro (L) en agua de ríos, en 896 a 7,499 UDP/L en aguas tratadas y en 5,111 a 850,000 UDP/L en aguas negras (Lodder y Husman, 2005). Esto es importante ya que concentraciones tan bajas como  $10^0$  a  $<10^4$  UDP de NoVs son suficientes para causar infección, en al menos dos tercios de individuos infectados (Lindesmith et al., 2003). Un estudio que realizó un metaanálisis con datos reportados en la literatura y datos no publicados obtenidos en Estados Unidos y Canadá, reportó que las concentraciones promedio de NoV GII en el influente de

las plantas de tratamiento fueron de  $3.9 \log^{10}$  copias del genoma (CG)/litro (L) a  $4.3 \log^{10}$  GC/L. Estas concentraciones fueron mayores a las reportadas para NoV GI de  $1.5 \log^{10}$  CG/L a  $2.4 \log^{10}$  CG/L, con amplias variaciones dependiendo de la planta de tratamiento (Pouillot et al., 2015). En muestras superficiales tomadas de un río de tipo urbano se han reportado concentraciones dentro del orden  $10^3$  copias por litro (D'Ugo et al., 2016). Con base en lo anterior, puede observarse que las concentraciones de NoV son muy variables en los ambientes acuáticos, sin embargo, éstos son frecuentes en cuerpos de agua que reciben contaminación fecal.

El virus de hepatitis A (HAV) está ampliamente distribuido a nivel mundial y se ha reportado frecuentemente en el ambiente acuático por periodos de tiempo prolongado (Ganesh y Lin, 2013). Es interesante resaltar que en México se ha reportado la presencia del genotipo I subtipo B del virus de Hepatitis A y de NoV GII en cuerpos de agua de uso recreativo y en aguas estuarinas del noroeste del estado de Sinaloa (Hernández-Morga et al., 2009; León-Félix et al., 2010). Los resultados indicaron que la calidad de las playas en Sinaloa se ve afectada por la contaminación fecal humana, causada por la actividad turística y las descargas de aguas residuales, concluyendo que se necesitan implementar programas de vigilancia viral para minimizar los riesgos para la salud de los bañistas.

## **5 Quintana Roo, polo turístico internacional**

La Península de Yucatán comprende un sistema acuífero cárstico de alta permeabilidad, cuyas principales formaciones de este proceso son conductos, cavearns y cenotes. Este acuífero representa para la región una actual y futura fuente de abastecimiento de agua dulce (Bauer-Gottwein et al., 2011). Por otro lado, el estado de Quintana Roo recibe anualmente en promedio 7 millones 96 mil 374 turistas nacionales e internacionales (INEGI, 2014). Las principales actividades recreativas están relacionadas directamente con el uso de cuerpos de agua (mar, cenotes y lagunas). Las características del acuífero (alta permeabilidad y fracturas

interconectadas) lo hacen vulnerable a las actividades antropogénicas (Bauer-Gottwein et al., 2011; Metcalfe et al., 2011; Lizardi-Jiménez, et al, 2014). Una de las zonas más vulnerables a la contaminación es la zona costera norte del estado de Quintana Roo, la cual está sujeta a un rápido desarrollo urbano, a un aumento en la densidad poblacional y al impacto de las actividades turísticas, lo que provoca un mayor uso del recurso hídrico, dando como resultado un incremento en la contaminación del acuífero. Lo anterior es preocupante ya que en general, la principal actividad que realizan los visitantes en la región es la recreación en diferentes cuerpos de agua como los cenotes y en la zona costera (Moncada, 2011).

### **5.1 Cobertura de agua potable y alcantarillado en el Estado de Quintana Roo.**

Hasta el 2015 el Estado de Quintana Roo hasta el año 2015 contaba con una cobertura de alcantarillado del 91.4% (aproximadamente 1, 371,648 de habitantes) y 86.8% de cobertura de agua potable (aproximadamente 1, 302,450 de habitantes), teniendo sin cobertura de alcantarillado un 8.6% (128, 472 habitantes, aproximadamente) y sin cobertura de agua potable 13.2% (197, 670 habitantes, aproximadamente), lo cual ubica a Quintana Roo en el rubro de alcantarillado, 0.4% sobre la media nacional (91.0%) y 3.2% bajo la media nacional en el rubro de cobertura de agua potable (92.4%). El estado cuenta con 33 plantas de tratamiento de aguas residuales, que aportan solamente el 61.9% de cobertura de saneamiento (media nacional 52.7%) (CONAGUA, 2015).

Los usuarios sin cobertura de drenaje y alcantarillado en el estado ven resuelto el problema de la descarga a través de fosas sépticas, que no garantizan el tratamiento adecuado de las aguas residuales, que pueden presentar filtraciones, dando como consecuencia la contaminación el acuífero por desechos humanos (CONAGUA, 2011). Sumado a lo anterior, en el estado existe también la problemática del fecalismo al aire libre (Beddows y Blanchon, 2002; Ulsía, 2012), además de las fallas por falta de mantenimiento a las alcantarillas y los drenajes clandestinos, los cuales son también fuentes importantes de contaminación del acuífero en la zona (Sansores et al., 2000). Las características del acuífero cárstico

que lo hacen vulnerable a los efectos de la contaminación y su intenso uso para actividades turísticas, resaltan la prioridad del monitoreo de la calidad del agua del acuífero para la detección oportuna, caracterización de contaminantes (biológicos y químicos), prevención y remediación de contaminación en los principales cuerpos de agua de uso recreativo y para consumo humano.

## 6 Técnicas de detección de virus entéricos en cuerpos de agua

Existen diversas metodologías utilizadas para la detección de VHA, NoV y ReoV en cuerpos de agua, en donde las principales variables que se consideran son el costo y la eficiencia de los métodos de concentración y extracción de partículas virales, lo cual implica distintas metodologías para la concentración de las partículas virales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Distintas metodologías empleadas en la detección de virus en ambientes acuáticos, HAVs, NV y ReoV.

<b>Virus</b>	<b>Métodos</b>	<b>Referencia</b>
<b>VHA y NoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtración de partículas virales en una membrana con carga (+)</li> <li>-Elusión de partículas en un buffer TGBE</li> <li>-Concentración de partículas virales por filtración centrifuga</li> <li>-Extracción de ARN viral</li> <li>-RT-PCR</li> </ul>	(Road y Nothe, 2011)

<b>VHA y NoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtración de partículas virales en una membrana de fibra de vidrio, con carga (+)</li> <li>-Concentración de partículas virales con Polietilenglicol (PEG)</li> <li>-Ultrafiltración de partículas</li> <li>- Extracción de ARN viral</li> <li>-RT-PCR</li> </ul>	(Bosch, 2011)
<b>VHA y NoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtración de partículas virales en una membrana de fibra de vidrio, con carga (+)</li> <li>-Floculación orgánica</li> <li>Concentración de partículas virales con Polietilenglicol (PEG)</li> <li>-Extracción de ARN viral</li> <li>-RT-PCR</li> </ul>	(Fout et al., 2015)
<b>VHA y NoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Absorción-elusión, filtro cargado (+ y -)(método EPA)</li> <li>-Floculación orgánica HCl y Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>-Extracción de ARN viral</li> <li>-RT-PCR</li> </ul>	(León-Félix et al., 2010)
<b>Enterovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtros HA de nitrocelulosa cargados (-)</li> <li>-Centripreps</li> <li>-Extracción de ARN viral</li> <li>-qPCR</li> </ul>	(Ikner, et al., 2012), (Katayama, et al., 2002)
<b>ReoV, Enterovirus, VHA y NoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtración (I-MDS Virosorb filter)</li> <li>-RT-PCR</li> </ul>	(Fout et al., 2003)
<b>ReoV y Enterovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Filtro de polipropileno</li> <li>-filtración tangencial con polisulfuro</li> <li>-Elusión 3% extracto de ternera</li> </ul>	(Muscillo et al., 1997)
<b>ReoV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Absorción-Elusión (NanoCeram filters)</li> <li>-Floculación orgánica</li> <li>-Cultivo celular BGM</li> <li>-Confirmación por PCR</li> </ul>	(Betancourt, 2014)



## **6.1 Ultrafiltración tangencial**

La ultrafiltración ofrece importantes ventajas sobre otros sistemas de filtración mediante la concentración simultánea de parásitos, virus y bacterias por exclusión de tamaño. Las moléculas más pequeñas que el tamaño de poro del filtro pasan a través de la membrana y salen del sistema, mientras que las partículas más grandes se concentran en el retenido. El patrón de circulación de flujo transversal con recirculación del retenido reduce la saturación de la membrana y hace que sea posible filtrar grandes volúmenes de agua (Morales-Morales et al., 2003). Los sistemas de filtrado con carga, ya sean de fibra de vidrio, papel o algún polímero plástico, han demostrado ser una herramienta eficiente, con un buen porcentaje de recuperación, en conjunto con la floculación orgánica a pH ácido o bien, utilizando NaCl y Polietilenglicol para concentrar partículas virales.

Para concentrar y detectar diversos virus entéricos a partir de muestras de agua, en México se han utilizado filtros con carga negativa y floculación orgánica de partículas virales en pH ácido, técnicas moleculares como extracción de ARN, RT-PCR, ligación, clonación con células competentes y secuenciación para la confirmación de las especies virales (León-Félix et al., 2010; Mazari-Hiriart et al., 2014; Arredondo-Hernández et al., 2017; Rosiles-González et al., 2017).

## **6.2 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)**

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una técnica más sensible y robusta que la PCR punto final, de la cual se derivó. La qPCR es al menos 100 veces más sensible que la detección del punto final. Una comparación de qPCR con la PCR punto final convencional muestra que la qPCR es menos propensa a la contaminación, más fácil de implementar, requiere menos tiempo, tiene un alto rendimiento y es cuantitativa, lo que ha permitido que la técnica haya adquirido diversas aplicaciones en el campo de la biología (Biassoni y Walker, 2014). La

técnica de qPCR consiste en la amplificación del material genético en un proceso de PCR con marcadores luminiscentes, que son activados al realizarse la amplificación de un nuevo fragmento de ADN, los cuales son detectados en tiempo real por un espectrofotómetro que calcula la concentración de ADN según la intensidad de la señal luminosa. Sus principales aplicaciones son la cuantificación de fragmentos amplificados para la detección de partículas virales que causan enfermedades infecciosas (Stock y Rodríguez, 2006), genotipificación, identificación de mutaciones y cuantificación relativa de ADN (Biassoni y Walker, 2014). Esta técnica ha sido utilizada en todo el mundo para la cuantificación de partículas virales en cuerpos de agua, utilizando regiones altamente conservadas, por ejemplo, para detectar NoV y VHA, se amplifican regiones conservadas de la cápside (Eydal, 2009; Hamilton y Jiang, 2015).

### **6.3 Modelos de predicción de riesgo**

La predicción de riesgo de infección por partículas virales se lleva a cabo ajustando los datos básicos (especie viral, metodología de filtración y qPCR, método de desinfección empleado, pruebas de dosis respuesta y tasa de infección promedio), a un modelo probabilístico que en base a los datos básicos mencionados, determine de manera aproximada el posible riesgo de infección por la exposición a agua contaminada en dosis específicas (Gerba, 1996; Payment y Morin, 1990; Ward et al., 1986). Para estimar las predicciones de los riesgos para la salud que representan los virus entéricos en los ambientes acuáticos, generalmente se calcula la probabilidad estimada de contraer una infección en un día ( $P_{inf/día}$ ) utilizando un modelo exponencial (Venter et al., 2007). Los parámetros utilizados en este modelo para estimar los posibles riesgos a la salud que se utilizan son: la concentración de cada virus en el agua, la tasa de recuperación de al menos el 40% (Hill et al., 2005), la reducción por el tratamiento (0 debido a que el agua superficial no lleva un tratamiento), el ID50 (100 personas) (Masago et al., 2006); además de una variable de dosis respuesta, el volumen de agua consumida debido a actividades recreativas (0.1 L de acuerdo a un modelo conservador), el parámetro de dosis-respuesta

particular, el radio de infectividad de cada especie viral y la fracción de partículas virales viables, considerando a todas las partículas detectadas como partículas virales viables, dando como resultado la siguiente ecuación:  $P_{inf} día^{-1} = 1 - \exp(-rN)$  (Venter, 2007).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la ocurrencia y diversidad de norovirus, virus de hepatitis A y reovirus en cuerpos de agua del norte de Quintana Roo y predecir los riesgos para la salud.

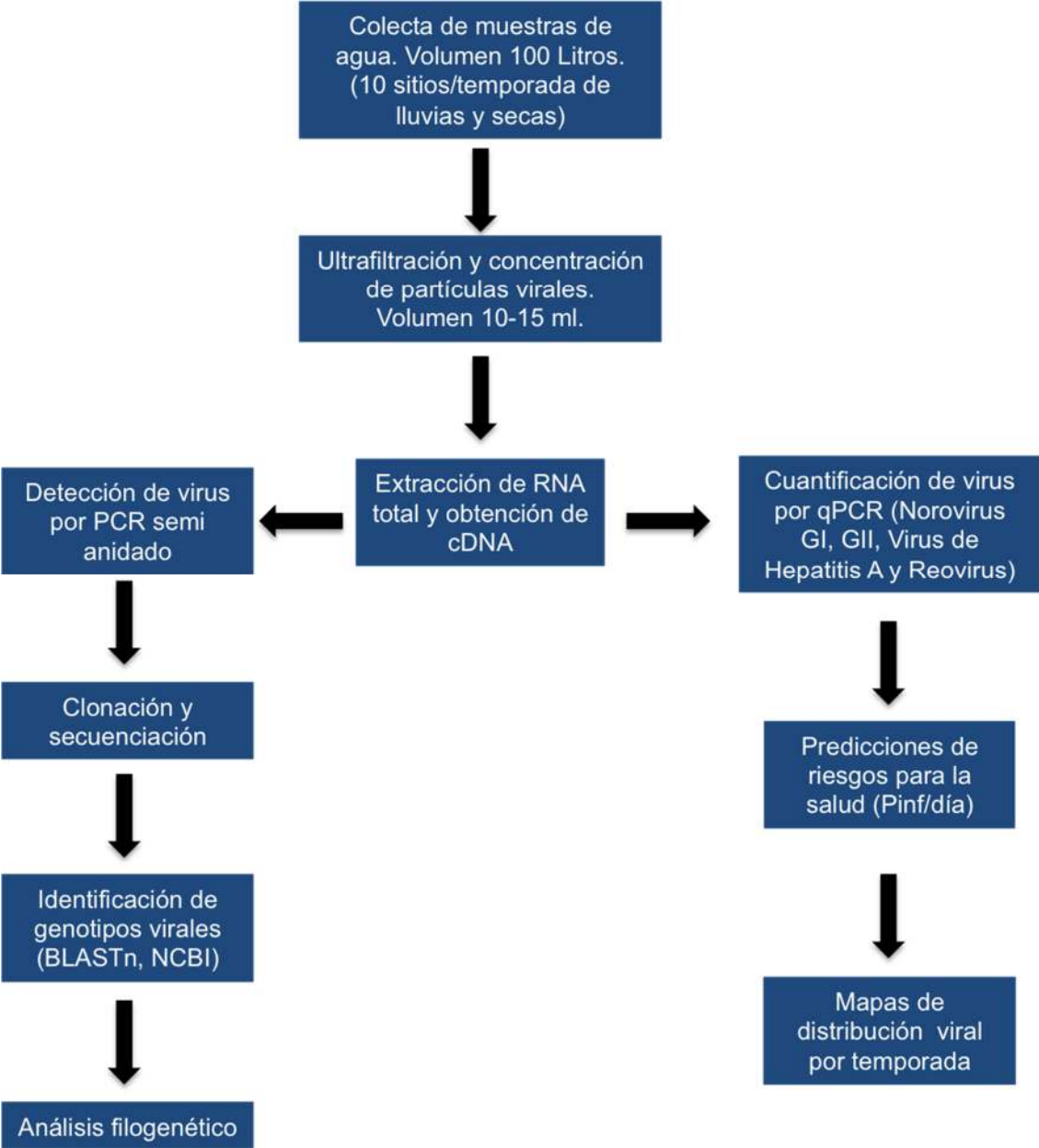
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Detectar y cuantificar en 10 muestras de agua de 10 cenotes a los virus entéricos (norovirus genogrupo I (GI) y II (GII), virus de Hepatitis A y Reovirus) durante dos temporadas climáticas en un ciclo anual.
- Identificar los genotipos virales predominantes de cada sitio durante la temporada de lluvias y de secas.
- Realizar la reconstrucción filogenética de los genotipos virales identificados.
- Determinar si los parámetros fisicoquímicos del agua afectan la distribución de los genotipos virales.
- Determinar la distribución de los genogrupos virales en el sistema acuífero del norte de Quintana Roo.
- Predecir los riesgos potenciales para la salud en diferentes áreas recreativas en la región con base en la concentración de los genotipos virales detectados.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para determinar la ocurrencia de los virus entéricos en los cuerpos de agua bajo estudio, el volumen de las muestras se reducirá para hacer posible la concentración de las partículas virales y la posterior detección por técnicas moleculares. Para ello se realizará la ultrafiltración y la concentración de las muestras y posteriormente se extraerá el ARN total, el cual será retrotranscrito y amplificado con cebadores específicos para Norovirus, Virus de Hepatitis A y Reovirus. El cDNA obtenido se utilizará para realizar la detección de los virus por PCR punto final semi anidado. Los amplicones del tamaño esperado serán ligados en un vector de clonación el cual se utilizará para transformar células competentes de *E. coli*. Las colonias recombinantes serán seleccionadas para obtener los plásmidos que serán enviados a secuenciar. Para realizar la identificación de los genotipos virales se utilizarán las secuencias obtenidas las cuales serán analizadas mediante BLASTn utilizando las bases de datos del NCBI. Para determinar las concentraciones virales se utilizará PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) utilizando cebadores y sondas específicas para cada grupo de virus. Las concentraciones se expresarán en copias del genoma viral por litro de agua. Las concentraciones virales obtenidas se utilizarán para aplicar modelos matemáticos de carácter epidemiológico para analizar el riesgo de infección viral por consumo, según las características del sitio y la carga viral presente. Además, se realizarán mapas de distribución de los genotipos virales y se determinará si existe una correlación entre los parámetros físico-químicos de los cuerpos de agua y las concentraciones virales. El esquema de la estrategia experimental se muestra a continuación en la **figura 4**.

Figura 4 Estrategia experimental.



## **CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS EN CUERPOS DE AGUA DEL NORTE DE QUINTANA ROO**

### **INTRODUCCIÓN**

La presencia de virus en el agua se ha estudiado desde mediados de los años 70's alrededor del mundo. Actualmente se conocen las características específicas para algunas de las especies virales que causan mayor número de infecciones anualmente en todo el mundo como los Hepatovirus, Reovirus y Norovirus, facilitando su detección en ambientes acuáticos (Lu et al., 2015). Los virus entéricos causan millones de infecciones anualmente debido a su prevalencia en cuerpos de agua que son utilizados para consumo humano, para actividades recreativas y en los cuerpos de agua que reciben efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (OMS 2014). El agua contaminada con microorganismos patógenos representa un problema a nivel mundial. En concentraciones bajas los virus entéricos pueden causar infecciones gastrointestinales agudas. Debido a que los virus entéricos pueden persistir en los ambientes acuáticos, éstos se han propuesto como indicadores para determinar la calidad del agua en ambientes donde las bacterias no prevalecen, por ejemplo, en los medios salobres (D'Ugo et al., 2016).

Los virus entéricos se han detectado en diferentes tipos de cuerpos de agua alrededor del mundo. En el caso de los NoV GI y GII, se han detectado en concentraciones de  $10^2$  hasta  $10^6$  genomas virales/litro, en Francia (Hennechart-Collette, 2014), mientras que en el caso del VHA se han encontrado en concentraciones de  $10^0$  hasta  $10^2$  genomas virales/litro en muestras de lechugas y de agua en la Unión Europea (Coudray-Meunier, 2015). Por otro lado los ReoV se han detectado en muestras de agua en hasta 1, 247 UFP/litro en efluentes de aguas residuales en Estados Unidos (Betancourt, 2016).

Se han empleado un gran número de metodologías para la detección y cuantificación de estos virus en diferentes ambientes acuáticos. Las diferencias en las metodologías empleadas se relacionan con el origen de la muestra y con

factores como: dilución, salinidad, materia orgánica suspendida, pH y presencia de surfactantes y detergentes en el caso de las plantas de tratamiento. Para la detección de NoV, VHA y ReoV en agua subterránea, existen variantes importantes en la fase de concentración, la cual se basa en diferentes sistemas de filtración a partir de los cuales se recupera un porcentaje considerable de la carga viral, de entre el 30% y 40%, (León-Félix et al., 2010; Fout et al., 2015; Venter et al., 2007). Posteriormente se optimizan las reacciones de amplificación para punto final (en el caso de detección) y qPCR para cuantificar el número aproximado de partículas virales por litro, tomando en cuenta el porcentaje de recuperación del filtro y los diversos cambios de volumen en el proceso de concentración, para tomar cada copia de ADN resultante como un virión. La detección y cuantificación ofrecen en conjunto un panorama más amplio sobre la calidad del agua, esto, complementado con un modelo de análisis de riesgo epidemiológico, permite la toma de decisiones importantes con respecto a las prácticas y uso del cuerpo de agua o efluente (Espinosa et al., 2009).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Detectar y cuantificar a los norovirus, virus de hepatitis A y reovirus en cuerpos de agua del norte de Quintana Roo.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar la presencia y la concentración de VHA, NoV y ReoV en diez cuerpos de agua de norte de Quintana Roo durante la temporada de lluvias y de secas.
- Identificar los genotipos virales predominantes y obtener sus patrones de distribución.
- Obtener la reconstrucción filogenética de los genogrupos virales identificados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Área de Estudio

Se seleccionaron los siguientes cuerpos de agua ubicados en el norte de Quintana Roo (**Tabla 2**):

- 1) Dolinas de agua dulce de uso recreativo. Cinco cenotes ubicados en la ruta de cenotes de Puerto Morelos.
- 2) Dolinas de agua dulce de tipo urbano. Tres cenotes dentro de la ciudad de Cancún.
- 3) Dolina de agua dulce de tipo rural. Un cenote en la localidad de Leona Vicario a la orilla de la carretera.
- 4) Agua salobre de tipo urbano: Río Nizuc y Malecón Tajamar.

Además, se utilizaron dos muestras de efluentes de las plantas de tratamiento de la ciudad de Tucson, Arizona y de la localidad de Akumal como muestras para realizar la amplificación de los virus entéricos bajo estudio. Cada sitio fue considerado como una muestra, por lo tanto, se colectaron 10 muestras de agua en dos temporadas; lluvias (agosto-octubre de 2015) y secas (febrero-mayo 2016) dentro de un ciclo anual, más las dos muestras del efluente, representando un total de 22 muestras.



