



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias del Agua

“Comparación de métodos de concentración y cuantificación para los virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y Adenovirus Humanos (HAdV) en muestras de agua de Quintana Roo, México”

Tesis que presenta

Ramón Vega Vázquez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS DEL AGUA

Cancún, Quintana Roo, México
Septiembre, 2020

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 **Ramón Vega Vázquez** titulado “**Comparación de métodos de concentración y cuantificación para los virus *Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV)* y *Adenovirus Humanos (HAdV)* en muestras de agua de Quintana Roo, México**” fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Ecología y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda y la codirección del Dr. Óscar Alberto Moreno Valenzuela, pertenecientes al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro.

Atentamente



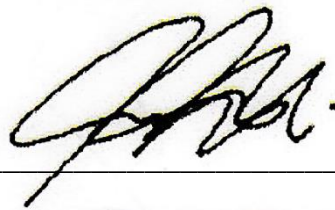
Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 01 de septiembre de 2020 .

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: Ramón Vega Vázquez

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para realizar este posgrado e investigación a través de la beca con número 801217.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. en su Unidad Ciencias del Agua en especial al laboratorio de Biología Molecular. Debo agradecer sin duda a la Dra. Cecilia Hernández Zepeda y al Dr. Oscar M. Valenzuela por confiar en mí al darme la oportunidad de poder realizar este gran proyecto y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, pero sobre todo por introducirme al área de la investigación. Asimismo, al resto de mi comité como el Dr. Eduardo Cejudo y Dr. Cristóbal Chaidez por su interés y aporte para poder llevar a cabo este proyecto

Muy especialmente a la M.C. Gabriela Rosiles González por su apoyo, por dedicarme de su tiempo para explicarme y guiarme en la realización de este proyecto, así como su dedicación y trabajo en equipo; de igual forma, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia al introducirme en el mundo de la Biología Molecular.

A la planta de académicos y técnico de la UCIA, principalmente al Dr. Jesús, Dra. Rosa, Dr. Diego, Dr. Almazán, Q. Daniela y al M.C. Jorge por brindarme sus conocimientos y asesorías en diversos temas.

A mis compañeros de laboratorio como a Gera (el Doc.), Carlos, Tere, César, Jovana, Luis, Víctor, Edén, Randy y Rodrigo por su gran apoyo y su amistad.

A mis compañeras de generación Dani, Evelyn y Vania por su compañerismo y amistad.

Dedicatoria

A Tania, a Boba, a Jade, a Kaylo y a la Tortuninja quienes son mis amores de mi vida que siempre han estado a mi lado incondicionalmente para seguir adelante y hacer todo posible. Pero en especial por llenarme mi corazón de alegría y amor e incluso por quererme tal como soy ♥.

A mi abuela Herlinda y mi madre Leticia por darme la vida, su compañía, los valores que me identifican, la educación y los medios necesarios para realizar este gran logro en mi vida.

A mi sobrina Suemy por siempre saber cómo hacerme reír y aguantar mi mal genio.

A mis amigos del alma Alonso, Jarck, Nangel y Kikon. Más que amigos, ya son parte de mi familia.

A mis amigos que he hecho durante estos últimos años Isabel, Bernardo, Cristina, Gaby, Dani, Sergio, Gera y Carlos. Quienes también formaron parte de esto y me apoyaron en los buenos y malos momentos.

Al final, obtuve más que un título. Una verdadera experiencia enriquecedora.

¡¡¡Muchas gracias a todos!!!

Índice

Agradecimientos	III
Dedicatoria	IV
Índice	V
Listado de abreviaturas	IX
Listado de figuras	XI
Listado de tablas	XIV
Resumen	XVII
Abstract	XIX
1 Introducción	17
2 Antecedentes	19
2.1 Microorganismos presentes en los recursos hídricos	19
2.2 Microorganismos para el control de la calidad del agua	22
2.3 Los virus como indicadores de contaminación fecal en el agua	24
2.4 Virus del Moteado Suave del Pimiento (PMMoV)	25
2.4.1 El PMMoV en alimentos y matrices ambientales	27
2.5 Virus entéricos como indicadores: Adenovirus Humanos (HAdV)	29
2.5.1 Los HAdV en matrices ambientales	30
2.6 Métodos de concentración y detección de virus a partir de muestras ambientales	
33	
2.6.1 Métodos de concentración de virus en agua	33
2.6.2 Métodos empleados para concentración de PMMoV en muestras de agua .	39