**Tabla 2** Sitios de muestreo clasificados por tipo de ambiente (sistema lagunar-salobre, cenote-agua dulce y efluente de agua residual tratada), en el estado de Quintana Roo.

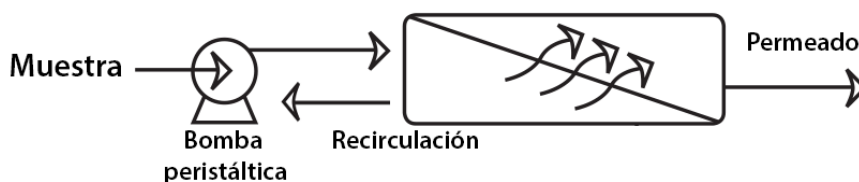
Ubicación	Sitio	Tipo de ambiente
Cancún	RV 1	Cenotes en zona urbana (Agua dulce)
	R96 2	
Leona Vicario	LV 3	Cenote rural (Agua dulce)
Puerto Morelos	PV 4	Cenotes para uso recreativo (Agua dulce)
	LN 5	
	VL 6	
	7B 7	
	LM 8	
Cancún	RN 9	Sistema lagunar (Agua salobre)
	MT 10	
Akumal	PBP	Efluente agua residual tratada en Akumal
Tucson	TZ	Efluente agua residual tratada en Tucson

## 2. Colecta de Muestras de Agua y Extracción de ARN total

Se colectaron 100 L de agua por sitio, utilizando contenedores de plástico de 10 litros a una profundidad aproximada de 30 cm de la superficie. Las muestras fueron transportadas al laboratorio (en hielo) y almacenadas a 4° C. En cada sitio de colecta se tomaron los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH, conductividad y sólidos disueltos totales utilizando una sonda multi-paramétrica YSI 600 QS. Todas las muestras fueron procesadas el mismo día de la colecta.

Las muestras de agua fueron ultrafiltradas de acuerdo al protocolo descrito por Hernández Morga, 2007 y Hill et al., 2005. De manera general, las muestras fueron tratadas con 0.01% de polifosfato de sodio y filtradas utilizando un cartucho de ultrafiltración (Fresenius hemoflow F804 polisulfone diálisis 15 000-20 000 MWCOs), el cual fue previamente bloqueado mediante la adición de una solución de retro lavado (0.01% de polifosfato de sodio). La muestra de agua fue re-circulada a través del sistema de filtración (Hernández-Morga et al., 2008) a una velocidad de 1700 mL/min y con una presión de 5-10 psi durante 10 minutos.

La muestra concentrada fue removida y al sistema de filtrado se le adicionaron 150 mL de Tween 80 al 1% como solución de elución con 0.001% de anti espuma A, ambos fueron recirculados por el filtro durante 10 minutos para lavar el ultrafiltrado. Posteriormente, se concentró la muestra de 950-1000 mL, rescatando aproximadamente 100 mL de cada contenedor de 10 L más la solución de elución (50 mL), se mezcló para obtener un retentado final de 900-1000 mL aproximadamente. Las muestras de los efluentes de las plantas de tratamiento fueron procesadas de acuerdo a Schmitz et al., 2016.



**Figura 5.** Esquema del Sistema de ultrafiltración tangencial: La muestra es impulsada por una bomba peristáltica a un flujo constante, entra al filtro ejerciendo presión en las paredes de la membrana, el agua filtrada saldrá como permeado, el concentrado será recirculado hasta eliminar aproximadamente el 99% del volumen total de la muestra, concentrando las partículas virales de la muestra en un volumen de 850-1000 mL.

Se realizó la precipitación de las partículas virales utilizando polietilenglicol (PEG, 8000) al 12% y 0.8 mol/L de cloruro de sodio (NaCl) durante toda la noche a 4° C. Las pastillas que contenían las partículas virales fueron recuperadas mediante

centrifugación a 10,000 rpm, durante 30 minutos a 4° C y se re-suspendieron en 5 mL de una solución salina en buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente se agregó a la pastilla un volumen igual de butanol-cloroformo (1:1) y la muestra se centrifugó a 7500 rpm por 15 min a 4° C. Se rescató la fase acuosa y se centrifugó en un filtro de centrifugación Centriprep a 2500 rpm durante 10 minutos, se descartó el contenido de la columna central y se realizó una segunda centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se separaron en alícuotas el concentrado final y se midió el volumen final. El concentrado se conservó a 4° centígrados.

Para la detección de los virus entéricos el ARN viral fue extraído utilizando el kit QIAmp viral ARN mini kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron almacenados a -20 °C. Se obtuvieron extractos de DNA/ARN del efluente de una planta de tratamiento donados por el laboratorio del Dr. Charles P. Gerba del departamento de suelo, agua y ciencias ambientales de la Universidad de Arizona. Esta muestra fue extraída con el kit All Prep DNA/ARN Mini Kit (QIAGEN).

### **3. Cuantificación por PCR tiempo real (qPCR)**

A partir del ARN total extraído de cada muestra de agua, se obtuvo el cDNA usando el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System Platinum™ (Promega), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Con apoyo del personal del laboratorio de biología molecular de la UCIA-CICY, se realizó una curva estándar para NoV GI y GII, utilizando diluciones de plásmidos conteniendo los insertos de interés con concentraciones conocidas de 10<sup>1</sup> hasta 10<sup>5</sup> copias de genoma. Los Norovirus GI y GII, VHA y ReoV, fueron amplificados con los primers y sondas TaqMan reportados previamente en la literatura (**Tabla 3**). Los programas reportados previamente en la literatura utilizados para qPCR se encuentran descritos en la **Tabla 4**. Se utilizó el equipo Light Cycler 480 (Roche) y el StepOnePlus Real Time PCR System (ThermoFisher), para realizar los PCRs cuantitativos. Se utilizaron los kits LightCycler 480 Probes Master (Roche) para cuantificar las muestras de la

temporada de lluvias y la enzima Taq Platinum DNA polimerasa (ThermoFisher Scientific) para cuantificar las muestras de la temporada de secas. En cada caso se utilizaron 2.5 µl de cDNA como templado y se siguieron las instrucciones de los proveedores para preparar los mix de reacción. En todos los casos se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas. Los plásmidos utilizados para las curvas estándar fueron donados por el laboratorio del Dr. Charles P. Gerba de la Universidad de Arizona.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en la amplificación por qPCR para Norovirus GI y GII; VHA y ReoV.

	<b>Cebador y Sonda</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del producto</b>	<b>Referencia</b>
<i>NoV GI</i>	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	85	(Kageyama et al., 2003)
	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC		
	RING1(a)-TP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-BHQ1		
<i>NoV GII</i>	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	98	(Kageyama et al., 2003)
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATT CACA		
	RING2-TP	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1		
<i>VHA</i>	HAV-F	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	89	(Jothikumar et al., 2005)
	HAV-R	AACAACCTACCAATATCCGC		
	HAV-TP	FAM-CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC-BHQ1		
<i>ReoV</i>	T3D-F	CTACCGCTGTACCATCGTTAAGCT	58	(Gallagher y Margolin, 2007)
	T3D-R	TGGTACCCCTCCGGGATT		
	T3D-TP	FAM-ATCACCTGGAATGCT-BHQ1		

**Tabla 4.** Programa de qPCR para Norovirus GI y GII; VHA y ReoV.

<b>Virus</b>	<b>Método utilizado</b>	<b>Programa qPCR</b>
<i>NV GI</i>	(Kageyama et al. 2003)	95°C – 2 minutos – x1 ciclo  95°C – 30 segundos – x45 ciclos  56°C – 30 segundos  72°C – 30 segundos  4°C - ∞
<i>NV GII</i>	(Kageyama et al. 2003)	95°C – 2 minutos – x1 ciclo  95°C – 30 segundos – x45 ciclos  56°C – 30 segundos  72°C – 30 segundos  4°C - ∞
<i>VHA</i>	(Jothikumar et al. 2005)	95°C – 15 segundos – x1 ciclo  95°C – 30 segundos – x40 ciclos  56°C – 15 segundos  68°C – 2 minutos  4°C - ∞
<i>ReoV</i>	(Gallagher & Margolin, 2007)	95°C – 10 minutos  94°C – 20 segundos – x50 ciclos  55°C – 1 minuto  72°C – 30 segundos  4°C - ∞

Para la cuantificación del número de copias del genoma por volumen de agua (litro), se utilizaron los valores promedio de Ct obtenidos en qPCR para cada especie viral en cada sitio, en conjunto con los datos de la ordenada (Or) y la pendiente (m) dadas por la curva obtenida para cada muestra. La resta de Ct y Or entre el valor de m, da como cociente el exponente (Exp) (**Ecuación 1**) el cual al elevar  $10^{Exp}$  dará como resultado el número de copias obtenidas (

**Ecuación 2**). El número neto de copias por unidad de volumen (copias  $L^{-1}$ ) se obtiene aplicando factores de concentración para cada paso de concentración de la muestra donde existió una reducción de volumen, a esto se le denomina factor volumétrico (

**Ecuación 3**). Los cálculos y el análisis de datos se realizaron con el personal del laboratorio de biología molecular de la Unidad de Ciencias del Agua del UCIA-CICY...

**Tabla 5.** Ecuaciones utilizadas para el cálculo de Pinf/día.

**Ecuación 1** 
$$Exp = \frac{Ct - Or}{m}$$

**Ecuación 2** 
$$Copias = 10^{Exp}$$

**Ecuación 3** 
$$Copias L^{-1} = \left[ Copias \left( \frac{1}{V_{pcr}} \right) \left( \frac{V_{fe}}{V_{ie}} \right) \left( \frac{V_{cen}}{V_{fpeg}} \right) \left( \frac{V_{fpeg}}{V_{ipeg}} \right) \left( \frac{V_f}{V_i} \right) \right]$$

Copias: número de copias obtenidas por qPCR (ecuación 2).

$V_{\text{pcr}}$  = Volumen utilizado en la reacción de qPCR ( $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{fe}}$  = Volumen final en la extracción de ARN ( $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{ie}}$  = Volumen inicial empleado para la extracción de ARN ( $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{cen}}$  = Volumen obtenido en la concentración con Centipreps ( $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{fpeg}}$  = Volumen final obtenido de la concentración con PEG (mL)

$V_{\text{ipeg}}$  = Volumen inicial empleado en la concentración con PEG (mL)

$V_{\text{f}}$  = Volumen final obtenido de la ultrafiltración (mL)

$V_{\text{i}}$  = Volumen inicial de la muestra (L)

#### 4. Detección por PCR punto final y clonación

A partir del ARN total extraído de cada muestra de agua, se obtuvo el cDNA usando el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System Platinum™ (Promega) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los genogrupos virales GI y GII de NoV fueron amplificados mediante RT-PCR anidado (**Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8**). Los NoV GI fueron amplificados mediante RT-PCR y PCR semi-anidado, utilizando primero los cebadores degenerados NKI-F/NKI-R para producir un fragmento de 276 pares de bases (pb). Posteriormente, se realizó un PCR semi-anidado utilizando los cebadores NKI-F2/NKI-R que amplifican un fragmento de 269 pb (Kong et al., 2015). Los NoV GII fueron amplificados mediante RT-PCR y PCR semi-anidado, utilizando primero los cebadores degenerados NKII-F/NKII-R para producir un fragmento de 256 pares de bases (pb). Posteriormente, se realizó un PCR semi-anidado utilizando los cebadores NKII-F/NKII-R que amplifican un fragmento de 235 pb (Kong et al., 2015). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las reportadas en Kong et al. (2015). La amplificación del HAV se realizó mediante RT-

PCR y PCR anidado siguiendo un protocolo descrito por Robertson et al., (1992) en el cual se amplificó primero un fragmento de 267 pb con los cebadores 2994(+) y 3192(-) y posteriormente se realizó el PCR anidado con los cebadores dKA24 y dKA25 que amplifican un fragmento de 200 pb (Kingsley y Richards, 2001).

**Tabla 6.** Cebadores utilizados en la amplificación por PCR y PCR semi-anidado, para Norovirus y Virus de la Hepatitis A.

	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Región amplificada</b>	<b>Referencia</b>
<b>Norovirus GI</b>	NKI-F	GTAAATGATGATGGCGTCTAA	Interfaz ORF1/ORF2	(Kong et al., 2015)
	NKI-R	ACCCADCCATTRTACATYTG		
	NKI-F2	GATGGCGTCTAAGGACGC		
<b>Norovirus GII</b>	NKII-F	CTYAGGCARATGTACTGGACY	Interfaz ORF1/ORF2	
	NKII-R	TCGACGCCATCTTCATTCAC		
	NKII-R2	GGAGCCAGATTGCGATCGC		
<b>Hepatitis A</b>	2994-F	TATTTGTCTGRCACAGAACAAT CAG	Interfaz VP1/VP2	(Kingsley y Richards, 2001)
	3192-R	AGGAGGAGGTGGAAGCACTT CATTGA		
	dKA24-F	CTTCCTGAGCATACTTGAGTC	Interfaz VP1/VP2	
	dKA25-R	CCAGAGCTCCATTGAACTC		



**Tabla 7.** Programa de PCR para amplificar Norovirus GI, GII y Virus de la Hepatitis A. Las temperaturas de alineación de los cebadores se encuentran resaltadas en negritas.

	<b>Cebadores</b>	<b>Programa PCR</b>
<b>NoV GI</b>	NKI-F/NKI-R	1 ciclo 94°C – 2 minutos 40 ciclos 94°C – 30 segundos <b>51°C</b> – 1 minuto 68°C – 2 minutos 1 ciclo 68°C – 7 minutos 4°C - ∞
<b>NoV GII</b>	NKII-F/NKII-R	1 ciclo 94°C – 2 minutos 40 ciclos 94°C – 30 segundos <b>55°C</b> – 1 minuto 68°C – 2 minutos 1 ciclo 68°C – 7 minutos 4°C - ∞

<b>VHA</b>	2994-F/3192-R	1 ciclo 94°C – 2 minutos 40 ciclos 94°C – 30 segundos <b>60°C</b> – 1 minuto 68°C – 2 minutos 1 ciclo 68°C – 7 minutos 4°C - ∞
------------	---------------	--

**Tabla 8.** Programa PCR semianidado para norovirus GI, GII y HAV. Las temperaturas de alineación de los cebadores se encuentran resaltadas en negritas.

	<b>Cebadores</b>	<b>Programa PCR semi-anidado</b>
<b>NoV GI</b>	NKI-F2/NKI-R	1 ciclo 94°C – 2 minutos 35 ciclos 94°C – 20 segundos <b>51°C</b> – 10 segundos 72°C – 20 segundos 1 ciclo 72°C – 5 minutos 4°C - ∞
<b>NoV GII</b>	NKII-F/NKII-R2	1 ciclo

		94°C – 2 minutos 35 ciclos 94°C – 20 segundos <b>55°C</b> – 10 segundos 72°C – 20 segundos 1 ciclo 72°C – 5 minutos 4°C - ∞
<b>VHA</b>	dKA24/dKA25	1 ciclo 94°C – 2 minutos 35 ciclos 94°C – 30 segundos <b>55°C</b> – 1 minuto 68°C – 2 minutos 1 ciclo 68°C – 5 minutos 4°C - ∞

Posterior a la amplificación por PCR semi-anidado los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% P/V (Agarosa/TAE 1X) teñido con bromuro de etidio (concentración final de 0.5 µg/mL) mediante la técnica de electroforesis. Como referencia de tamaño se utilizó un marcador de peso molecular PROMEGA © de ADN de 1 Kb para NoV y de 250 pb para VHA.

Las bandas del tamaño esperado (269 para NoV GI, 235 para NoV GII y 200 pb para VHA) fueron eluidas con el kit de elución Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y ligadas utilizando el vector pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por el método de choque térmico (Dong et al., 2012). Se inocularon cajas con medio LB sólido/Ampicilina (100mg/mL) y X-gal (30 $\mu$ L) con las bacterias recombinantes y se incubaron durante aproximadamente 12 h a 37°C. Las clonas recombinantes fueron seleccionadas (5-15 clonas recombinantes por muestra) para la extracción del ADN plasmídico. La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para confirmar la presencia de los insertos de interés se tomaron 3  $\mu$ L de ADN plasmídico para su digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Las digestiones fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% P/V (Agarosa/TAE 1X) teñido con bromuro de etidio. Las muestras que presentaron la banda esperada para el inserto de interés (entre 300 y 250 pb) fueron seleccionadas para ser secuenciadas. Para la secuenciación, se diluyeron 0.5  $\mu$ L de ADN plasmídico en 4.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se agregaron 5  $\mu$ L del cebador M13 [20 pmolar], las muestras se mantuvieron a -4°C y fueron enviadas a Macrogen Korea para su secuenciación.

## **5. Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron editadas para remover el vector, utilizando el software Finch TV y se realizó la comparación de la secuencia con la base de datos de NCBI (BLAST) para determinar el porcentaje de identidad de nucleótidos e identificar las especies virales presentes en cada sitio. Se tomaron los diez primeros hit de cada secuencia para construir una base de datos en formato fasta, incluyendo 41 secuencias de NoV GI, 64 de NoV GII y 38 de VHA que fue utilizada para análisis de identidad por pares mediante el programa SDT (Muhire et al., 2014) y la reconstrucción filogenética con el programa MEGA 7.0 (Kumar, et al., 2016).

## **6. Reconstrucción filogenética**

Las secuencias editadas fueron utilizadas para realizar un alineamiento utilizando el algoritmo MUSCLE implementado en el programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), para obtener una matriz que fue utilizada para realizar la construcción filogenética. Se utilizó la técnica del vecino más cercano con 1000 repeticiones de Bootstrap para la reconstrucción de los árboles filogenéticos para NoV GI (10 secuencias de ambientales y 31 de referencia), GII (51 secuencias ambientales, 13 secuencias de referencia) y VHA (27 secuencias ambientales y 11 secuencias de referencia).

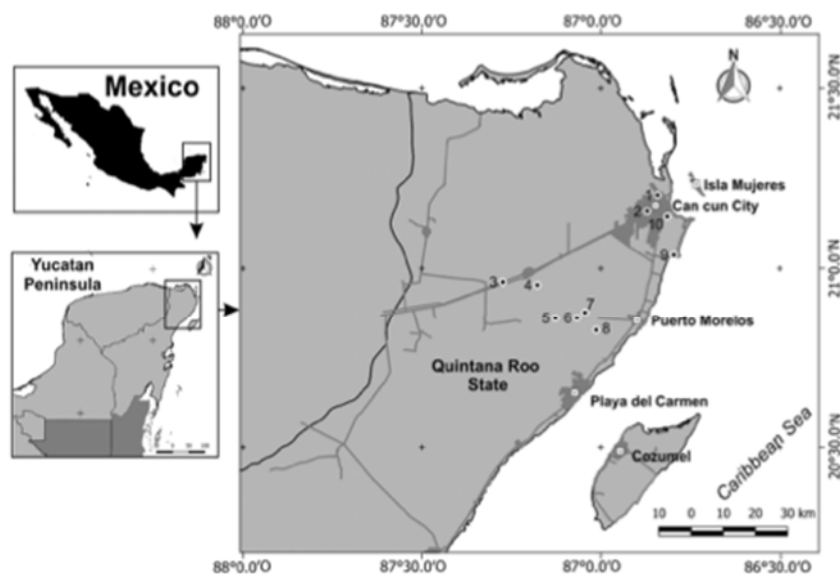
## **7. Análisis de diversidad genética**

El análisis de diversidad genética fue realizado con el software SDTV1.2, en donde se ingresaron todas las secuencias alineadas utilizadas para construir el árbol filogenético y las secuencias analizadas para NoV GII en PBP. El análisis de diversidad proyectará a modo de matriz de comparación, nucleótido por nucleótido, indicando que tan diversas son las secuencias encontradas entre sí, utilizando un código de colores que indica el porcentaje de similitud entre cada secuencia.

# **RESULTADOS**

## **1. Procesamiento de muestras de agua**

Con apoyo del personal del laboratorio de biología molecular del la UCIA-CICY se colectaron en total 20 muestras de agua de los 10 sitios de estudio, cada una con un volumen aproximado de 100 litros, durante la temporada de lluvias y de secas (Figura 6).



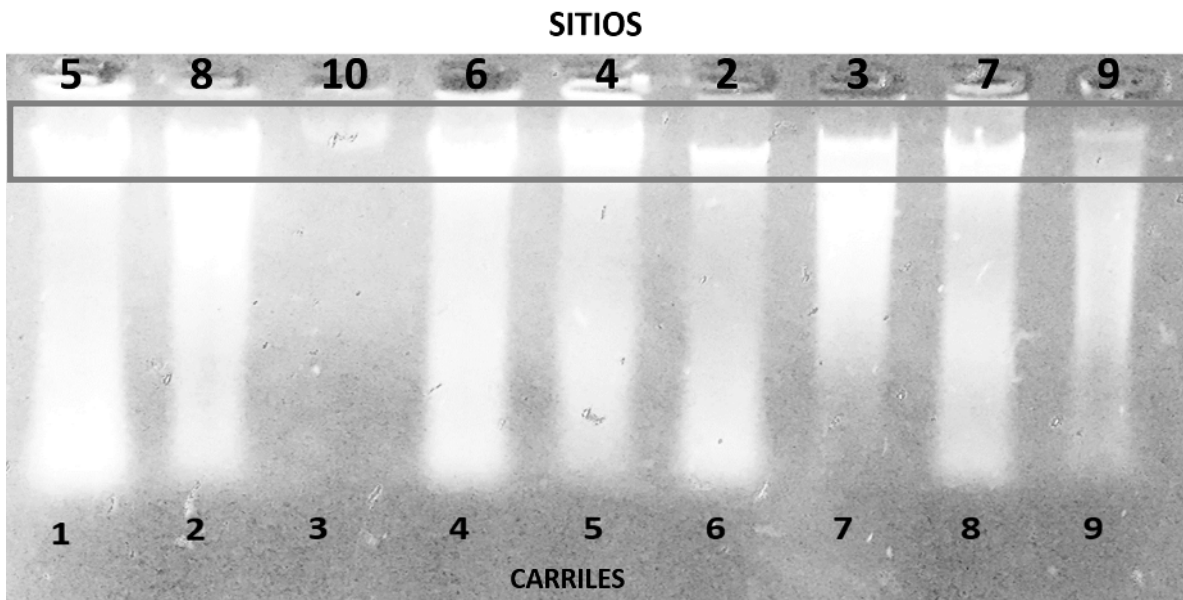
**Figura 6.** Mapa mostrando la ubicación de las localidades de colecta (sitios descritos en la tabla 2) (Tomado de Rosiles-González et al., 2017).

Como producto de la ultrafiltración tangencial, se obtuvieron concentrados de las muestras de 900 mL hasta 1000 mL. Se agregó la proporción correspondiente de PEG y NaCl a cada muestra, según el volumen final obtenido como se describe en la metodología. El volumen final obtenido después de la centrifugación con Centripreps® (ver materiales y métodos) fue de un rango de entre 5.8 mL hasta 15.4 mL de concentrado final por muestra (**Tabla 8**).

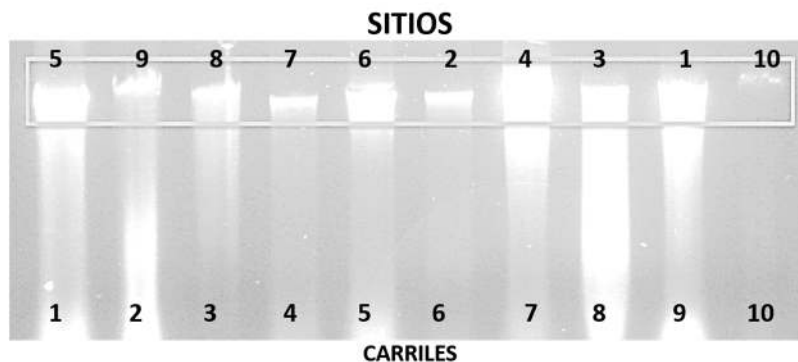
**Tabla 9.** Rango de los volúmenes obtenidos después de cada proceso de concentración de partículas virales. Las muestras fueron concentradas de 100 litros hasta 5-15 mL aproximadamente.

<b>Volumen inicial de muestra</b>	<b>1era Concentración: Ultrafiltración</b>	<b>2da Concentración: PEG-NaCl</b>	<b>3era Concentración: Centripreps</b>
<b>100 litros</b>	850-950 mL	15-20 mL	5.8 – 15.4 mL

Para la extracción de ARN se utilizaron 280  $\mu$ L del concentrado obtenido. El ARN total fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, teñido con 2.5 $\mu$ L de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/mL (**Figuras 7 y 8**).



**Figura 7.** ARN total extraído en temporada de lluvias, de los sitios de muestreo. En el recuadro se observa el ARN total, compuesto por diferentes tipos, como: mARN, rARN, tARN, siARN y miARN.



**Figura 8.** ARN total extraído en temporada de secas, de los sitios de muestreo. En el recuadro se observa el ARN total compuesto por diferentes tipos, como: mARN, rARN, tARN, siARN y miARN.

Se obtuvieron en total 20 muestras de ARN total, (compuesto por mARN, rARN, tARN, siARN y miARN) correspondientes a los 10 sitios de colecta durante la temporada de lluvias y de secas (**Figura 7 y 8**). El ARN obtenido fue retrotranscrito como se menciona en la metodología para obtener el cDNA correspondiente para cada muestra.

## 2. Cuantificación viral por qPCR

A partir del cDNA obtenido se realizaron las cuantificaciones por qPCR. Se obtuvieron valores de Ct para cada sitio a los cuales se aplicó el factor de corrección volumétrica, dando como resultado valores en unidades de concentración (Copias de genoma L<sup>-1</sup>) (**Tabla 10**).

Se cuantificaron NoV GI en el 50% de sitios durante la temporada de lluvias y en ningún sitio en la temporada de secas (tres muestras estuvieron bajo el límite de cuantificación). La mayor concentración de NoV GI se detectó durante la temporada de lluvias en el sitio 1, un cenote de agua dulce urbano y fue de  $1.6 \times 10^3$  Copias de genoma /Litro (CG/L). Los rangos de concentración fueron de  $1.2 \times 10^2$  CG/L (sitio 6, un cenote de agua dulce y de uso recreativo) hasta  $1.6 \times 10^3$  CG/L (sitio 4, un cenote de agua dulce y de uso recreativo) (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Concentración viral obtenida expresada en Copias del genoma por litro (CG/L) para cada una de las muestras ambientales. Las concentraciones más altas para cada especie por sitio se resaltan en negritas.

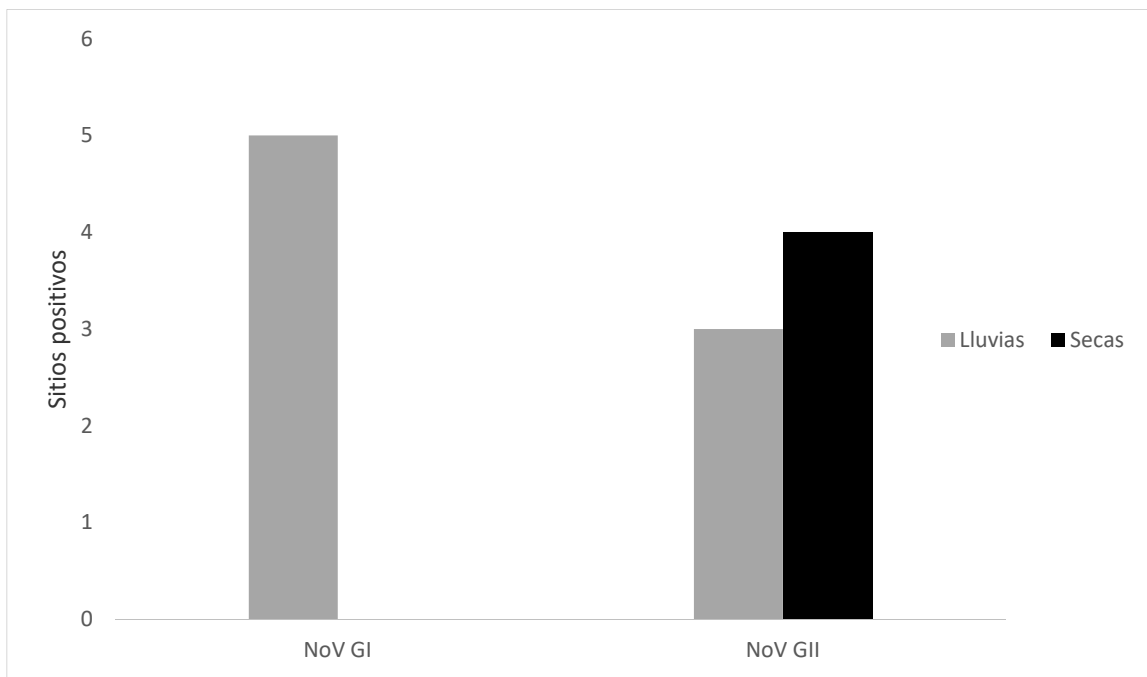
Sitio	Tipos de virus (Copias del genoma/Litro) (temporada de lluvias)			Tipos de virus (Copias del genoma/Litro) (temporada de secas)			
	NV GI	NV GII	HAV	NV GI	NV GII	HAV	ReoV
1	<b><math>1.6 \times 10^3</math></b>	ND	ND	ND	ND	ND	$1.35 \times 10^2$
2	$3.1 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$	ND	ND	<b><math>2.2 \times 10^2</math></b>	ND	$5.91 \times 10^1$
3	*	ND	ND	ND	ND	ND	$9.13 \times 10^1$
4	$6.9 \times 10^2$	<b><math>2.9 \times 10^2</math></b>	ND	*	ND	ND	$3.38 \times 10^2$
5	$4.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^1$	ND	ND	$3.5 \times 10^1$	ND	ND
6	$1.2 \times 10^2$	ND	ND	ND	$4.5 \times 10^1$	ND	$2.22 \times 10^2$
7	*	ND	ND	*	$1.1 \times 10^1$	ND	$1.51 \times 10^2$
8	ND	ND	ND	*	ND	ND	ND
9	ND	<b>ND</b>	ND	ND	ND	ND	<b><math>4.67 \times 10^3</math></b>
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND



\*Bajo el límite de cuantificación de 10 copias del genoma/L, ND= no detectado. (Los datos fueron obtenidos con apoyo de La M. en C. Gabriela Rosiles González y la Dra. Cecilia Hernández Zepeda).

Se cuantificaron NoV GII en el 30% y 40% de los sitios, en las temporadas de lluvias y en secas, respectivamente. Los valores con mayor concentración para NoV GII fueron  $2.9 \times 10^2$  CG/L, encontrados en el sitio 4, un cenote de agua dulce y de uso recreativo durante la temporada de lluvias y en el sitio 2 con  $2.2 \times 10^2$  CG/L durante la temporada de secas. Los rangos de concentración para la temporada de lluvias fueron de  $1.1 \times 10^1$  CG/L en el sitio 2 hasta los  $2.9 \times 10^2$  CG/L, encontrados en el sitio 4. Mientras que, para la temporada de secas, los rangos de concentraciones fueron de  $1.0 \times 10^1$  CG/litro en el sitio 7 hasta  $2.2 \times 10^2$  CG/litro en el sitio 2, un cenote de agua dulce urbano (**Tabla 10**). Es interesante resaltar que se detectaron simultáneamente NoV GI y GII en el 30% de los sitios durante la temporada de lluvias (**Tabla 10**).

Se cuantificaron ReoV en el 70% de las muestreas durante la temporada de secas. Los valores más altos de concentración de ReoV fueron detectados en el sitio 9, que es un sitio de agua salobre ( $4.67 \times 10^3$  CG/L). El rango de concentración fue de  $5.91 \times 10^1$  CG/litro en el sitio 2 un cenote de agua dulce urbano, hasta  $4.67 \times 10^3$  CG/litro en el sitio 9 (**Tabla 10**).



**Figura 9.** Comparación entre los sitios positivos por temporada para NoV GI y GII.

En general, se encontraron un mayor número de sitios positivos para NoV GI y GII durante la temporada de lluvias con respecto a la temporada de secas (Figura 9). Los resultados demostraron la presencia de NoV GI y GII únicamente en cenotes de agua dulce, ya que no se cuantificaron en sitios de agua salobre. Mientras que los ReoV se cuantificaron en sitios de agua dulce y agua salobre. Es importante mencionar que los ReoV fueron únicamente cuantificados durante la temporada de secas.

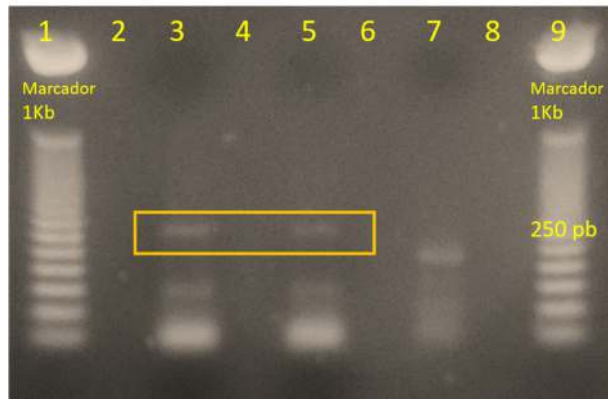
### **3. Detección de virus entéricos por PCR punto final**

Se utilizó el cDNA como plantilla para amplificar por PCR punto final con cebadores específicos para NoV GI, GII, y HAV. Se realizó una selección de las muestras que fueron positivas por qPCR para realizar la amplificación por PCR punto final; además, se utilizaron las muestras del cDNA obtenidas de los efluentes de las plantas de tratamiento de Tucson y de Akumal. Los resultados se presentan a continuación.

### 3.1. Norovirus

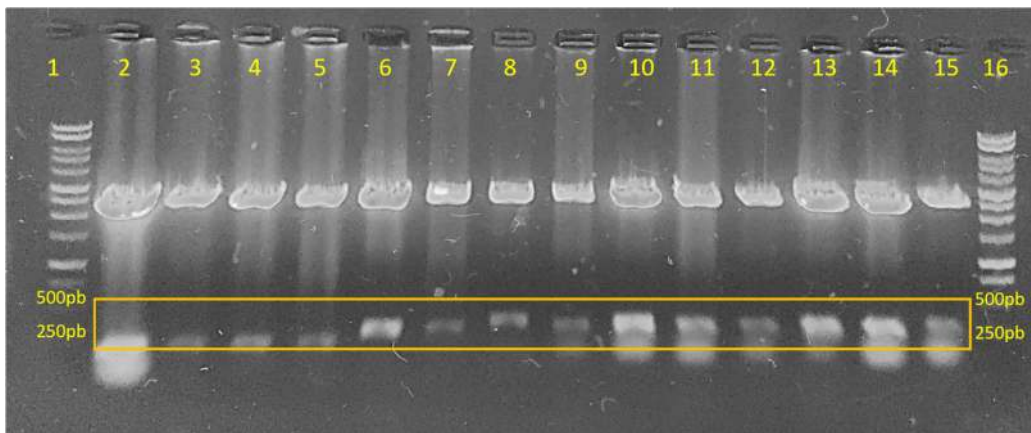
#### 3.1.1. Detección de Norovirus GI por PCR punto final.

Se realizó la amplificación de NoV GI, a partir del sitio 6 y de los efluentes tubo#2 y tubo#3 de la planta de tratamiento de Tucson, Arizona. Se obtuvo la amplificación de fragmentos de aproximadamente 270-300 pb en las muestras de efluente #2 y #3 (Figura 10).



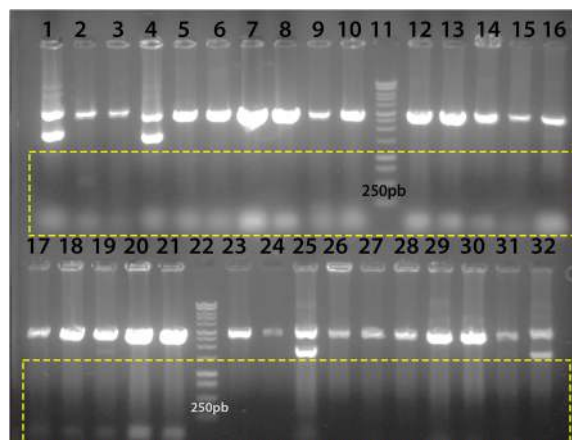
**Figura 10.** Detección por PCR anidado de NoV GI de las muestras de agua obtenidas. carril 1) marcador; carril 2) vacío; carril 3) muestra de efluente #2, carril 4) vacío; carril 5) efluente #3, carril 6) vacío; carril 7) ADN del sitio 6. En el gel se observa en un cuadro la banda del tamaño esperado de 273 pb aproximadamente.

Debido a la amplificación inespecífica que se observa en el gel en los carriles 3 y 5 (**Figura 10**), las muestras fueron eluidas antes de realizar la ligación. Se seleccionaron 5 colonias recombinantes de cada una de las dos muestras clonadas para obtener los plásmidos que fueron enviados a secuenciar. Se obtuvieron en total 15 clonas recombinantes para las muestras del efluente de Tucson y 10 para el efluente de Akumal PBP (**Figura 11**), las cuales fueron secuenciadas por MACROGEN, Corea. Como se observa en la Figura 11, no todos los insertos presentaron el mismo tamaño.



**Figura 11.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se corrieron las digestiones enzimáticas de los plásmidos recombinantes digeridos con la enzima EcoRI. Sitio 6: carriles 1-5 (tamaño aproximado del inserto 269), efluente #2: carriles 6-10 (tamaño aproximado del inserto 276pb), efluente #3: carriles 11-15 (tamaño aproximado del inserto 276pb), Marcador: carriles 1 y 16. El inserto se encuentra resaltado en el rectángulo.

Debido a que se obtuvieron insertos de diferentes tamaños y secuencias inespecíficas (la amplificación inespecífica obtenida con los cebadores NKI-F, NKI-R y NKI-F2), se realizaron pruebas para amplificar por RT-PCR el fragmento de interés aumentando la temperatura de alineación. Como templado se utilizaron muestras previamente positivas para NoV GI por qPCR. Los fragmentos amplificados fueron clonados y se seleccionaron los plásmidos recombinantes. Los tamaños de los insertos fueron variables como se observa en la **Figura 12**, por lo tanto, se concluyó que para PCR punto final estos cebadores son inespecíficos a pesar de que se aumente la temperatura de alineamiento hasta 60°C.



**Figura 12.** Digestiones enzimáticas con EcoRI en muestras positivas para NoV GI por qPCR. Yalkú carriles: 1-10), PBP (carril 12-21), Planta de tratamiento Norte carriles: 23-32). En ningún caso se obtuvieron los insertos del tamaño esperado (235 pb).

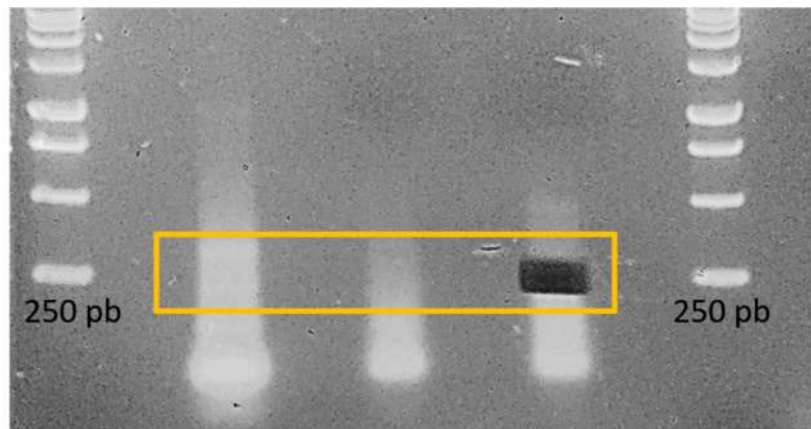
### 3.2. Detección de Norovirus GII por PCR punto final

Se realizó la amplificación de NoV GII, a partir de las muestras positivas por qPCR de los sitios 3, 4, 9 y de la muestra del efluente de Tucson tubo#2 y tubo#3. Como se observa en la **Tabla 11**, se obtuvo amplificación de la banda del tamaño esperado únicamente en el carril 3, que corresponde al tubo#3 del efluente de la planta de tratamiento de Tucson. Los resultados observados fueron analizados al correr los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%

**Tabla 11.** Resumen de los resultados obtenidos al correr en un gel de agarosa al 1% el producto de las amplificaciones por RT-PCR de NoV GII.

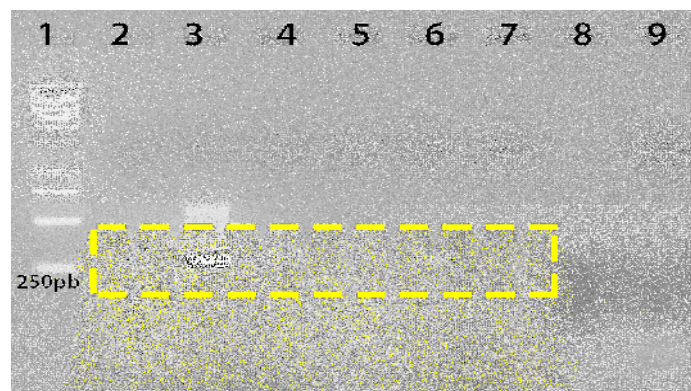
Carril	Muestra	Banda (269pb)
1	Marcador	-
2	Efluente #2	Ausente
3	<b>Efluente #3</b>	<b>Presente</b>
4	Sitio ambiental	Ausente
5	3	Ausente
6	6	Ausente
7	Marcador	-
8	Negativo	Ausente

Se utilizó el cDNA de la muestra del efluente de la planta de tratamiento PBP. El producto de amplificación fue eluido del gel (**Figura 14**) y ligado en un vector de clonación que se utilizó para transformar células competentes.

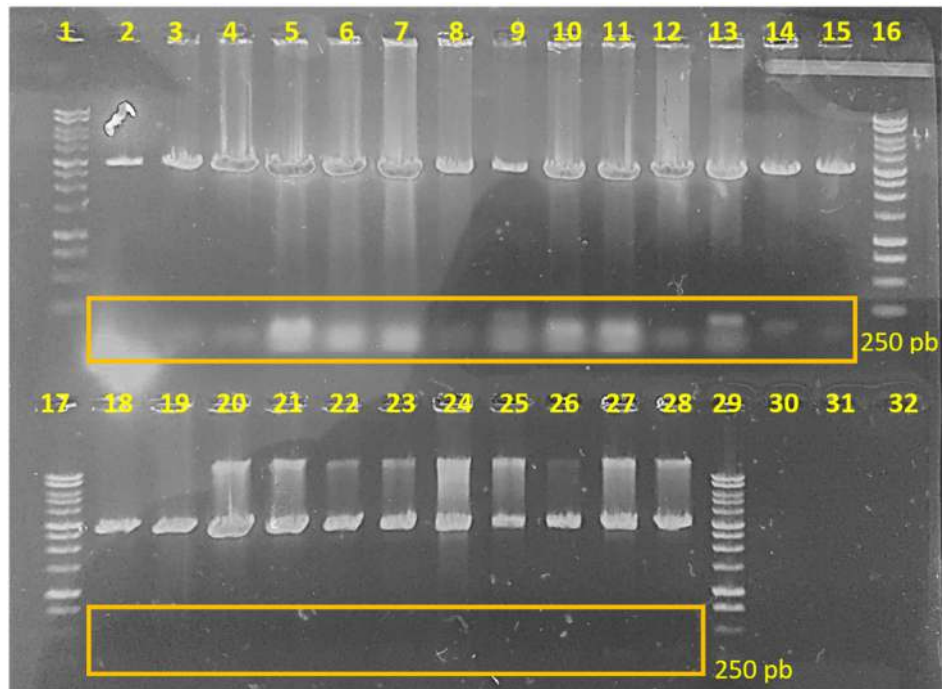


**Figura 13.** Amplicones resultantes de la muestra del efluente de la planta de tratamiento PBP. Se utilizaron cebadores específicos para NoV GII. En los carriles: 3, 5 y 7 se observó la banda del tamaño esperado de 269pb. La banda del carril 7 fue cortada para su elusión, ligación y clonación.

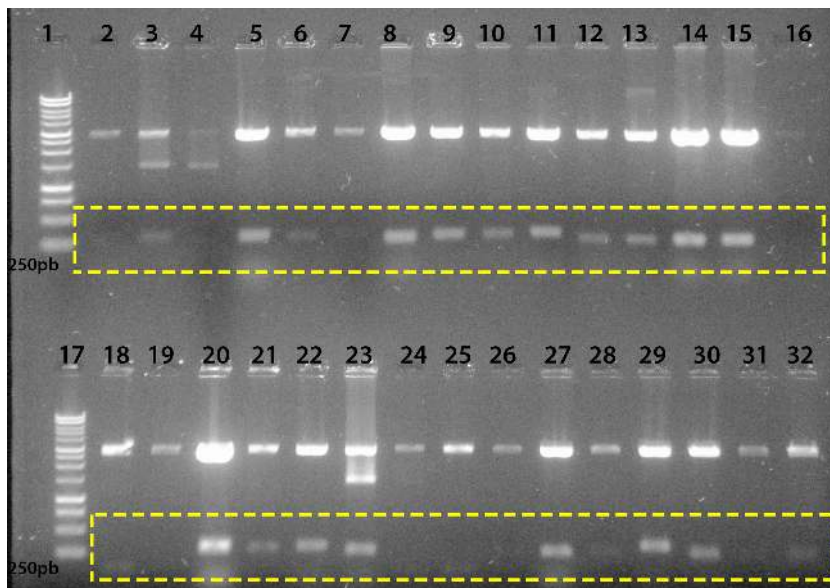
Se realizó la amplificación de NoV GII a partir de las muestras ambientales, utilizando la metodología descrita previamente y del efluente de la planta de tratamiento (**Figura 13**). Se obtuvieron plásmidos recombinantes con los insertos del tamaño esperado para 5 muestras ambientales y 15 para efluentes de las plantas de tratamiento (**Figuras 10, 11 y 12**).