2.7	Métodos de detección de virus en agua	43
2.7.1	Detección de virus en agua mediante PCR cuantitativa (qPCR).....	45
2.8	La península de Yucatán: problemática de contaminación del acuífero.....	47
2.9	Contaminación microbiológica del agua en la Península de Yucatán	48
3	Justificación.....	49
4	Hipótesis.....	50
5	Objetivo general	50
6	Objetivos específicos.....	50
7	Materiales y métodos	51
7.1	Estrategia experimental.....	51
7.2	Área de estudio y colecta de muestras de agua.....	52
7.3	Método 1 – Concentración de partículas virales por Ultrafiltración Tangencial (UFT)54	
7.4	Método 2 – Concentración de partículas virales por Filtración de Adsorción-Elución (FAE).....	57
7.5	Método 3 - Concentración de partículas virales por Filtración Adsorción-Elución/Ultrafiltración (FAE/UF)	58
7.6	Cálculo del factor de reducción de las muestras de agua concentradas.....	59
7.7	Extracción de ADN genómico.....	60
7.8	Extracción de ARN genómico.....	61
7.9	Obtención de cDNA.....	62
7.10	Cuantificación de las partículas virales mediante qPCR (PCR cuantitativa) .	62
7.10.1	Curva estándar	62
7.10.2	Cálculo de la concentración viral	63

7.10.3	Cuantificación del PMMoV	64
7.10.4	Cuantificación del HAdV	66
7.11	Evaluación del método óptimo para la detección de PMMoV y HAdV en muestras de agua	69
8	Resultados	69
8.1	Colecta de muestras y parámetros físico-químicos	69
8.2	Concentración de las muestras de agua colectadas	70
8.2.1	Concentración de las muestras de agua por el método 1 (UFT).....	70
8.2.2	Concentración de las muestras de agua por el método 2 (FAE).....	72
8.2.3	Concentración de las muestras de agua por el método 3 (FAE/UF)	73
8.3	Cuantificación del PMMoV mediante qPCR	74
8.3.1	Cuantificación del PMMoV mediante sonda TaqMan.....	74
8.3.2	Cuantificación del PMMoV mediante SYBR Green	78
8.4	Cuantificación del HAdV mediante qPCR.....	81
8.4.1	Cuantificación del HAdV mediante sonda TaqMan	81
8.4.2	Cuantificación del HAdV mediante SYBR Green	83
8.5	Comparación del rendimiento de los métodos para la recuperación y cuantificación para los virus PMMoV y HAdV en las muestras de agua.	86
8.5.1	Ensayo qPCR-sonda TaqMan: PMMoV	86
8.5.2	Ensayo de qPCR-SYBR Green: PMMoV	87
8.5.3	Ensayo qPCR-sonda TaqMan: HAdV	89
8.5.4	Ensayo qPCR-sonda SYBR Green: HAdV.....	90
8.6	Determinación del método óptimo para la cuantificación del PMMoV y del HAdV en muestras de agua	92

8.6.1	Comparación entre métodos para la detección del virus PMMoV.....	92
8.6.2	Comparación entre métodos para la detección del virus HAdV	94
9	Discusión.....	97
9.1	Comparación por métodos de concentración viral.....	99
9.2	Comparación de los métodos de cuantificación viral.....	104
10	Conclusión.....	109
11	Referencias	111
12	Anexos	135
12.1	Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	135
12.1.1	Preparación de células competentes	135
12.1.2	Extracción y purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina:.....	136
12.2	Costos para la cuantificación del PMMoV	136
12.3	Costos para la cuantificación del HAdV	139

Listado de abreviaturas

μL: Microlitro

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

CG/L: Copias de Genoma por Litro

dNTPs: Deoxyribonucleotide Trisphosphate

FAE/UF: Filtración por Adsorción-Elución más Ultrafiltración

FAE: Filtración por Adsorción-Elución

HAdV: Human Adenovirus

Kb: Kilobase

KDa: KiloDalton

L: Litro

M: Molar

mL: Mililitro

MWCO: Molecular Weight Cutt Off

NaPP: Polifosfato de Sodio

nm: Nanómetro

NMP: Numero Más Probable

NoV: Norovirus

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMMoV: *Pepper Mild Mottle Virus*

PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales

PV: Polivirus

PY: Península de Yucatán

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RdRp: RNA dependent RNA polymerase