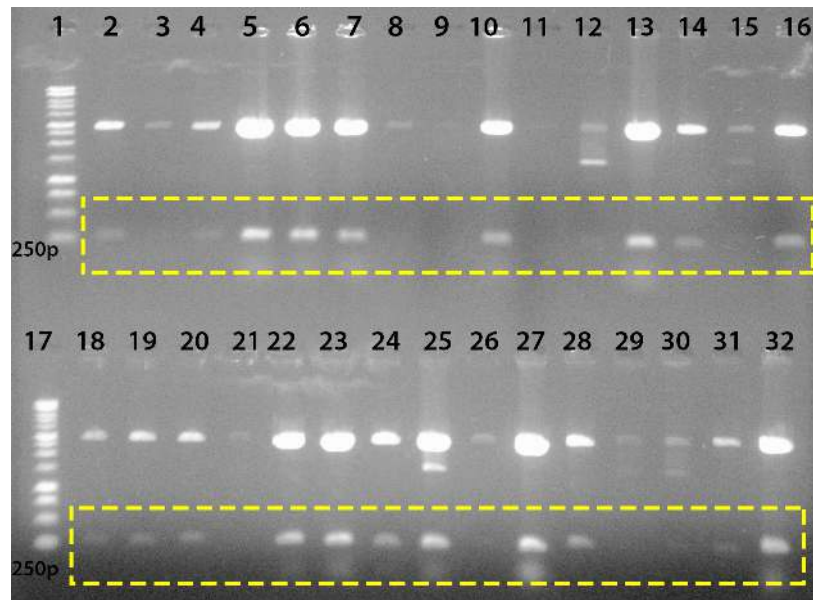
**Figura 14.** Gel de electroforesis mostrando los productos amplificados correspondientes a NoV GII carril: 1) PBP (carriles 2 y 3), sitio 5 (carril 4), sitio 8 (carril 5), sitio 7 (carril 6) y sitio 2 (carril 7). Marcador 250pb (carril 1). Banda esperada 269pb. Las muestras fueron ligadas y clonadas.



**Figura 15.** Digestión enzimática con EcoRI para NoV GII en PBP. Banda esperada: 269pb. Carriles positivos que contienen el inserto del tamaño esperado: 5,6,7,9,10,11,13,14, 21, 22, 23,25,26 y 27. Marcador: carril 1, 16, 17 y 28.



**Figura 16.** Digestión enzimática con EcoRI de los plásmidos recombinantes conteniendo los insertos amplificados con los cebadores específicos para NoV GII para muestras de PBP (carriles 2-16), 7B (carriles 18-32). Marcadores de 250pb: carriles 1 y 17. Carriles positivos: PBP (3, 5,6-9,10-15) y 7B (20-23, 27-30 y 32).



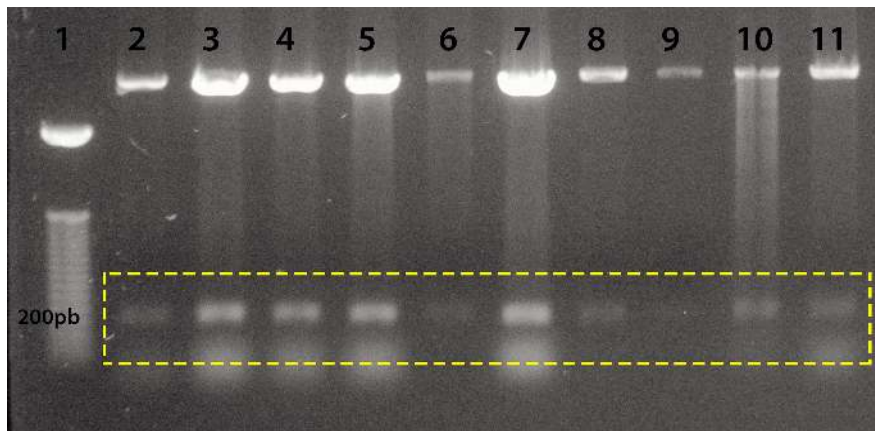
**Figura 17.** Gel B: Digestión enzimática con EcoRI de NoV GII para muestras de ambientales de cenotes de agua dulce: LN (carriles 2-16), R96 (carriles 18-32). Marcador 250pb: carriles 1 y 17. Carriles positivos: LN (2,4-7, 10, 13, 14,16) y R96 (18-20, 22-25, 27,28, 30-32).

Se obtuvieron un total de 76 colonias recombinantes, las cuales fueron enviadas a secuenciar a MACROGEN, Corea. Se obtuvieron 48 plásmidos recombinantes conteniendo los insertos amplificados con cebadores específicos para NoV GII.

### 3.3. Detección de Hepatitis A por PCR punto final

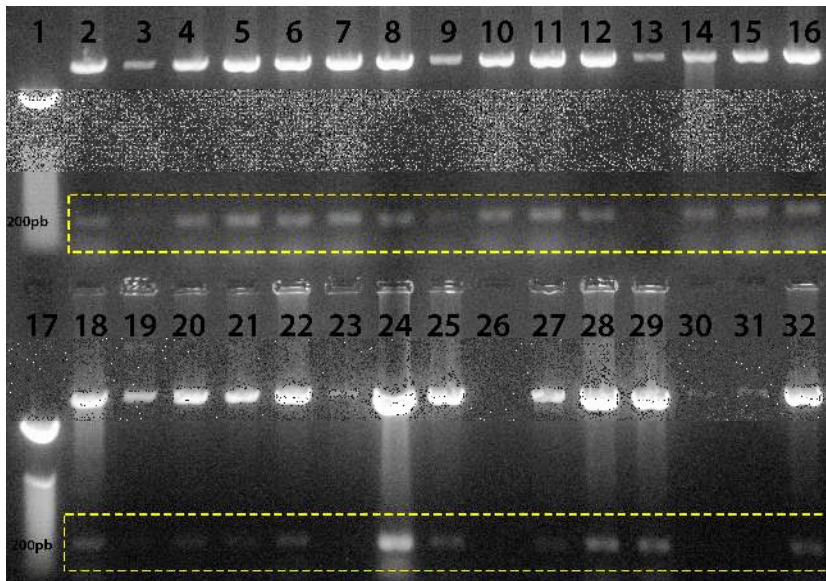
La técnica de PCR punto final fue probada en varias muestras ambientales y de los efluentes de las plantas de tratamiento. Sin embargo, solamente se obtuvieron amplicones utilizando los cebadores específicos para VHA en las muestras del efluente de Tucson. En la mayoría de los casos la amplificación por PCR punto final resultó en amplicones inespecíficos. Se obtuvieron plásmidos recombinantes conteniendo los insertos del tamaño esperado correspondientes a la muestra del efluente de Tucson.





**Figura 18.** Amplificación por PCR punto final utilizando cebadores específicos para virus de Hepatitis A. Muestra: planta de tratamiento PBP (fragmento de 200pb aproximadamente).

Los amplicones que se observan en la **figura 18** fueron ligados, las colonias recombinantes fueron seleccionadas y se obtuvieron plásmidos recombinantes que fueron enviados a secuenciar (**Figura 19**). Se obtuvieron 3 secuencias que compartieron altos porcentajes de identidad con el VHA. Sin embargo, la mayoría de las secuencias obtenidas fueron inespecíficas.



**Figura 19.** Plásmidos recombinantes digeridos con la enzima *EcoRI*.

#### 4. Identificación de genotipos virales

Se utilizaron las secuencias obtenidas para realizar la identificación de los genotipos virales amplificados presentes en cada uno de los sitios positivos. En la **Tabla 12**, se observa el listado de los sitios a partir de los cuales se obtuvieron amplicones de cada grupo viral bajo estudio. Sin embargo, no todos los amplicones resultaron en secuencias específicas para NoV o HAV.

**Tabla 12.** Listado de sitios y especies virales detectadas por PCR punto final en cada temporada.

Sitio	Temporada de lluvias			Temporada de secas		
	NV GI	NV GII	HAV	NV GI	NV GII	HAV
1	-	-	-	-	-	-
2	-	Presente	-	-	Presente	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	Presente	-	-	Presente	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	Presente	-	-	Presente	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
Efluente Tucson	Presente	Presente	-	Presente	Presente	-
Efluente PBP	-	-	Presente	-	Presente	Presente
Sitios Positivos (%)	9.09	33.33	8.33	8.33	41.67	8.33

Todas las secuencias obtenidas que compartieron porcentajes de identidad mayores al 94% con secuencias reportadas en el GenBank, se consideraron como genotipos virales para el análisis. Se obtuvieron un total de 53 secuencias correspondientes a NoV GII y 27 secuencias de VHA, correspondientes a los efluentes de PBP en temporada de secas.

##### 4.1. Plantas de tratamiento

Para los efluentes de Tucson y PBP se encontraron genogrupos virales correspondientes a NoV GI, GII y VHA respectivamente (**Tabla 13**). Para NoV GI y GII se obtuvieron porcentajes de identidad de nucleótidos del 96% al 99% en las secuencias obtenidas de la muestra del efluente de Tucson. Para el VHA, se

obtuvieron un total de 27 secuencias que compartieron un 91 a un 99% con secuencias reportadas en el GenBank (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Genogrupos y genotipos virales identificados en muestras del efluente de la planta de tratamiento PBP y Tucson.

<b>Código de la secuencia obtenida</b>	<b>Muestra</b>	<b>% identidad BLAST</b>	<b>Genotipo identificado</b>	<b>Número de accesión (GenBank)</b>	<b>Longitud de fragmento</b>
1778ZAC520	Efluente planta de tratamiento Tucson, Arizona	99	Norovirus Hu/GI.2/Jingzhou/2013401/CHN, complete genome	KF306212. 1	235
1778ZAC528		99	Norovirus water/GI.5/10-07-05-K/2010/ZAF capsid protein gene, partial cds	JN191360. 1	
1778ZAC543		96	Norovirus GII.Pb/GII.3 strain Hu/GII.Pb_GII.3/NSW893X/2014	KT239614. 1	
1778ZAC544		99	Norovirus GII.4 isolate 84 ARN-dependent ARN polymerase	KJ533132. 1	
1778ZAC447	Planta de tratamiento (PBP)	99	Norovirus Hu/GII.17/CGMH70/2015/TW	KR154231. 1	269
1778ZAC448		99	Norovirus GII.17 strain Hu/GII.17/142700/Shanghai/2014	KT380915. 1	
1778ZAC451		98	Norovirus Hu/SZ-2011-21/CHN	KR093998. 1	
1778ZAC453		98	Norovirus Hu/GII.4/Jingzhou/2013403/CHN	KF306214. 1	

1778ZAC454	98	Norovirus GII.Pe_GII.4 Sydney_2012	KU529180. 1	
1778ZAC458	99	Norovirus GII.17 strain Hu/GII.17/15081009/CHN/2 015	KT633383. 1	
1778ZAC459	99	Norovirus GII isolate Hu/GII/THA/2015	KX139298. 1	
1778ZAC461	98	Norovirus GII/Hu/KR/2015/GII.P17	KU687039. 1	
1778ZAC463	99	Norovirus Hu/GII.17/CUHK- NS-682/HKG/2015	KT346358. 1	
1778ZAC464	99	Norovirus Hu/GII.4/HiroshimaCity3/20 12/JP	AB972496. 1	
1778ZAC614	99	Norovirus Hu/GII.4/Sakai3/2012/JP	AB972489. 1	
1778ZAC524	98%	Hepatitis A isolate ISS123 polyprotein gene, partial cds	KX859070. 1	
1778ZAC525	91%	Hepatitis A virus isolate HS- 16/10/00 polyprotein gene, partial cds	AF386886. 1	

La identificación de los genotipos virales obtenidos de la muestra del efluente de de la planta de tratamiento de Tucson, AZ, USA, mostró la presencia de los siguientes genotipos: NoV GI.2, NoV GI.5, NoV GII.3 y NoV GII.4. La identificación de los genotipos virales obtenidos de la muestra del efluente de la planta de tratamiento de Akumal PBP, mostró la presencia de los siguientes genotipos: NoV GII.17 y GII.4. El único genotipo encontrado en las muestras de ambos países fue el NoV GII.4.

## 4.2. Genotipos virales aislados de muestras ambientales

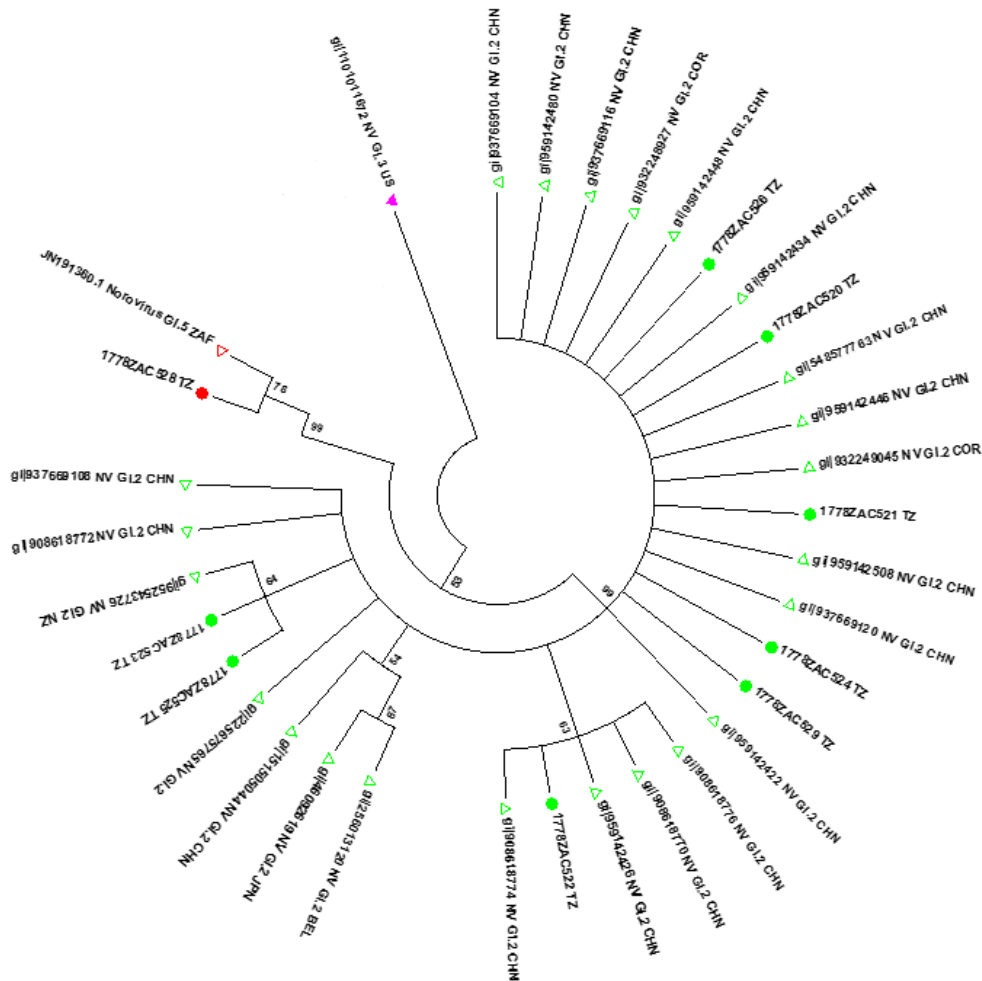
Se identificaron distintos genotipos correspondientes a NoV GII, los cuales fueron GII.4 y GII.17. Las secuencias obtenidas compartieron un alto porcentaje de identidad de nucleótidos (98-99%) con secuencias previamente reportadas en el GenBank (**Tabla 14**). El genotipo GII.4 se detectó en los sitios de 7B 7 (cenote de agua dulce de uso recreativo) y R96 2 (cenote de agua dulce urbano) y el GII.7 se detectó en R96 2 (cenote de agua dulce urbano) 7B 7 y LN 5 (cenote de agua dulce de uso recreativo). Es interesante resaltar que los resultados demostraron que los genotipos GII.4 y GII.17 fueron detectados tanto en muestras ambientales como en la muestra del efluente de la planta de tratamiento PBP en el estado de Quintana Roo.

**Tabla 14.** Genogrupos y genotipos virales identificados en muestras ambientales tomadas en Quintana Roo.

<i>Código de secuencia</i>	<b>Muestra</b>	<b>% identidad</b>	<b>Nombre</b>	<b># accesión</b>	<b>Longitud de fragmento</b>
1778ZAC305	7B	98%	Norovirus GII.Pe_GII.4 Sydney_2012	<a href="#">KU529180.1</a>	269 pb
1778ZAC304		99%	Norovirus GII.17 isolate 14-BS-1/2014/GII.P17/GII.17 ORF1 and VP1 genes, partial cds	<a href="#">KT906671.1</a>	
1778ZAC308	R96	98%	Norovirus GII.Pe_GII.4 Sydney_2012	<a href="#">KU529180.1</a>	
1778ZAC334		99%	Norovirus GII.17 isolate 14-BS-1/2014/GII.P17/GII.17 ORF1 and VP1 genes, partial cds	<a href="#">KT906671.1</a>	
1778ZAC312	LN	99%	Norovirus GII.17 isolate 14-BS-1/2014/GII.P17/GII.17 ORF1 and VP1 genes, partial cds	<a href="#">KT906671.1</a>	

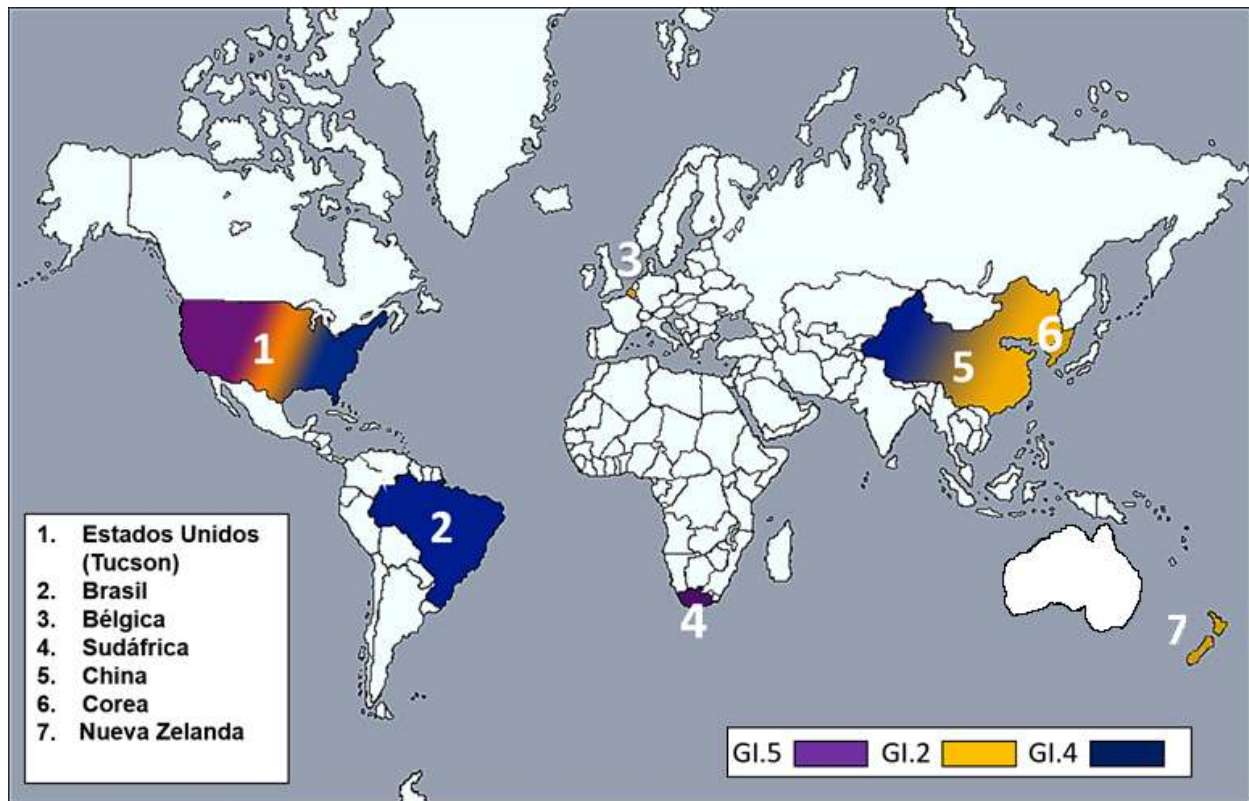
## 5. Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron secuencias utilizadas para análisis similares por diferentes autores. Para construir la matriz de secuencias de referencia para NoV GI se utilizaron las secuencias publicadas por Kobayashi y colaboradores (2015) y para NoV GI.2, las secuencias publicadas por Cotten y colaboradores (2014). Para realizar la reconstrucción filogenética con las secuencias de VHA se construyó una matriz de secuencias utilizando los primeros 10 "hits" obtenidos mediante el análisis de BLAST.



**Figura 20.** Reconstrucción filogenética con base en las secuencias obtenidas para NoV GI. El árbol fue construido con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento Tucson (TZ). El clado del genotipo NoV GI.2 se encuentra resaltado en color verde y el clado del genotipo GI.5 se encuentra resaltado en color rojo. La raíz corresponde al genotipo GI.3 reportado en Estados Unidos ( $\Delta$  en color rojo). En los nodos se muestran los valores obtenidos de Bootstrap. Los siguientes acrónimos corresponden al país donde la secuencia fue descrita: US/Estados Unidos, CHN/China, COR/Corea, BEL/Bélgica, JPN/Japón. Los  $\Delta$  corresponden a las secuencias obtenidas del GenBank y el resto marcadas con  $\bullet$  corresponden a las secuencias obtenidas en el presente trabajo.

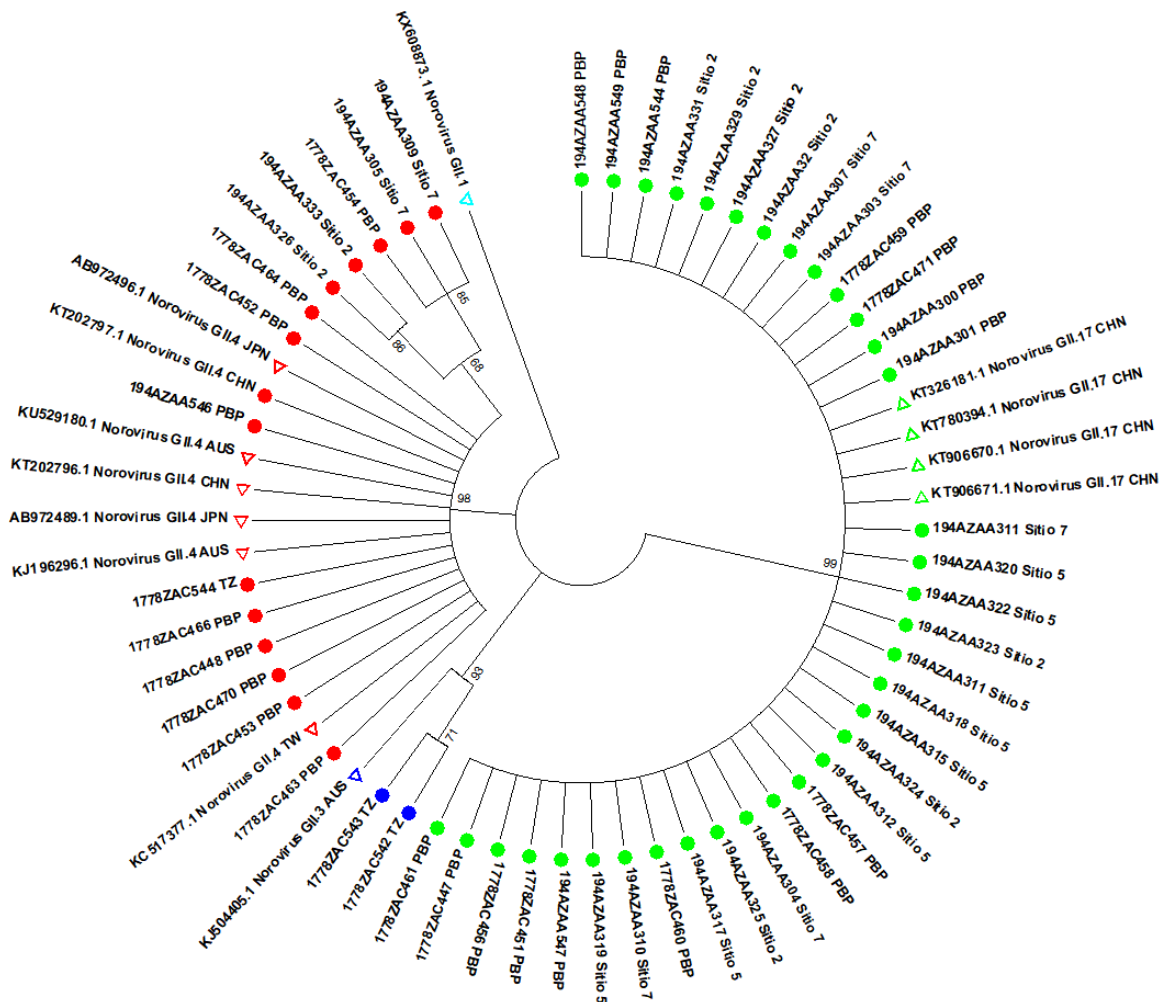
El árbol está compuesto por tres clados principales que corresponden a los siguientes genotipos: el GI.5 (resaltado en color rojo) y el GI.2 (resaltado en color verde) (**Figura 20**). El clado que contiene al genotipo GI.3 fue utilizado como raíz y en él se agrupan las secuencias de referencia obtenidas del GenBank. En el clado del genotipo GI.5 se encuentra una secuencia del GenBank reportada en Brasil (Sisay et al., 2016) y las secuencias obtenidas de la muestra del efluente de Tucson (TZ). El clado del genotipo NoV GI.2, es el que contiene el mayor número de secuencias tanto de referencia como las secuencias obtenidas en la muestra del efluente de Tucson (TZ). Las secuencias de referencia han sido reportadas en diferentes países como China, Corea y Bélgica (Kim, et al; Walter et al., 1982; Wang, et al 2015). Los clados correspondientes a GI.2 y GI.5 muestran un alto apoyo de bootstrap (del 99%) (**Figura 20**).



**Figura 21** Mapa mostrando los países en donde se han reportado las secuencias utilizadas para la reconstrucción filogenética del genogrupo NoV GI, que contiene la distribución de los genotipos de NoV GI.2, GI.4, y GI.5 en diferentes países.

En la **figura 21**, se muestra un mapa con la distribución de los genotipos correspondientes a NoV GI realizado con base en las secuencias utilizadas para el análisis filogenético. En el mapa se observa que el genotipo GI.2 se encuentra presentes en Estados Unidos, Bélgica, China y Corea y el genotipo GI.4 en Estados Unidos, Brasil y China; mientras que el genotipo GI.5 se encuentra en Estados Unidos y en Sudáfrica. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican la presencia de los genotipos GI.2 y GI.5 en México.

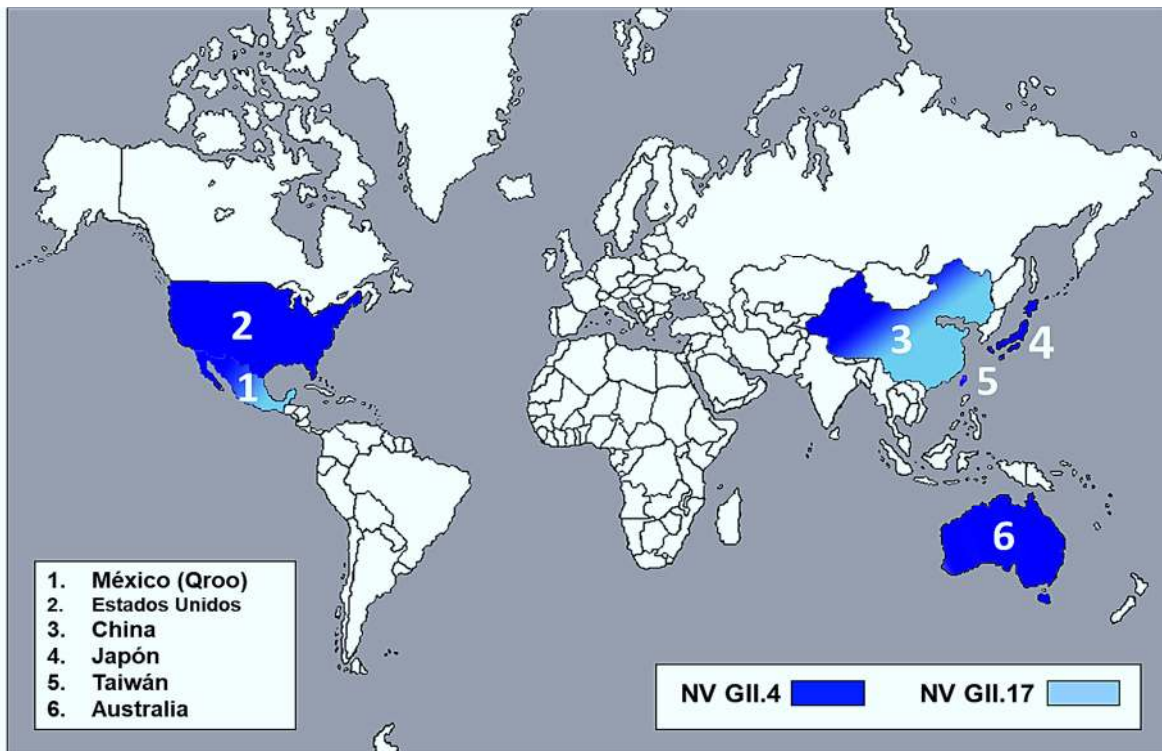




**Figura 22.** Reconstrucción filogenética con base en las secuencias obtenidas de NoV GII. El árbol fue construido con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento Tucson (TZ) y PBP además de las secuencias obtenidas de las muestras ambientales (marcadas con un ●). El clado del genotipo NoV GII.3 se encuentra resaltado en color azul; el clado del genotipo GII.4 se encuentra resaltado en color rojo y el clado del genotipo GII.17 se encuentra resaltado en verde. La raíz corresponde al genotipo GII.1 (Δ en color azul cielo). Los siguientes acrónimos corresponden al país donde la secuencia fue descrita: US/Estados Unidos, BRA/Brasil, CHN/China, COR/Corea, BEL/Bélgica, JPN/Japón. Las secuencias de referencia se encuentran marcadas con un triángulo Δ. En la parte interior del árbol, se muestran los valores de bootstrap.

El análisis filogenético muestra la agrupación en tres clados principales agrupados por los siguientes genotipos: NoV GII.17 (resaltado en color verde), GII.4 (resaltado en color rojo) y GII.3 (resaltado en color azul). En el clado del genotipo GII.4, se encuentran secuencias obtenidas a partir de las muestras obtenidas en de muestras ambientales (sitio 7B 7 y sitio R96 2) y en muestras de los efluentes (PBT y TZ). En

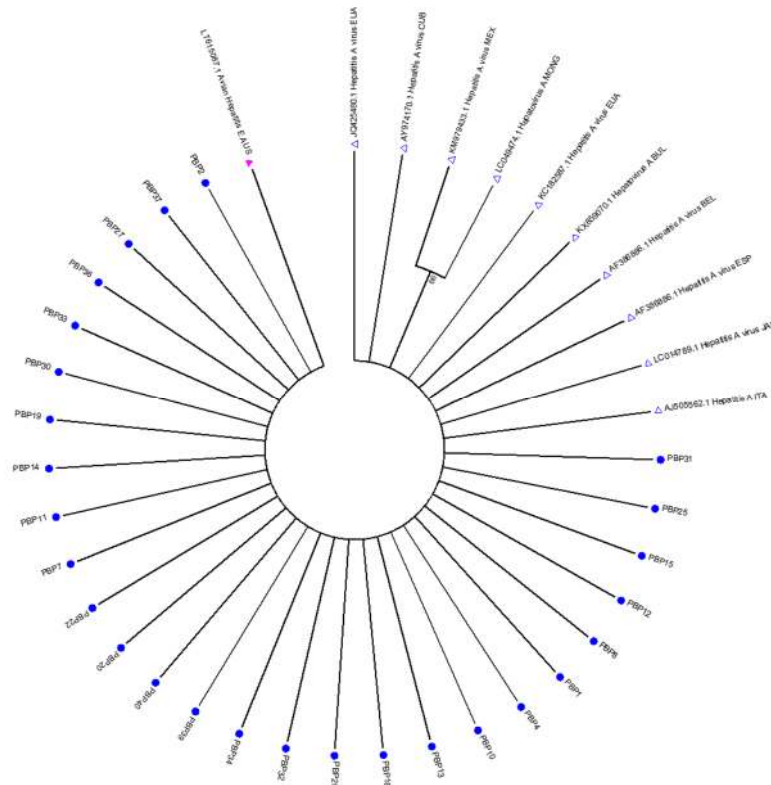
este clado se encuentran secuencias del genotipo GII.4 reportadas en países como Australia (Arana et al., 2014) Taiwán, Japón y China (Chen et al., 2015; Gao et al., 2016; Sato et al., 2014; Xue et al., 2015) (**Figura 22**). En el clado que contiene al genotipo GII.3 se agrupan secuencias previamente reportadas en Estados Unidos y secuencias obtenidas de la muestra TZ (efluente de la planta de tratamiento de Tucson). El clado que contiene al mayor número de secuencias, que corresponde al clado del genotipo GII.17, (donde se encuentra más del 50% de las secuencias obtenidas) contiene secuencias obtenidas de muestras ambientales (sitios 2, 5 y 7) y de la planta de tratamiento PBP. La variante GII.17 ha sido reportada principalmente en China (Chan et al., 2015). Este clado cuenta con un apoyo de bootstrap alto de un 99%.



**Figura 23.** Países con presencia de NV GII. 4 y GII.17 cuyos registros fueron usados como referencia para la reconstrucción del árbol filogenético de las secuencias positivas para NV GII en cuerpos de agua en Quintana Roo, México.

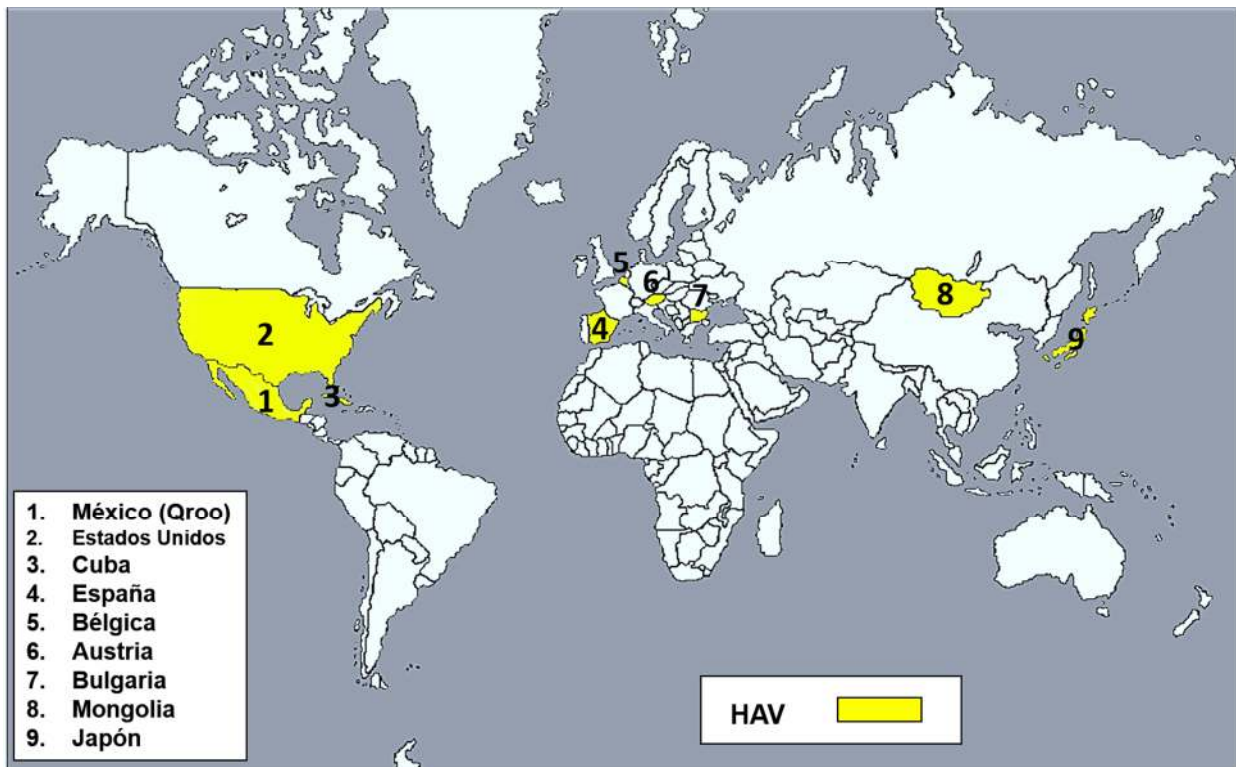
El análisis para VHA un solo (Figura 24). debe

filogenético resultó en clado Esto se



**Figura 24** Árbol filogenético HAV, compuesto con secuencias obtenidas de las muestras de la planta de tratamiento PBP (marcadas con un ●). La raíz corresponde al virus de Hepatitis E aviar (Δ en color magenta). Las secuencias base para la construcción del árbol fueron elegidas en base a los hits con mayor porcentaje de identidad con la herramienta BLAST de la NCBI (marcadas con Δ). En la parte interior del árbol, se muestran los valores de bootstrap.

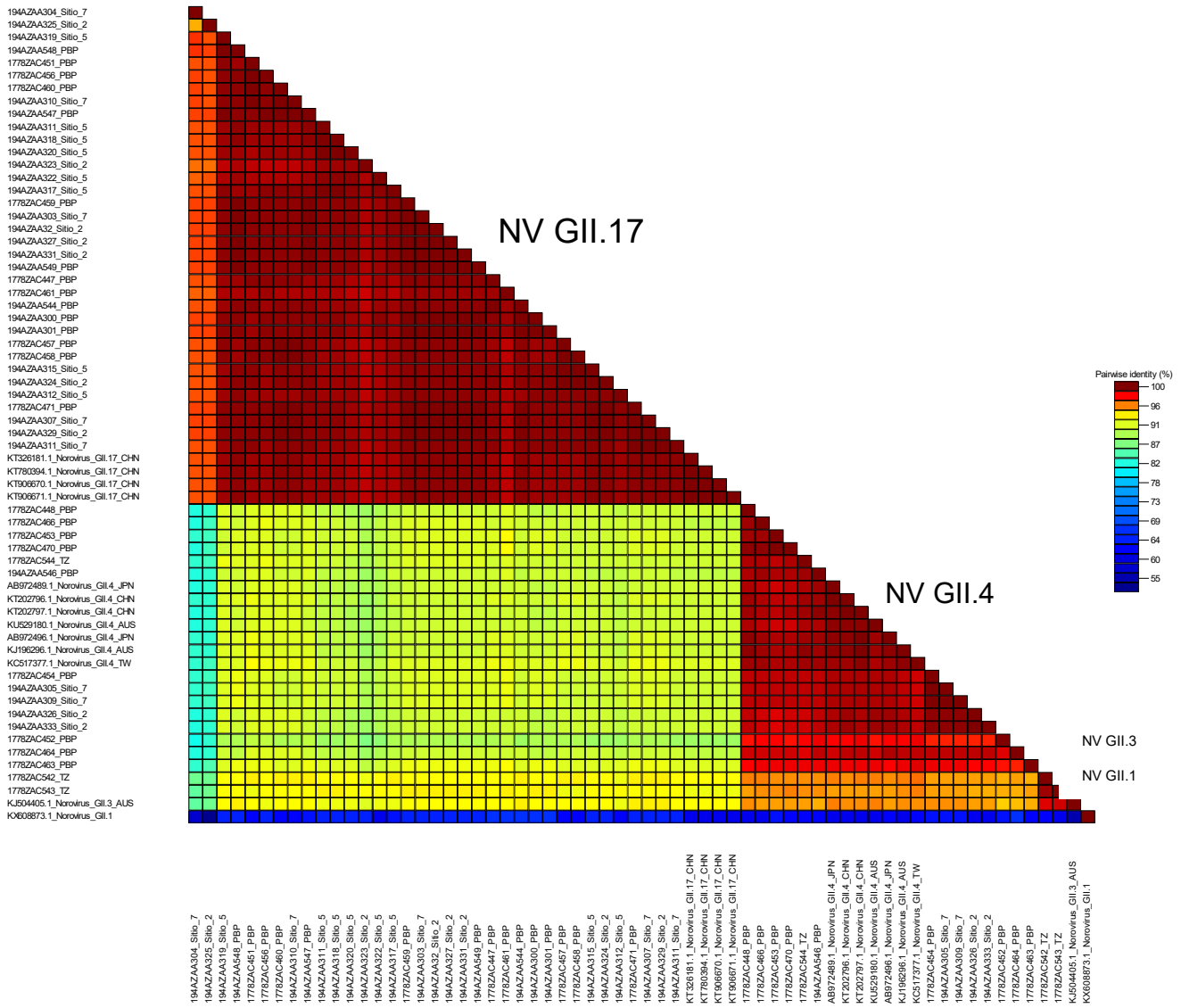
principalmente a las características altamente conservadas de VHA, que solo posee un serotipo reportado. Las secuencias con mayor porcentaje de identidad fueron empleadas en la construcción del árbol filogenético y corresponden secuencias reportadas previamente en Estados Unidos, Austria, Bulgaria, Mongolia, Italia, Japón, Cuba y México (Figura 25) (Bruni et al., 2016; Chironna et al., 2003; Chizhikov, 2012; Falcon-Acosta et al., 2014; Gonzalez Badillo et al., 2005; Harada et al., 2015; Pina et al., 2001; Tsatsralt-Od et al., 2016; Zhang, et al., 2016) las cuales no refleja mayor variación filogenética, respecto a este análisis.



**Figura 25.** Países con presencia de VHA cuyas secuencias fueron usadas como referencia para la reconstrucción del árbol filogenético de las secuencias positivas para VHA en efluentes de plantas de tratamiento en el Estado de Quintana Roo, México.

## 6. Análisis de diversidad genética

La **figura 26** muestra el análisis de diversidad por pares, en un código de colores que agrupa a las secuencias más similares entre sí con tonos entre anaranjado y rojo. Existen 3 secciones ubicadas en el lado más largo del triángulo, analogando geoméricamente, el lado correspondiente a la hipotenusa de un triángulo rectángulo, estas secciones resaltan por su tonalidad roja, lo cual indica que tienen una similitud cercana al 100%. La primera en la parte superior agrupa a las secuencias que pertenecen a NoV GII.17, la segunda sección, ubicada en la parte media inferior, muestra a las secuencias pertenecientes a NoV GII.4 y la última sección de tamaño mínimo ubicada en la parte inferior del triángulo agrupa a las secuencias pertenecientes a NoV GII.3 y GII.1.



**Figura 26.** Análisis de diversidad genética por pares. Se analizaron todas las secuencias que conformaron el árbol filogenético de NoV GII. De manera gráfica se muestran los porcentajes aproximados de diversidad que existe entre las diferentes variedades dentro del GII.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo reportó la presencia de virus entéricos (NoV y ReoV) en el sistema acuífero de la Península de Yucatán (PY), durante dos temporadas climáticas y en diferentes tipos de cuerpos de agua. La metodología de ultrafiltración de partículas virales, reportada por Hill y colaboradores (2005) fue eficiente para la detección por medio de la caracterización de ácidos nucleicos de virus entéricos (NoV y ReoV) y virus de hepatitis A, en el sistema acuífero cárstico noroeste de la PY. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de los genotipos NoV GII.17 (más abundante), No V GII.4 y No V GII.3 (característico del efluente PBP) por primera vez en el acuífero de la PY. Además, se detectaron los genotipos GI.2 y GI.5 en muestras del efluente de Tucson, Arizona, USA.

A pesar de que se han reportado varios métodos de detección por PCR anidado para amplificar NoVGI a partir de muestras de agua (Tong et al., 2011), en el presente trabajo la amplificación por PCR punto final de NoV GI no fue eficiente para las muestras de dolinas (cenotes) de agua dulce ni para las muestras de agua salobre. Lo anterior, puede deberse a que los cebadores fueron inespecíficos, los cuales pueden formar estructuras secundarias formando gran variedad de productos inespecíficos y dímeros de ADN (Halford, et al., 1999), o a la baja concentración de los NoV GI en las muestras de agua. Por otro lado, la técnica de PCR punto final para medios tan diluidos, donde no hay una fuente de partículas virales concentradas, no siempre da resultados positivos (Staggemeier et al., 2015). Para el tipo de agua de los sitios bajo estudio en el presente trabajo, la detección por PCR punto final no fue muy eficiente ya que solo permitió detectar NoV GII en un bajo porcentaje de las muestras analizadas.

Los resultados del presente estudio demostraron un mayor número de sitios positivos para NoV durante la temporada de lluvias con respecto a la temporada de secas. En la temporada de lluvias el 50% de los sitios (5/10) fue positivo para NoV GI y el 30% (3/10) para NoV GII. En total se detectaron 40% de sitios positivos (4/10) para NoV durante la temporada de lluvias y 20% de sitios positivos (2/10) durante la temporada de secas. El aumento de sitios positivos para NoV en temporada de

lluvias podría estar directamente asociado al flujo de contaminantes subterráneos (Plaguissidas, hidrocarburos, virus y bacterias patógenas, entre otros (Ongley, 1997)) por precipitaciones, remoción de sedimentos y escorrentías (Post y Jakeman, 1993).

Las concentraciones detectadas por qPCR en los sitios ambientales fueron variables dependiendo del genogrupo de NoV. Los virus entéricos requieren dosis mínimas para causar infecciones, por ejemplo los NoV tiene una tasa de partículas viables para infección de 1:10, lo cual hace suficientes la ingestión de 8-10 partículas para elevar la probabilidad de infección en más de un 50% (Kong et al., 2015). Las concentraciones más altas de NoV GI detectadas en la temporada de lluvias fueron encontrados en el sitio RV 1 y en la temporada de secas en el sitio 7B 7. Se han reportado valores de copias por litro similares en estudios realizados por D'Ugo et al., (2016) donde se registraron concentraciones dentro del orden  $10^3$  copias por litro, en muestras superficiales de un río de tipo urbano. En México se han detectado virus entéricos en cuerpos de agua como el estudio de León-Félix y colaboradores en el 2010, donde la temporadas con mayor flujo de visitantes marcaron una diferencia importante en el porcentaje de muestras positivas. Sin embargo, los valores obtenidos en la amplificación por qPCR se consideran subestimados ya que un factor importante es la eficiencia de recuperación del sistema de ultrafiltración, el cual ha reportado ser entre un  $59\% \pm 10\%$  y un  $95.8\% \pm 22.36\%$ , respectivamente, de acuerdo a Hill y colaboradores (2005) y Hernández-Morga y colaboradores (2009).

La variación drástica en la concentración de partículas virales por litro entre temporadas, podrían estar explicadas por la re suspensión de sedimento a causa de las lluvias, ya que se sabe que la mayor concentración de partículas virales se encuentra en el sedimento acuático (Post y Jakeman, 1993). Por tal razón en la temporada de lluvias registro el mayor de sitios positivos. La variación de la temperatura entre temporadas, representa un factor que favorece la persistencia de NoV. Kitajima y colaboradores en 2009, encontraron concentraciones de  $6.9 \times 10^4$  en invierno y  $1.5 \times 10^4$  en verano, en muestras del efluente de una planta de tratamiento en Japón y sus datos corroboran la mayor resistencia de NV ante climas con temperaturas bajas.

Las variaciones drásticas en las concentraciones de partículas virales por litro entre temporadas, siendo la temporada de lluvias la que registra mayor número de sitios positivos en total, podrían estar explicadas por la resuspensión de sedimento a causa de las lluvias, ya que se ha reportado que la mayor concentración de partículas virales se encuentra en el sedimento acuático (Post y Jakeman, 1993).

El genogrupo más abundante detectado en los cuerpos de agua analizados fue NoV GII.17 (n= 36 clonas), el cual se ha reportado anteriormente en países como Francia, desde 1978, Kenia (2012), China (2014), Australia (2012), Rumania (2015), entre otros, donde ha causado brotes infecciosos importantes (Dinu et al., 2015). Se sabe que la migración tiene consigo un intercambio importante de patógenos, entre los visitantes y el medio (Balanzó, 2006). El estado de Quintana Roo recibe entre 6-8 millones de visitantes cada año provenientes principalmente de Estados Unidos, países europeos y asiáticos (SECTUR, 2014), a lo cual podría asociarse en primera instancia la gran diversidad de los genotipos encontrados para NoV en agua de uso recreativo. En México se reportan cada año infecciones causadas por NoV GI (genotipos 1, 4 y 5) y NoV GII (genotipos 4, 5, 6 y 14) (García et al., 2006), pero no existen reportes de infecciones causadas por NoV GII.17, por lo tanto, este trabajo constituye el primer reporte de la presencia de los genotipos GII.2 y GII.17 en muestras de agua en México (aunque existe una secuencia publicada en el GenBank JF970609 identificada como NVGII.17 asociada a un brote de gastroenteritis en México). El genogrupo GII.4 fue identificado a partir de los efluentes de las plantas de tratamiento de Tucson y PBP y en las muestras de agua (sitio 2 y sitio 7). El genotipo GII.4 es el más predominante a nivel mundial (Bull et al., 2005). Existen reportes que indican la presencia del genotipo GII.4 en México, infectando a miles de infantes desde los 2 años, muchas veces sin causar síntomas aparentes. El sector más vulnerable son las personas de escasos recursos (García, 2006). En México el primer reporte sobre la presencia del genotipo GII.4 y de otro genotipo probablemente no reportado previamente se realizó en aguas estuarinas del estado de Sinaloa (Hernández-Morga et al., 2009). Es interesante resaltar que, aunque en México se ha reportado la presencia del genotipo I subtipo B del virus de Hepatitis A presente en cuerpos de agua del norte de México (Hernández-Morga et al., 2009; León-Félix et al., 2010), en el presente trabajo el VHA no se pudo detectar



ni cuantificar en muestras de agua ambientales. Sin embargo, se sabe que el virus se encuentra presente, ya que se obtuvieron secuencias de las muestras de agua tratada, por lo que, en el futuro se utilizarán diferentes metodologías tanto de concentración como de detección y cuantificación para las muestras del acuífero de la PY.

Los clados formados en la reconstrucción filogenética para NoV GII fueron similares a los formados en la literatura por García et al., y colaboradores (2006) y León-Félix y colaboradores (et al., 2010). La agrupación de las diferentes variables de los genogrupos y cada variante de NoV formó un clado específico dentro del árbol. En el caso del VHA se tiene un solo clado, ya que el virus es altamente conservado y solo cuenta con un serotipo reportado.

## CONCLUSIÓN

El presente trabajo es el primero en demostrar la presencia de virus entéricos en el acuífero noreste de la Península de Yucatán, particularmente en cenotes y cuerpos de agua salobres del estado de Quintana Roo. El desarrollo de la metodología permitió estandarizar un método de concentración de partículas virales a partir de muestras de agua dulce y agua salobre que mostró ser eficiente para la obtención de ácidos nucleicos virales. Se reportó por primera vez la presencia de NoV GI, NoV GII y ReoV en cenotes y cuerpos de agua de la PY, en concentraciones de hasta  $1.6 \times 10^3$  CG/L,  $2.9 \times 10^2$  CG/L, y  $4.67 \times 10^3$  CG/L, respectivamente. Las concentraciones más altas de NoV fueron detectadas durante la época de lluvias y se reportaron concentraciones altas de ReoV durante la temporada de secas, lo anterior que sugiere que existen diferencias en la estacionalidad y las concentraciones de diferentes virus entéricos. La tipificación de los virus detectados demostró la presencia de los genotipos más abundantes de NoV (GII.17 y GII.4) que se encuentran circulando en la localidad.

## **CAPÍTULO III. ESTIMACIÓN DEL RIESGO POTENCIAL PARA LA SALUD: NOROVIRUS Y REOVIRUS**

### **INTRODUCCIÓN**

Los virus patógenos humanos presentes en los ambientes acuáticos han sido estudiados desde los años 70's (Walter et al., 1982), éstos han sido caracterizados en diferentes condiciones, para comprobar su prevalencia y los posibles riesgos que su presencia implica en cuerpos de agua de uso recreativo y para consumo humano (Harris, 1987). A nivel internacional se han desarrollado diversas metodologías para el estudio epidemiológico de los virus entéricos presentes en diferentes tipos de muestras de agua. El análisis de riesgo parte de la premisa de haber identificado un riesgo potencial para la salud, en este caso, los virus entéricos en el acuífero noreste de la PY, los cuales pueden causar enfermedades entéricas agudas al ser ingeridos en bajas concentraciones, posteriormente pasamos a realizar el análisis de los mismos, es decir, se estudia la posibilidad y las consecuencias de virus entéricos en el agua del acuífero, con el fin de establecer el nivel de riesgo que su presencia representa (Kong et al., 2015).

Existen diferentes modelos para el análisis de riesgo por virus entéricos en ambientes acuáticos. La selección del modelo adecuado dependerá de las características específicas del patógeno a estudiar, por ejemplo; su prevalencia en el ambiente (resistencia a procesos de desinfección, rangos amplios de salinidad, pH y temperatura), el uso inmediato del cuerpo de agua (si se emplea para abastecer de agua potable a una comunidad, uso recreativo o sitio de descargas directas) (Kong et al., 2015). El modelo exponencial involucra variables relacionadas con la concentración aproximada de patógenos por unidad de volumen y una dosis-respuesta variable para una concentración determinada en un número dado de sujetos de estudio (ID50) (Schmidt, 2015). Este modelo ha sido utilizado para determinar la probabilidad de infección por patógenos de tipo viral y bacteriano que existe al consumir un volumen determinado de agua que contiene a estos patógenos a una concentración dada, el análisis de riesgo es primordial para conocer la salud

de un cuerpo de agua que se ve sometido a alguna actividad humana, previniendo brotes infecciosos que muchas veces son altamente contagiosos (infecciones por Norovirus y Hepatitis A y Reovirus) (Gerba, et al. 1996).

La detección de organismos patógenos en cuerpos de agua también podría estar ligada a los fenómenos de lluvias y estiaje, según reportan Post y Jakeman en el año de 1993 Post y Jakeman en el 1993, cambiando ligeramente las condiciones fisicoquímicas de los cuerpos de agua por disolución, escorrentías o remoción de sedimentos. Como primera etapa del análisis de riesgo, se deben considerar los parámetros fisicoquímicos (que podrían fungir como inhibidores) y la concentración de partículas virales, como posibles factores en prevalencia y detección de patógenos. Se ha estudiado el riesgo a la salud que ocasionan diferentes especies virales por ejemplo, los rotavirus y los norovirus son algunos de los virus más estudiados por su alta prevalencia en medios acuáticos y su alta tasa de infección (Betancourt y Gerba, 2016). Gracias a la obtención de modelos epidemiológicos que consideran variables físicas y químicas se han podido determinar de manera más acertada las posibles consecuencias del consumo de agua contaminada por patógenos de tipo viral.

Los análisis del riesgo de infección dependen de las concentraciones virales obtenidas, de la eficiencia del sistema de recuperación y de las técnicas aplicadas durante cada paso desde que se colecta la muestra hasta que se obtiene la cuantificación de los virus (Venter et al., 2007). En el presente capítulo se estimaron los análisis de riesgo que representan los virus entéricos detectados en diferentes cuerpos de agua del norte del Estado de Quintana Roo. Es importante continuar determinando los riesgos potenciales para la salud que los virus entéricos representan para la salud en la PY, tomando en cuenta diferentes variables y modelos para hacer estimaciones cuantitativas más precisas.

## **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

Determinar el riesgo potencial para la salud que representan los virus entéricos en cuerpos de agua localizados en el norte del Estado de Quintana Roo.

## **Objetivos particulares**

- Determinar la correlación entre los parámetros fisicoquímicos del agua y la concentración de los genotipos virales
- Predecir los riesgos potenciales para la salud en diferentes cuerpos de agua de uso recreativo en la región con base en las concentraciones de los genotipos virales detectados

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Análisis estadísticos**

Para determinar si los parámetros fisicoquímicos pueden afectar la presencia de los virus en los ambientes analizados en las dos temporadas (lluvias y secas) y por lo tanto influir como un factor de riesgo se realizó el análisis por PERMANOVA y regresión múltiple.

#### **1.1. PERMANOVA**

Se realizó un análisis PERMANOVA, basado en la medición de distancias Bray-Curtis y el uso del análisis de permutaciones (Anderson 2001). De esta forma se verificó la existencia de diferencias en la concentración de Norovirus GI y GII en cuanto a la variabilidad temporal (lluvias y secas) y tipo de agua (dulce y salobre).

Para este análisis se aplicó un modelo con dos niveles fijos y 9999 permutaciones en el programa PRIMER V6 (K. R. Clarke & R. N. Gorley, 2006).

## **1.2. Regresión múltiple**

Se utilizó una regresión múltiple con la concentración de Norovirus GI y GII y con parámetros fisicoquímicos (temperatura (°C), pH, Conductividad (ms), OD (% O), SDT, ORP y Log SDT). Este análisis se realizó con el software R (Ricci y Ricci, 2004). Se utilizó una regresión múltiple con la concentración de Norovirus GI y GII y con parámetros fisicoquímicos. Este análisis se realizó con el software R (Ricci y Ricci, 2004).

## **2. Análisis de riesgo: Probabilidad de infección**

El análisis de dosis-respuesta en la zona del acuífero noreste de la PY, se llevó a cabo el análisis de riesgo basado en dos pasos: 1) identificación de los patógenos (base de datos); 2) análisis de exposición. Los análisis estiman el riesgo potencial utilizando un modelo de análisis de riesgo determinístico exponencial en el cual se incluirán valores promedio y supuestos (variables conservadoras) (Gerba, 1996; Haas y Eisenberg, 2001; National Research Council, 1999). Para realizar el análisis de dosis-respuesta en la zona del acuífero noreste de la PY se llevó a cabo el análisis de riesgo basado en dos pasos: 1) identificación de los patógenos (base de datos); 2) análisis de exposición. Los análisis estiman el riesgo potencial utilizando un modelo de análisis de riesgo determinístico exponencial en el cual se incluirán valores promedio y supuestos (variables conservadoras) (Gerba, 1996; Haas y Eisenberg, 2001; National Research Council, 1999).

## 2.1. Norovirus

Para el análisis de dosis-respuesta se calculó la probabilidad estimada de contraer una infección en un día ( $P_{inf/día}$ ) (Ecuación 5). Los parámetros utilizados en el modelo para estimar los posibles riesgos a la salud fueron: la concentración de cada virus en el agua (obtenida mediante el factor volumétrico aplicado a los resultados de qPCR para NoV GI y GII) que involucra la tasa de recuperación (40% aproximadamente) (Hill et al., 2005), la reducción por el tratamiento (es 0 debido a que el agua superficial no lleva un tratamiento), ID50 (100 personas) (Masago et al., 2006), una variable dosis respuesta, el volumen de agua consumida debido a actividades recreativas (0.1 L), el parámetro de dosis-respuesta particular (0.00374 para NoV GI y GII) para cada especie viral, el radio de infectividad de cada especie viral y la fracción de partículas virales viables, considerando a todas las partículas virales viables (Ecuación 4) (Venter et al., 2007).

*Ecuación 4*

$$N = C_0 \left(\frac{1}{R}\right) I (10)^{-DR} V_c \quad (\text{Venter et al., 2007})$$

*Ecuación 5*

$$P_{inf} día^{-1} = 1 - \exp(-rN) \quad (\text{Venter et al., 2007})$$

Variables:

$P_{inf} día^{-1}$  = Probabilidad de infección por dosis diaria de exposición

N = Número de partículas virales ingeridas

$C_0$  = Número promedio de partículas virales (copias  $L^{-1}$ )

R = Eficiencia de recuperación del sistema de filtrado

I = Fracción viral patógena (viabilidad)

DR = Eficiencia del tratamiento de inactivación

$V_c$  = Dosis diaria de exposición ( $L día^{-1}$ )

$r$  = Parámetro dosis respuesta

$ID_{50}$  = Dosis media de infección

**Tabla 15.** Sumario de parámetros del modelo determinístico para estimar la probabilidad de riesgo de infección por NoV GI, GII.

<b>Parámetros del modelo</b>	<b>NoV GI y GII</b>	<b>Unidades</b>
<i>Numero promedio de partículas virales (<math>C_0</math>)</i>	copias L <sup>-1</sup>	
<i>Eficiencia de recuperación del sistema de filtrado (<math>R</math>)</i>	40%	
<i>Eficiencia del tratamiento de inactivación (<math>DR</math>)</i>	0	
<i>Fracción viral patógena (<math>I</math>)</i>	1	
<i>Dosis diaria de exposición (<math>V_c</math>)</i>	0.1	L día <sup>-1</sup>
<i>Parámetro dosis respuesta (<math>r</math>)</i>	0.00374	

## 2.2. Reovirus

Para la especie Reovirus fue utilizado el modelo Beta-Poisson, el cual consiste en una distribución de probabilidad discreta que es expresada a partir de una frecuencia de ocurrencia media. El espacio muestral en un modelo de Poisson se genera por un número muy grande de repeticiones de un experimento cuyo modelo de probabilidad es el de Bernoulli, con probabilidad de éxito muy pequeña. Por este motivo, a la distribución de Poisson se le suele llamar de “eventos raros” (Arroyo, 2014). Este modelo ha sido utilizado por diversos autores (Gerba et al., 1996; Payment y Morin, 1990; Ward et al., 1986) para el estudio de ReoV y rotavirus, por



lo cual se tienen caracterizadas las variables del modelo ( $\alpha$  y  $\beta$ ) obtenidas a partir de experimentos de dosis respuesta propuestos por los autores mencionados anteriormente. El modelo Beta-Poisson aplicado al cálculo de la  $P_{inf}/día$  presenta el siguiente desarrollo:

Ecuación 6

$$P_{inf} \text{ día}^{-1} = 1 - \left[ 1 + N \frac{1}{ID_{50}} \right]^{-\alpha}$$

En donde:

$P_{inf} \text{ día}^{-1}$  = Probabilidad de infección por dosis diaria de exposición

N = Número de partículas virales ingeridas

$ID_{50}$  = Dosis media de infección

$\alpha$  = Variable del modelo Beta-Poisson (Ward et al., 1986)

## RESULTADOS

### 1. Parámetros fisicoquímicos

Se utilizaron los parámetros físico-químicos por triplicado obtenidos en cada sitio de colecta por el grupo del laboratorio de biología molecular. Para la temporada de lluvias y secas se obtuvieron las medias de los parámetros fisicoquímicos para cada sitio (todas las mediciones de los parámetros fueron tomadas por triplicado) ver **Tabla 17 y Tabla 17**. Las medias se utilizaron para realizar los análisis de correlación.

**Tabla 16** Parámetros fisicoquímicos correspondientes a la temporada de lluvias (Agosto-Octubre, 2015). Los valores presentados representan las medias aritméticas obtenidas para cada parámetro tomado por triplicado.

Parámetros	Sitios									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Temperatura (°C)</i>	27.180	27.230	29.917	28.597	25.215	25.897	24.800	28.777	28.750	30.330
<i>pH</i>	7.490	8.217	8.187	8.587	7.955	7.703	7.503	8.407	8.140	8.207
<i>Conductividad (ms)</i>	0.213	0.935	0.499	0.842	0.947	0.946	1.134	1.021	45.777	41.280
<i>OD (% O)</i>	22.800	14.500	61.900	26.833	6.000	40.433	5.167	98.300	4.900	41.100
<i>SDT</i>	0.138	0.607	0.325	0.547	0.660	0.615	0.737	0.664	29.767	26.837
<i>ORP</i>	5.800	60.533	76.167	70.033	64.250	114.567	94.467	111.067	23.436	16.633
<i>Log SDT</i>	-0.860	-0.216	-0.488	-0.26	-0.18	-0.21	-0.132	-0.178	1.47	1.42

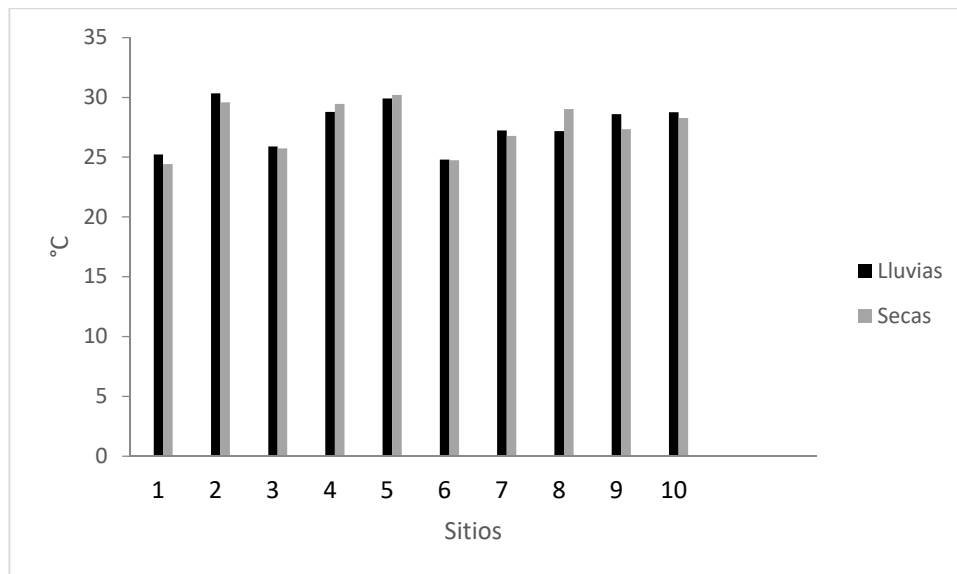
En temporada de lluvias se obtuvieron rangos de temperatura de los 24.8°C (sitio 7) hasta los 30.3°C (sitio 10). Los sitios que presentaron una temperatura superficial por debajo a los 25.5°C fueron dolinas de agua dulce con estructura cavernosa (que no están al aire libre) como sitio 5 y 7, los sitios que se encuentran totalmente a aire libre presentaron temperaturas superficiales superiores a los 25.5°C.

**Tabla 17** Parámetros fisicoquímicos correspondientes a la temporada de secas (febrero-Mayo, 2016). Los valores presentados representan las medias aritméticas obtenidas para cada parámetro tomado por triplicado.

Parámetros	Sitios									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Temperatura (°C)</i>	27.350	30.200	28.310	27.350	24.420	25.737	30.200	29.463	28.290	29.597
<i>pH</i>	8.343	8.550	8.510	8.343	7.580	7.793	8.550	8.647	8.487	8.273
<i>Conductividad (ms)</i>	0.846	0.514	40.790	0.846	1.010	1.021	0.514	1.030	40.830	31.623
<i>SDT</i>	379.900	453.300	26.520	0.550	0.656	0.664	453.300	0.669	26.573	20.593
<i>ORP</i>	-0.260	-0.477	169.000	379.900	260.600	385.100	-0.477	327.833	156.333	291.700
<i>Log SDT</i>	2.57	2.65	1.42	-0.25	-0.18	-0.17	2.65	-0.17	1.42	1.31

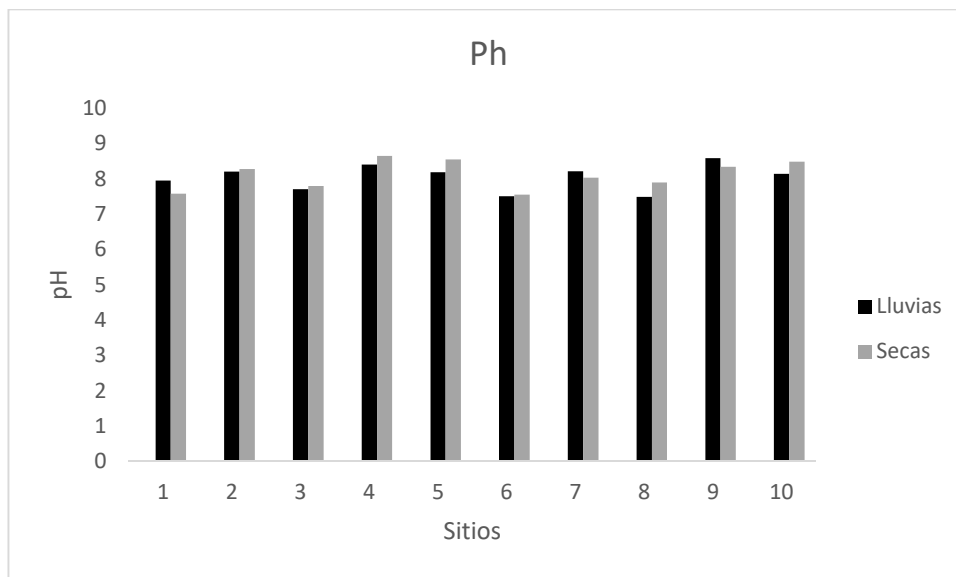
Para secas obtuvieron rangos de temperatura de los 25.73°C (sitio 6) hasta los 30.20°C (sitio 3). Se observó un patrón similar en la temperatura en comparación de la temporada de secas en las dolinas (cenotes) de agua dulce con estructura

cavernosa, que presentaron temperatura superficial por debajo a los 25.5°C (sitio 5 y 7), por otro lado, los sitios que se encuentran totalmente a aire libre presentaron temperaturas superficiales superiores a los 25.5°C.



**Figura 27** Temperatura media registrada en temporada de lluvias y secas en los diferentes sitios de muestreo.

La **figura 28** muestra la variación de temperatura entre temporada de lluvias y secas para cada sitio. Las variaciones de temperatura entre temporadas van de entre los 0.18°C en el sitio 8 (dolina de agua dulce), hasta los 3°C en el sitio 10 (laguna costera, agua salobre). Estas variaciones son consideradas en el análisis estadístico para determinar si la temperatura está relacionada con la presencia de partículas virales.



**Figura 28.** pH promedio registrado en la temporada de lluvias y secas en los diferentes sitios de muestreo.

La **figura 29** muestra la variación de pH entre temporada de lluvias y secas para cada sitio. Las variaciones de pH entre temporadas van de entre los 0.07 unidades en sitio 2, hasta 0.903 unidades en el sitio 7. Estas variaciones son consideradas en el análisis estadístico para determinar si la variación en el pH está relacionada con la presencia de partículas virales.

## 1.1. Análisis estadístico

### 1.1.1. PERMANOVA

Las diferencias entre la prevalencia de NoV GI y GII fue evaluada a través de un análisis de PERMANOVA. Se obtuvieron probabilidades específicas para cada interacción: NoV: Época climática, NoV: tipo de agua y NoV: época: tipo de agua. Los valores de  $P(\text{prmanova})$  para NoV GI y GII, en cuanto a la época climática (temporada de muestreo) y el tipo de agua (salobre o dulce) estuvieron en el rango de 0.107 hasta 0.2587 para GI y 0.481 a 0.7005 para GII. Por lo tanto, se asume

que con los valores obtenidos, no existen diferencias en cuanto a la variabilidad temporal de los parámetros fisicoquímicos y en cuanto al tipo de agua (**Tabla 18 y** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), a pesar de las variaciones encontradas entre los parámetros medidos *in situ* en temporada de lluvias y secas de cada sitio.

**Tabla 18** Resultados del análisis de PERMANOVA de dos vías para determinar la influencia de la época climática (lluvias y secas) y el tipo de agua (dulce y salobre) en la concentración de NoV GI.

Variable	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	perms
Época climática	1	3739.9	3739.9	1.4167	0.239	9947
Tipo de agua	1	5252	5252	1.9896	0.107	9947
Época x Tipo de agua	1	3502.7	3502.7	1.3269	0.2587	9954
Res	16	42237	2639.8			
Total	19	54731				

**Tabla 19** Resultados del análisis de PERMANOVA de dos vías para determinar la influencia de la época climática (lluvias y secas) y el tipo de agua (dulce y salobre) en la concentración de NoV GII.

Variable	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	perms
Época climática	1	1818.1	1818.1	0.70219	0.4929	9893
Tipo de agua	2	2985.7	1492.9	0.57656	0.7005	9819
Época x Tipo de agua	2	4497.8	2248.9	0.86855	0.481	9917
Res	14	36249	2589.2			
Total	19	45551				

### 1.1.2. Regresión múltiple

Los valores de p para el análisis por regresión múltiple para NoV GI y GII (0.5438 y 0.6047 respectivamente) muestran que, no se encontró relación entre las concentraciones de Norovirus GI y Norovirus GII con las variables de Temperatura (° C), pH, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y SDT (g/L), ver **Tabla 20** y **Tabla 21**.

**Tabla 20** Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de NoV GI. Se muestra el valor de T para cada variable evaluada.

Norovirus GI	T
<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	
Temperatura (° C)	0.414
pH	0.176
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	0.677
TDS (g/L)	0.666
R2	-0.0439
Valor-p	<b>0.5438</b>
Residual standard error (RMS)	158.3

**Tabla 21** Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de Norovirus GII. Se muestra el valor de T para cada variable.

Norovirus GII	T
<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	
Temperatura (° C)	0.3355
pH	0.2519
Conductividad (µS/cm)	0.0866
TDS (g/L)	0.08
R2	0.2814
Valor-p	<b>0.6047</b>
Residual standard error (RMS)	1388

## 2. Análisis de riesgo

En base al modelo exponencial propuesto por Venter et al., 2007), se obtuvieron los valores de  $P_{inf}$  para los sitios ambientales, en las siguientes tablas se muestran los sitios que resultaron positivos para NoV GI, GII y ReoV con sus respectivos porcentajes de  $P_{inf}$ .

### 2.1. Norovirus GI

Para NoV GI se detectaron valores de  $P_{inf/dia}$  que van de  $5.7 \times 10^{-1}$  (sitio 6) hasta  $9.9 \times 10^{-1}$  (sitio 4) en temporada de lluvias (**Tabla 20**). El riesgo diario estimado para Norovirus GI durante la temporada de lluvias se presentó en cinco sitios (1, 2, 4, 5 y 6). El riesgo diario estimado de infección fue de 570 a 1000 infecciones por cada 1000 bañistas (**Tabla 20**). En este caso el riesgo más alto de infección se presentó en una dolina de agua dulce de tipo urbano durante la temporada de lluvias.

## 2.2 Norovirus GII

Para NoV GII se obtuvieron  $P_{inf/dia}$  que van de  $7.0 \times 10^{-2}$  (sitio 2) hasta  $8.6 \times 10^{-1}$  (sitio 4) (). Por otro lado, en temporada de secas se obtuvieron valores de  $7.1 \times 10^{-2}$  (sitio 7) hasta  $7.8 \times 10^{-1}$  (sitio 2) (**Tabla 21**). Para Norovirus GII el riesgo de infección diario se detectó en tres sitios durante la temporada de lluvias (2, 4 y 5) y en cuatro sitios (2, 5, 6 y 7) durante la temporada de secas. El riesgo diario de infección se presentó en un rango de  $7.1 \times 10^{-2}$  hasta  $7.8 \times 10^{-1}$  (**Tabla 21**). En este caso el riesgo más alto de infección se presentó en una dolina de agua dulce de uso recreativo durante la temporada de lluvias y en una dolina de agua dulce de tipo urbano durante la temporada de secas.

**Tabla 22** Valores de riesgo diario de infección asociados con Norovirus GI y Norovirus GII, en las muestras de agua del norte de Quintana Roo.

Tipo de agua	Sitio	Norovirus GI		Norovirus GII	
		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Dolinas agua dulce urbanos, alta densidad poblacional	1	1	0	0	0
	2	$8.8 \times 10^{-1}$	0	$7.0 \times 10^{-2}$	$7.8 \times 10^{-1}$
	3	0	0	0	0
	4	$9.9 \times 10^{-1}$	0	$8.6 \times 10^{-1}$	0
Dolinas agua dulce uso recreativo	5	$9.6 \times 10^{-1}$	0	$8.4 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-1}$
	6	$5.7 \times 10^{-1}$	0	0	$2.7 \times 10^{-1}$
	7	0	0	0	$7.1 \times 10^{-2}$
	8	0	0	0	0
Agua salobre	9	0	0	0	0
Sistema Lagunar alta densidad poblacional	10	0	0	0	0
Uso recreativo					

\*Parámetros utilizados I=0.5, r=0.4172, R=40%, Vc=0.1; \*\*I=0.4, r=0.069, R=40%, Vc=0.1

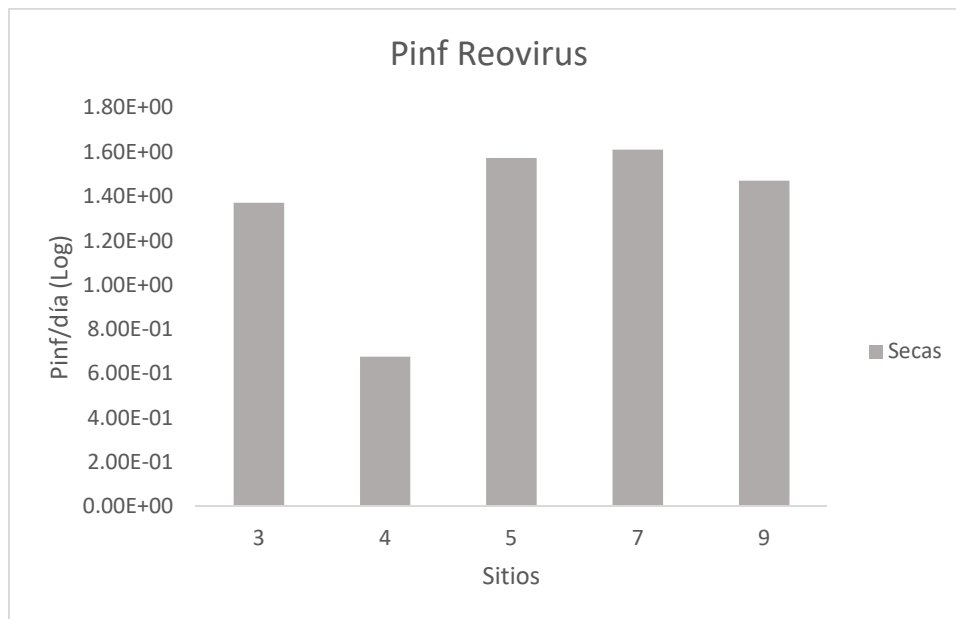


## 2.3 Reovirus

Para ReoV se obtuvieron valores de  $P_{inf/día}$  que van de  $3.38 \times 10^{-2}$  hasta  $2.11 \times 10^{-1}$ . Los porcentajes de infección por ReoV llegaron a valores máximos de  $2.11 \times 10^{-1}$   $P_{inf/día}$ , esto implica que, de cada 100 usuarios, 21 podrían contraer una infección entérica por ReoV asumiendo la homogeneidad del cuerpo de agua y una concentración viral estática (**Tabla 23 y figura 30**).

**Tabla 23** Probabilidad de infección en base a una dosis de 0.1 L por exposición en los sitios positivos para ReoV diferentes sitios ambientales en temporada de **secas**. En Negritas se muestran los valores más altos de  $P_{inf}$  % con una ID50 de 100.

Sitio	$C_0$ (copias L <sup>-1</sup> )	N (copias L <sup>-1</sup> )	$P_{inf/día}$
<b>4</b>	$3.20 \times 10^1$	0.08000729	$4.26 \times 10^{-2}$
<b>5</b>	$2.64 \times 10^2$	0.66072751	$2.11 \times 10^{-1}$
<b>6</b>	$1.92 \times 10^1$	0.04808274	$2.67 \times 10^{-2}$
<b>7</b>	$1.76 \times 10^1$	0.04398148	$2.45 \times 10^{-2}$
<b>9</b>	$2.48 \times 10^1$	0.06200761	$3.38 \times 10^{-2}$



**Figura 29** Probabilidad de infección por exposición diaria, expresada en Log en temporada de secas en base al modelo probabilístico "Beta-Poisson".

## DISCUSIÓN

Las variaciones en las concentraciones virales por sitio, podrían estar ligadas con los fenómenos pluviales y la remoción de sedimento y el uso que cada cuerpo de agua tiene; si es de uso recreativo o si recibe descargas directas de alguna población cercana (López-Pila y Szewzyk, 2000). Los rangos de temperatura (de los 24°C hasta los 33°C) y pH (7.4 a 8.5) registrados en los muestreos están dentro de los rangos reportados por Schmitter-Soto et al., en 2002) en sistemas kársticos de la península de Yucatán, que van de 26.4°C a 33.5°C y de 7.5 a 10.3 unidades de pH.

El análisis PERMANOVA demostró que estadísticamente no fue posible demostrar que el tipo de agua (dulce o salobre) y las temporadas climáticas fueron un factor determinante para la presencia de NoV GI y GII en los sitios de muestreo. Por otro lado, el análisis de regresión variable se obtuvo un valor-p diferente de cero (0.66), lo cual nos indica que no son estadísticamente significativas las variables fisicoquímicas evaluadas (temperatura, pH, SDT y conductividad) (Peixoto et al.,

2012). La presencia de patógenos de tipo virales es un indicador de contaminación fecal (Nacional et al., 1994). El monitoreo permitirá saber si existen patrones o ciclos que ayuden a determinar las fuentes directas e indirectas de contaminación por desechos orgánicos en los cuerpos de agua, que podrían causar graves problemas de salud pública a mediano y largo plazo, sin contar las implicaciones económicas y sociales que se desencadenarían, siendo la ciudad de Cancún el primer destino turístico de México (INEGI, 2014).

En el análisis de riesgo se encontraron porcentajes importantes de Pinf/día, los valores máximos calculados fueron para NoV GI en el sitio 1 con un 100% de Pinf/día. Estos valores indican un problema emergente en el agua del acuífero, si bien estos sitios no se usan de modo recreacional, si tienen contacto con el acuífero. En general los NoV son prevalentes en las muestras de agua y presentan riesgos asociados a la probabilidad de infección bajo diferentes escenarios de exposición en ambientes acuáticos (Vergara et al., 2016). Los análisis de riesgo calculados se basaron en el modelo propuesto por Venter y colaboradores en el año 2007, en donde los valores reportados para la probabilidad de infección (debido a que se utilizaron concentraciones de HAV) fueron mucho más bajos que los valores calculados en el presente trabajo para NoV. Lo anterior puede deberse a que en el presente trabajo se utilizaron los valores promedio obtenidos de la cuantificación por qPCR para cada virus, mientras que en otros trabajos las concentraciones promedio se obtuvieron con base en un cálculo aproximado las cuales pueden estar muy por debajo de las concentraciones reales (Venter et al., 2007). Por lo tanto, los análisis del riesgo de infección dependen de las concentraciones virales obtenidas, de la eficiencia del sistema de recuperación y de las técnicas aplicadas durante cada paso desde que se colecta la muestra hasta que se obtiene la cuantificación de los virus (Venter et al., 2007). Es importante continuar determinando los riesgos potenciales para la salud que los virus entéricos representan para la salud en la PY, tomando en cuenta diferentes variables y modelos para hacer estimaciones cuantitativas más precisas.

## CONCLUSIÓN

Es importante determinar la influencia que los diferentes parámetros físico-químicos o los diferentes tipos de agua tienen sobre las concentraciones virales. Lo anterior permite predecir o asociar la ocurrencia de ciertos tipos virales en diferentes ambientes. Sin embargo, en el acuífero cárstico las condiciones se consideran muy homogéneas y los resultados demostraron que no existe diferencia significativa entre las concentraciones virales y las épocas climáticas, los parámetros físico-químicos y los tipos de agua bajo estudio. La presencia de los virus entéricos encontrados en los cuerpos de agua bajo estudio representa riesgos para la salud pública especialmente en sitios de uso recreativo. Los resultados obtenidos estimaron una probabilidad de infección por día ( $P_{inf/día}$ ) variable para las diferentes especies virales bajo estudio que varió dependiendo del sitio y de las temporadas climáticas. En general, las estimaciones de los riesgos para la salud indican que existe un mayor riesgo en sitios de uso recreativo para el caso de NoV GI y GII durante la temporada de lluvias.

## **PERSPECTIVAS**

El presente trabajo se basó en la identificación y cuantificación de contaminantes de tipo viral en dolinas (cenotes) de agua dulce de uso recreativo, cuerpos de agua salobre y el efluente de una planta de tratamiento, en el norte de Quintana Roo. Así como el estudio de las posibles correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos temporales de los cuerpos de agua con la presencia/ausencia de contaminantes de tipo viral y un modelo probabilístico clásico adaptado a las características específicas de la metodología empleada para concentrar partículas virales, con el propósito determinar los posibles riesgos a la salud que la presencia de estos agentes patógenos implica en diversas temporadas y concentraciones. Sin embargo, un modelo probabilístico representa solo las condiciones del momento en el que fue tomada la muestra, lo cual hace imposible la proyección del riesgo potencial a la salud en caso de eventos futuros o constantes de contaminación, sin un monitoreo permanente de los cuerpos de agua y la caracterización de fuentes de contaminación, así también la asociación filogeografía de genotipos virales daría una perspectiva más amplia de la llegada de patógenos foráneos, producto de la intensa actividad turística. Las metodologías a desarrollarse para la caracterización de fuentes de contaminación, la filogeografía y el monitoreo periódico del acuífero serán un parte aguas para la investigación integral de patógenos de tipo viral en toda la península de Yucatán que permitirá conocer, explicar y prevenir los eventos que afectan o puedan afectar la calidad del agua en el acuífero.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, George D. Harris V.D., Darwin L. Sorensen, M. S. C. (1987). Ultraviolet inactivation of selected viruses with photoreactivation of the bacteria. *Water Research*, 21, 687–692.
- Antonio, J., Contreras, V., Fuentes, H. R., Javier, E., & Alejo, S. (2010). Virus Entéricos y Salud Pública, 5(60), 582–589.
- Arana, A., Cilla, G., Montes, M., Gomariz, M., & Pérez-Trallero, E. (2014). Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. *PloS One*, 9(6), e98875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098875>
- Arcos Pulido, D. P. M., Ávila De Navia, S. L., Estupiñán Torres, M. S., & Gómez Prieto, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4), 69–79. Retrieved from [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf)
- Arroyo, I., Bravo M, L. C., Nat Humberto Llinás, R., & Fabián Muñoz, M. L. (2014). Distribuciones Poisson y Gamma: Una Discreta y Continua Relación Poisson and Gamma Distributions: A Discrete and Continuous Relationship, 12(1), 99–107. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v12n1/v12n1a12.pdf>
- Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R. N., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., & Merediz-Alonso, G. (2011). Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 19(3), 507–524. <https://doi.org/10.1007/s10040-010-0699-5>
- Beddows, P., & Blanchon, P. (2002). Los cenotes de la península de Yucatán.
- Berard, A., & Coombs, K. M. (2009). Mammalian reoviruses: Propagation, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, (SUPPL. 14), 1–18. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15c01s14>
- Berger, P. (2008). *VIRUSES IN GROUND WATER PHILIP BERGER \* Office of*

*Ground Water and Drinking Water, US Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460.*

Betancourt, W. Q. (2016). Rethinking the Significance of Reovirus in Water and Wastewater. *Food and Environmental Virology*, 8(3), 161–173. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9250-8>

Betancourt, W. Q., & Gerba, C. P. (2016). Rethinking the Significance of Reovirus in Water and Wastewater. *Food and Environmental Virology*, 8(3), 161–173. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9250-8>

Biassoni, R., & Walker, J. M. (2014). *Quantitative Real-Time PCR* (Vol. 1160). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5>

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388356>

Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., la Rosa, G., Iaconelli, M., Muscillo, M., ... Girones, R. (2010). Quantification of human adenoviruses in European recreational waters. *Food and Environmental Virology*, 2(2), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s12560-010-9035-4>

Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Pintó, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>

Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Cella, E., Lo Presti, A. Costantino, A., Chionne, P., Madonna, E., Golkocheva-Markova, E. Bankova, D., Ciccozzi, M., Teoharov, P. and Ciccaglione, A. R. (2016). Hepatitis A virus genotypes and strains from an endemic area of Europe, Bulgaria 2012-2014. *Submitted (15-SEP-2016) Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore Di Sanita, Viale Regina Elena n.299, Rome 00161, Italy.*

Carter, J., & Saunders, V. A. (2007). *Virology*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2016). Norovirus |

Norovirus en el mundo | CDC. Retrieved April 2, 2017, from <https://www.cdc.gov/norovirus/worldwide-sp.html>

Chan, M. C. W., Lee, N., Hung, T.-N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E. K. Y., ... Chan, P. K. S. (2015). Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nature Communications*, 6, 10061. <https://doi.org/10.1038/ncomms10061>

Chen, S.-Y., Tsai, C.-N., Huang, W.-L., Chen, C.-L., Lin, C.-Y., Chao, H.-C., ... Chiu, C.-H. (2015). Emergence in Taiwan of novel norovirus GII.4 variants causing acute gastroenteritis and intestinal haemorrhage in children. *Journal of Medical Microbiology*, 64(5), 544–550. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000046>

Chigor, V. N., & Okoh, A. I. (2012). Quantitative RT-PCR detection of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and source water dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(11), 4017–4032. <https://doi.org/10.3390/ijerph9114017>

Chironna, M., Grottola, A., Lanave, C., Villa, E., Barbuti, S., & Quarto, M. (2003). Genetic analysis of HAV strains recovered from patients with acute hepatitis from Southern Italy. *Journal of Medical Virology*, 70(3), 343–349. <https://doi.org/10.1002/jmv.10402>

Chizhikov, V. (2012). Direct Submission. *Submitted (20-JAN-2012) DHHS, CBER, FDA, HFM-470, 1401 Rockville Pike, Rockville, MD 20852-1448, USA.*

CONAGUA. (2015). *Situación del Subsector Agua Potable, Drenaje y Saneamiento*. Retrieved from [www.gob.mx/semaarnt](http://www.gob.mx/semaarnt)

Coralie Coudray-Meunier a Audrey Fraisse a Sandra Martin-Latil a Laurent Guillier b Sabine Delannoy c Patrick Fach c Sylvie Perelle a. (2015). A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.02.006>



- Cordeiro, N., Taroco, R., & Chiparelli, H. (2008). Virus de las hepatitis, 477–514.
- Cotten, M., Petrova, V., Phan, M. V. T., Rabaa, M. A., Watson, S. J., Ong, S. H., ... Baker, S. (2014). Deep Sequencing of Norovirus Genomes Defines Evolutionary Patterns in an Urban Tropical Setting. *Journal of Virology*, *88*(19), 11056–11069. <https://doi.org/10.1128/JVI.01333-14>
- D'Ugo, E., Marcheggiani, S., Fioramonti, I., Giuseppetti, R., Spurio, R., Helmi, K., ... Mancini, L. (2016). Detection of Human Enteric Viruses in Freshwater from European Countries. *Food and Environmental Virology*, *8*(3), 206–214. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9238-4>
- Dermody, T. S., Parker, J. S. L., & Sherry, B. (2013). Fields Virology. In *Fields Virology* (pp. 1304–1346).
- Dinu, S., Nagy, M., Negru, D., Popovici, E., Zota, L., & Opreșan, G. (2015). Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *Euro Surveill*, *21*(7). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.7.30141>
- Dirección general de comunicación social. (2014). Secretaria de turismo: monitoreo. Retrieved February 6, 2018, from <http://www.datatur.sectur.gob.mx/Contenedor de Noticias/CANCUN Y LA RIVIERA MAYA LOS DESTINOS MÁS VISITADOS POR EL TURISMO INTEARNACIONAL.aspx>
- Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., & Baric, R. S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews*, *225*(1), 190–211. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00680.x>
- Dong, L., Lv, L.-B., & Lai, R. (2012). *Molecular cloning of Tupaia belangeri chinensis neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates. Zool. Res.* (Vol. 33). <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>
- Douville, R. N., Su, R.-C., Coombs, K. M., Simons, F. E. R., & Hayglass, K. T. (2008). Reovirus serotypes elicit distinctive patterns of recall immunity in humans. *Journal of Virology*, *82*(15), 7515–7523. <https://doi.org/10.1128/JVI.00464-08>

Environmental Protection Agency. (1990). *Guia Para La Proteccion De Las Aguas Subterraneas*.

Espinosa, A. C., Arias, C. F., Sánchez-Colón, S., & Mazari-Hiriart, M. (2009). Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 8, 49. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-49>

Estrada-Acosta, M., Jiménez, M., Chaidez, C., León-Félix, J., & Castro-Del Campo, N. (2014). Irrigation water quality and the benefits of implementing good agricultural practices during tomato (*Lycopersicon esculentum*) production. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4323–4330. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3701-1>

Eydal, H. S. C. (2009). *Microbial ecology in deep granitic groundwater – activity and impact of viruses*.

Falcon-Acosta, J.I., Alcantara-Perez, P.A., Vazquez-Campuzano, R., Anguiano-Moreno, R.J., Del Mazo-Lopez, J.C., Escobar-Escamilla, N., Gonzalez-Villa, M., Lopez-Martinez, I., Diaz-Quinonez, J. A. and, & Ramirez-Gonzalez, J. E. (2014). Design and validation of a Real-Time RT-PCR protocol for molecular diagnosis of HAV, HBV, HCV and HEV. *Submitted (13-OCT-2014) Biología Molecular Y Validación de Técnicas, Instituto de Diagnóstico Y Referencia Epidemiológicos, Francisco de P Miranda 177 Bis, Lomas de Plateros, Alvaro Obregón, México, DF 01480, México*.

Faust, B. B. (2001). Maya environmental successes and failures in the Yucatan Peninsula. [https://doi.org/10.1016/S1462-9011\(01\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S1462-9011(01)00026-0)

Félix, J. L., Fearnandez, Y. C., Velarde-Félix, J. S., Torres, B. V., & Cháidez, C. (2010a). Detection and phylogenetic analysis of hepatitis a virus and norovirus in marine recreational waters of Mexico. *Journal of Water and Health*, 8(2), 269–278. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.114>

Félix, J. L., Fearnandez, Y. C., Velarde-Félix, J. S., Torres, B. V., & Cháidez, C.

- (2010b). Detection and phylogenetic analysis of hepatitis A virus and norovirus in marine recreational waters of Mexico. *Journal of Water and Health*, 8(2), 269. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.114>
- Fields, B. N., Knipe, D. M. (David M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books/about/Fields\\_Virology.html?id=5O0somr0w18C&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Fields_Virology.html?id=5O0somr0w18C&redir_esc=y)
- Flores Mejía, M. A., Flores Hernández, M., De La Luz, M., & Miranda, R. (2001). Calidad bacteriológica de las principales playas de la bahía de Acapulco, Guerrero. Retrieved from <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n80ne/playas.pdf>
- Floyd R Sharp D. (1977). Applied and environmental microbiology. *Aggregation of Poliovirus and Reovirus by Dilution in Water.*, 33, 159–167.
- Fong, T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools, 69(2), 357–371. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>
- Fout, G. S., Cashdollar, J. L., Varughese, E. A., Parshionikar, S. U., & Grimm, A. C. (2015). EPA Method 1615. Measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR. I. Collection of virus samples. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (97). <https://doi.org/10.3791/52067>
- Franco, E., Meleleo, C., Serino, L., Sorbara, D., & Zaratti, L. (2012). Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology*, 4(3), 68–73. <https://doi.org/10.4254/wjh.v4.i3.68>
- Gallagher, E. M., & Margolin, A. B. (2007). Development of an integrated cell culture-Real-time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. *Journal of Virological Methods*, 139(2), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.10.001>
- Ganesh, A., & Lin, J. (2013). Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *International Journal of Environmental Health Research*, 23(6), 544–

564. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.769205>

Gao, Z., Yan, H., Liu, B., Jia, L., Zhang, X., Tian, Y., Qian, H., Li, J., Wang, Q. (2016). Short-term Predominance of Norovirus GII.17 variant in Beijing, China, 2014–2015. *Submitted (13-JAN-2016) Institute for Infectious Disease and Endemic Disease Control, Beijing Center for Disease Prevention and Control, No. 16 Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing, Beijing 100013, China.*

García, C., DuPont, H. L., Long, K. Z., Santos, J. I., & Ko, G. (2006a). Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *Jouarnl of Clinical Microbiology*, 44(8), 2997–3000. <https://doi.org/10.1128/JCM.00065-06>

García, C., DuPont, H. L., Long, K. Z., Santos, J. I., & Ko, G. (2006b). Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *Jouarnl of Clinical Microbiology*, 44(8), 2997–3000. <https://doi.org/10.1128/JCM.00065-06>

Gerba, C. P. (2013). Assessment of a Portable Handheld UV Light Device for the Disinfection of Viruses and Bacteria in Water, 87–90. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9103-7>

Gerba, C. P., Rose, J. B., & Haas, C. N. (1996). Sensitive populations: Who is at the greatest risk? *Intearntional Jouarnl of Food Microbiology*, 30(1–2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00996-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00996-8)

Gerba, C. P., Rose, J. B., Haas, C. N., & Crabtree, K. D. (1996). Waterborne rotavirus: A risk assessment. *Water Research*, 30(12), 2929–2940. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00187-X)

Giordano, M. O., Martinez, L. C., Ferreyra, L. J., Isa, M. B., Paez Rearte, M., Pavan, J. V., & Nates, S. V. (2005). Discrepancies in viral gastroenteritis diagnosis: An unusual dual reovirus-adenovirus infection case. *Jouarnl of Clinical Virology*, 32(1), 71–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.08.016>

Gómez Santiago, F., & Fabian. (2011). Diversidad genética de norovirus y sapovirus en México. Retrieved from <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12634?show=full>

- Gonzalez Badillo, B., Lopez Quesada, A., Rios Bacallao, J. and Selman-Housein Sosa, G. (2005). Nucleotide Sequence of the Cuban HAV Strain M2. *Submitted (26-MAR-2005) Plant Biotechnology, Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), 31th Ave, Cubanacan, Playa, Ciudad Habana 10600, Cuba.*
- Grabow, W. O., Taylor, M. B., & de Villiers, J. C. (2001). New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43(12), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464736>
- Haas, C., & Eisenberg, J. N. S. (2001). Risk assessment. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, 161–183.
- Halford, W. P., Falco, V. C., Gebhardt, B. M., & Carr, D. J. J. (1999). The Inherent Quantitative Capacity of the Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 266(2), 181–191. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2913>
- Harada, S. and Nagashima, M. (2015). Detection of HAV in Tokyo (2014). *Submitted (12-DEC-2014) Contact: Sachiko Harada Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Virological Department; 3-24-1 Hyakunintyo, Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan URL.*
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., & Perelle, S. (2014). Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of Norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 179–190. <https://doi.org/10.1111/jam.12345>
- Hernández Cortez, C., Aguilera Arreola, M. G., & Castro Escarpulli, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- Hernández Morga, J. (2007). *Concentración por ultrafiltración de virus entéricos en el agua del complejo lagunar Huizache Caimanero, Sinaloa. Culiacán.*

- Hill, V. R., Polaczyk, A. L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Roberts, J. M., & Amburgey, J. E. (2005). Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6878–6884. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005>
- Ikner, L. a., Gerba, C. P., & Bright, K. R. (2012). Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food and Environmental Virology*, 4(2), 41–67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>
- INEGI. (2014). INEGI. Retrieved November 11, 2015, from <http://www.inegi.org.mx/>
- Jacobsen, K. H., & Wiersma, S. T. (2010). Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, 28(41), 6653–6657. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037>
- Johnson, T. B., McKay, L. D., Layton, A. C., Jones, S. W., Johnson, G. C., Cashdollar, J. L., ... Saylor, G. (2011). Viruses and Bacteria in Karst and Fractured Rock Aquifers in East Tennessee, USA. *Ground Water*, 49(1), 98–110. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00698.x>
- K. R. Clarke, & R. N. Gorley. (2006). *Primer V6: User Manual - Tutorial* -. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books/about/Primer\\_V6.html?id=fsWqmwEACA&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Primer_V6.html?id=fsWqmwEACA&redir_esc=y)
- Katayama, H., Shimasaki, A., Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal , 68(3), 1033–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033>
- Kim, M.S. Koo, E.S. Choi Y.S., Jeong, Y. S. (n.d.). Distribution of norovirus in seawater and influent water in South Korea. *Submitted (12-AUG-2015) Department of Biology, Kyung Hee Univ., Hoegi-Dong, Dongdaemun-Gu,*

Seoul, Korea 130-701, South Korea.

- Kobayashi, M., Yoshizumi, S., Kogawa, S., Takahashi, T., & Ueki, Y. (2015). Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Nature Publishing Group*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep13806>
- Kong, B.-H., Lee, S.-G., Han, S.-H., Jin, J.-Y., Jheong, W.-H., Paik, S.-Y., ... Paik, S.-Y. (2015). Development of Enhanced Primer Sets for Detection of Norovirus. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/103052>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, msw054. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Letaief, A., Kaabia, N., Gaha, R., Bousaadia, A., Lazrag, F., Trabelsi, H., ... Jemni, L. (2005). Age-specific seroprevalence of hepatitis A among school children in Central Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 40–43. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.40>
- Lim, K. Y., Hamilton, A. J., & Jiang, S. C. (2015). Assessment of public health risk associated with viral contamination in harvested urban stormwater for domestic applications. *Science of the Total Environment*, 523, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.077>
- Lizardi-Jiménez, M. a., Leal-Bautista, R. M., Ordaz, A., & Reyna-Velarde, R. (2014). Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalination and Water Treatment*, (January 2014), 1–6. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.876670>
- López-Pila, J. M., & Szewzyk, R. (2000). Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. *Water Research*, 34(17), 4195–4200. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00197-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00197-4)
- Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., ... Hui, L. (2015). Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China,

2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 21(7), 1240–1242.  
<https://doi.org/10.3201/eid2107.150226>

Manuel, J., Fernández, R., & Gómez, J. B. (2010). y Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1), 51–55.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70009-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70009-4)

Masago, Y., Katayama, H., Watanabe, T., Haramoto, E., Hashimoto, A., Omura, T., ... Ohgaki, S. (2006). Quantitative risk assessment of noroviruses in drinking water based on qualitative data in Japan. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7428–7433. <https://doi.org/10.1021/es060348f>

McDaniels, A. E., Cochran, K. W., Gannon, J. J., & Williams, G. W. (1983). Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. *Water Research*, 17(10), 1349–1353. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90263-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90263-4)

McVey, D. S., Kennedy, M. (Melissa A., & Chengappa, M. M. (2013). *Veterinary microbiology*. Wiley-Blackwell.

Medrano-Félix, a., Martínez, C., Castro-Del Campo, N., León-Félix, J., Peraza-Garay, F., Gerba, C. P., & Chaidez, C. (2011). Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 463–471. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04901.x>

Messner, M. J., Berger, P., & Nappier, S. P. (2014). Fractional poisson - A simple dose-response model for human norovirus. *Risk Analysis*, 34(10), 1820–1829. <https://doi.org/10.1111/risa.12207>

Morales-Morales, H. a., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C. M., Dasgupta, D., Oshima, K. H., & Smith, G. B. (2003). Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4098–4102. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003>

Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE*,



9(9), e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

Nacional, E., Unidos, E., Permisibles, C. H., Tratamientos, D. E. C. Y., Debe, A. Q. U. E., Fearndez, G. O., & Ambiental, G. D. S. (1994). Mexicanos . - Secretaría de Salud .

National Research Council. (1999). Risk Assessment of Radon in Drinking Water, 13(5), 1–296.

Navarre (Spain). Departamento de Salud., C., & Balanzó, X. de. (2006). *Anales del sistema sanitario de Navarra. Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 29). Gobierno de Navarra, Departamento de Salud. Retrieved from [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272006000200012](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000200012)


Nova Ocampo, M. A., & Salas Benito, J. S. (2010). *Desarrollo de un método diagnóstico de tipo PCR múltiple para la detección de patógenos causantes de gastroenteritis aguda en niños*. Retrieved from <http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/8670/1/194.pdf>

O 'ryan, M. L., Vial, P. A., Mamani, N., Jiang, X., Estes, M. K., Ferrecio, C., ... Matson, D. O. (1991). Seroprevalence of Norwalk Virus and Mexico Virus in Chilean Individuals: Assessment of Independent Risk Factors for Antibody Acquisition. *J Infect Dis*. Retrieved from [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/cid/27/4/10.1086/514949/2/27-4-789.pdf?Expires=1489120135&Signature=Pkm6MokxX~kkvdPGZqsNWUY~wOoFhuEdz~YDp1C1D8a70WRLFZW6Z3DycY35g8wVYk25xGj0QicHeVEO4BXbKCcgKrKzrmT1D4HoFUaazBwx0abas0-5VcO](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/cid/27/4/10.1086/514949/2/27-4-789.pdf?Expires=1489120135&Signature=Pkm6MokxX~kkvdPGZqsNWUY~wOoFhuEdz~YDp1C1D8a70WRLFZW6Z3DycY35g8wVYk25xGj0QicHeVEO4BXbKCcgKrKzrmT1D4HoFUaazBwx0abas0-5VcO)

Ongley, E. D. (1997). *Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos*. FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s00.htm#Contents>

Organización Mundial de la Salud. (2000). Chapter 5 Managing Water, 2(August).

Organización Mundial de la Salud. (2014). OMS | Hepatitis A. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/es/>

- Panduro, A., Melendez, G. E., Fierro, N. a, Madrigal, B. R., Zepeda-Carrillo, E. A., & Román, S. (2011). Epidemiology of viral hepatitis in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 53 Suppl 1(2), 37. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342011000700008>
- Panel, E., & Biohaz, H. (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin . Part 1 ( outbreak data analysis and risk ranking of food / pathogen, 11(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3025>.
- Payment, P., & Morin, . (1990). Minimal infective dose of the OSU strain of porcine rotavirus. *Archives of Virology*, 112(3–4), 277–282. <https://doi.org/10.1007/BF01323172>
- Peixoto, G., Cañedo, M., & Iglesias, -Argüelles. (2012). Evaluación de las respuestas de la comunidad de macroinvertebrados acuáticos a la salinización a través del uso de mesocosmos. Retrieved from [http://www.ub.edu/fem/docs/treballs/TFM\\_GPeixoto\\_SalMesocosmos.pdf](http://www.ub.edu/fem/docs/treballs/TFM_GPeixoto_SalMesocosmos.pdf)
- Pina, S., Girones, R., Jofre, J., Clemente-Casares, P., Jardí, R., & Buti, M. (2001). Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Jouarnl of General Virology*, 82(12), 2955–2963. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-2955>
- Post, D. A., & Jakeman, A. J. (1993). *Impact of Rainfall on Turbidity and Suspended Sediment Load at Five Sites on the Murray River Between Albury and Swan Hill and Possible Relationships to Catchment Attributes*. Canberra.
- R Floyd. (1979). Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 980–986.
- Ricci, V., & Ricci, V. (2004). R : un ambiente opensource per l'analisi statistica dei dati. *Economia E Commercio*, 1, 69–82.
- Rodríguez, M. & Rodríguez, W., Stock, R. P., & Rodríguez, S. I. (2006). Métodos físico-químicos en Biotecnología (2006-II).
- Roo, C. de agua potable y alcantarillado del E. de Q. (2011). *Programa institucional de in fraestructura hidráulica y sanitaria*.

- Sansores, A. C., Avila, J. P., & Peraza, V. C. (2000). PRESENCIA DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES EN EL AGUA SUBTERRANEA DE UNA GRANJA PORCICOLA EN EL ESTADO DE YUCATAN.
- Sato, H., Nakamura, H. and Motomura, K. (2014). Evidence for antigenic variation in norovirus outbreaks in Japan between 2006 and 2012. *Submitted (02-JUL-2014) Contact: Kazushi Motomura National Institute of Infectious Diseases, Pathogen Genomics Center; Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan.*
- Sattar, S. A., & Springthorpe, V. S. (1999). Reoviruses, In Water-borne Pathogens. *Denver: American Water Works Association.*
- Schmidt, P. J. (2015). Norovirus Dose-Response: Are Currently Available Data Informative Enough to Determine How Susceptible Humans Are to Infection from a Single Virus? *Risk Analysis*, 35(7), 1364–1383. <https://doi.org/10.1111/risa.12323>
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., ... Steinich, B. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1/3), 215–228. <https://doi.org/10.1023/A:1014923217206>
- Science, A., Road, B., & Nothe, T. (2011). UK NRL discussion paper : Detection of norovirus and hepatitis A in bivalve shellfish – current position on methodology and quality assurance.
- Secretaria de Turismo. (2012). SECTUR. Retrieved November 11, 2015, from <http://www.sectur.gob.mx/>
- Shapiro, C. N., & Margolis, H. S. (1993). Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection. *Journal of Hepatology*, 18 Suppl 2, S11-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182265>
- Silverstein, S. C., Christman, J. K., & Acs, G. (1976). The reovirus replicative cycle. *Annual Review of Biochemistry*, 45, 375–408. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.45.070176.002111>

- Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., Heck, T. M. da S., Spilki, F. R., & Almeida, S. E. de M. (2015). QUANTITATIVE VS. CONVENTIONAL PCR FOR DETECTION OF HUMAN ADENOVIRUSES IN WATER AND SEDIMENT SAMPLES. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(4), 299–303. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400005>
- Tong, H. I., Connell, C., Boehm, A. B., & Lu, Y. (2011). Effective detection of human noroviruses in Hawaiian waters using enhanced RT-PCR methods. *Water Research*, 45(18), 5837–5848. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.030>
- Tsatsralt-Od, B., Baasanjav, N., Nyamkhuu, D., Ohnishi, H., Takahashi, M., Kobayashi, T., ... Okamoto, H. (2016). Molecular analysis of hepatitis A virus strains obtained from patients with acute hepatitis A in Mongolia, 2004-2013. *Jouarnl of Medical Virology*, 88(4), 622–630. <https://doi.org/10.1002/jmv.24380>
- Ulsía, U. M. (2012). *ANÁLISIS DE LAS PRÁCTICAS DE VIDA ASOCIADAS A LA BASURA, LOS RESIDUOS Y LOS DESECHOS EN LA POBLACIÓN COSTERA DE SISAL, YUCATÁN: PROPUESTA DE MODELO DE MANEJO*.
- Venter, J. M. E., van Heerden, J., Vivier, J. C., Grabow, W. O. K., & Taylor, M. B. (2007). Hepatitis A virus in surface water in South Africa: what are the risks? *Jouarnl of Water and Health*, 5(2), 229–240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674572>
- ViralZone. (n.d.). ViralZone: Enterovirus. Retrieved April 2, 2017, from [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)
- Walter, R., Dobberkau, H.-J., Bartelt, W., Diener, W., Hartel, I., Heinrich, U., ... Stettinisch9, & B. (1982). Long-term study of virus contamination of surface water in the German Democratic Republic. *Bulletin of the World Health Organization*, 60(5), 789–795.
- Wang, Y., Zhang, J., & Shen, Z. (2015). The impact of calicivirus mixed infection in an oyster-associated outbreak during a food festival. *Jouarnl of Clinical Virology*, 73, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.10.004>
- Ward, R. L., Bernstein, D. I., Young, E. C., Sherwood, J. R., Knowlton, D. R., &

Schiff, G. M. (1986). Human Rotavirus Studies in Volunteers: Determination of Infectious Dose and Serological Response to Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 154(5), 871–880. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.5.871>

WQ, Betancourt, Kitajima M, Wing AD, Regnery J, Drewes JE, Pepper IL, G. C. (2014). Assessment of virus removal by managed aquifer recharge at three full-scale operations. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*.

Xue,L., Wu,Q., Cai,W., Kou,X., Zhang,J. and Guo, W. (2015). Development of a sensitive method for directly sequencing GII.4 Norovirus genome. *Submitted (23-JUN-2015) State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, No. 100, Xianliezhong Road, Yuexiu District, Guangzhou, Guangdong 510070, China.*

Zhang,X., Bilic,I., Troxler,S. and Hess, M. (2016). Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds. *Submitted (22-AUG-2016) Clinic for Poultry and Fish Medicine, Clinic for Poultry and Fish Medicine, University of Veterinary Medicine Vienna, 1210, AUSTRIA.*