UFT: Ultrafiltración de Flujo Tangencial

USEPA: United States Environmental Protection Agency

UV: Luz Ultravioleta

WHO: World Health Organization

Listado de figuras

Figura 1. Ruta de transmisión fecal-oral de los virus entéricos humanos en el medio ambiente (Tomada de Pina Pedrero, 2001).....	22
Figura 2. Micrografía electrónica de los viriones del PMMoV obtenidos por gradiente de densidad en centrifuga (185,000x) (Tomada de Wetter, 1984).	26
Figura 3. El virus PMMoV se ha convertido en un indicador viral útil de la contaminación de las aguas residuales debido a su presencia en todo el ciclo de las aguas residuales domésticas (Tomada de Symonds, Rosario y Breitbart, 2019).....	28
Figura 4. Países y tipos de muestra en la detección de PMMoV informada en heces humanas y ambientes acuáticos (Tomada de Kitajama <i>et al.</i> , 2018).	29
Figura 5. Microfotografía electrónica de Adenovirus (285,000x) (Tomada de Brooks <i>et al.</i> , 2014).	30
Figura 6. Países y tipos de muestra en la detección de HAdV informada en aguas residuales y ambientes acuáticos.....	32
Figura 7. Principio de concentración viral en agua mediante filtración por adsorción-elución utilizando membranas electronegativas (Tomada de Katayama, Shimasaki y Ohgaki, 2002).....	36
Figura 8. Principio de concentración viral en agua a través de la ultrafiltración de flujo tangencial usando filtros de fibra hueca (Tomada de Shi, Pasco y Tarabara, 2017).....	38
Figura 9. Métodos para la realización de PCR cuantitativo: no específicos (a. colorante SYBR Green) y específicos (b. sonda TaqMan) (Tomada de https://image.slidesharecdn.com/meltcurvepresentationv4-150402130636-conversion-gate01/95/understanding-melt-curves-for-improved-sybr-green-assay-analysis-and-troubleshooting-3-638.jpg?cb=1427980186).....	47
Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental seguida para cumplir los objetivos del presente trabajo.....	52

Figura 11. Ubicación de los sitios de muestreo en la zona norte de Quintana Roo, México.	53
Figura 12. Fotografía del sistema de ultrafiltración tangencial utilizado para este estudio (UCIA, 2018)......	55
Figura 13. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 1 (UFT).	56
Figura 14. Fotografía del sistema de filtración por adsorción-elución utilizado para este estudio (UCIA, 2018).	57
Figura 15. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 2 (FAE).	58
Figura 16. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 3 (FAE/UF).	59
Figura 17. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante sonda TaqMan de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).....	87
Figura 18. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante sonda TaqMan y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	87
Figura 19. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante SYBR Green de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	88
Figura 20. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante SYBR Green y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	88

Figura 21. Gráfica de cajas y bigotes de los métodos de cuantificación utilizados para el PMMoV. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	89
Figura 22. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante sonda TaqMan de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).....	90
Figura 23. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante sonda TaqMan y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	90
Figura 24. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante SYBR Green de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	91
Figura 25. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante SYBR Green y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).	91
Figura 26. Gráfica de cajas y bigotes de los métodos de cuantificación utilizados para el HAdV. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).....	92

Listado de tablas

Tabla 1. Virus humanos transmitidos potencialmente por agua contaminada (Modificado de Hamza <i>et al.</i> , 2011b).	21
Tabla 2. Criterios de idoneidad del PMMoV como un organismo indicador de la contaminación fecal humana (Tomada de Kitajima <i>et al.</i> , 2018).	27
Tabla 3. Métodos para la concentración de virus a partir de muestras de agua (Tomada y modificada de Bosch <i>et al.</i> , 2008; Ikner, Gerba y Bright, 2012; Cashdollar y Wymer, 2013).	34
Tabla 4. Comparación de métodos utilizados para la detección de virus en fuentes ambientales (Tomada y modificada de Fong y Lipp, 2005; Hamza y Bibby, 2019).	44
Tabla 5. Nombres, ubicaciones y tipo de los cuerpos de agua colectados para este estudio.	54
Tabla 6. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de cDNA.	62
Tabla 7. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-TaqMan.	64
Tabla 8. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de PMMoV (Zhang <i>et al.</i> , 2006).	65
Tabla 9. Condiciones para los ciclos de qPCR para sonda TaqMan.	65
Tabla 10. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-SYBR Green.	66
Tabla 11. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de PMMoV (Hamza <i>et al.</i> , 2011).	66
Tabla 12. Condiciones para los ciclos de qPCR para SYBR Green.	66
Tabla 13. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-TaqMan.	67
Tabla 14. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de HAdV (Heim <i>et al.</i> , 2003).	67

Tabla 15. Condiciones para los ciclos de qPCR para sonda TaqMan.....	67
Tabla 16. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-SYBR Green.	68
Tabla 17. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de HAdV (Heim <i>et al.</i> , 2003).	68
Tabla 18. Condiciones para los ciclos de qPCR para SYBR Green.....	68
Tabla 19.- Promedio de los parámetros físico-químicos obtenidos en las diferentes colectas.	70
Tabla 20.- Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 1.	71
Tabla 21.- Factor de reducción en que se concentraron las muestras por cada proceso de concentración de partículas virales mediante el método 1.	72
Tabla 22.- Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 2.	73
Tabla 23. Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 3.	74
Tabla 24. Concentración del PMMoV obtenida utilizando sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT).	76
Tabla 25. Concentración de PMMoV obtenida por sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE).....	77
Tabla 26. Concentración de PMMoV obtenida por sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF).	78
Tabla 27. Concentración del PMMoV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT).	79
Tabla 28. Concentración del PMMoV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE).....	80

Tabla 29. Concentración del PMMoV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF).	80
Tabla 30. Concentración de HAdV obtenida por sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT).	81
Tabla 31. Concentración de HAdV obtenida por sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE).	82
Tabla 32. Concentración de HAdV obtenida por sonda TaqMan a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF).	83
Tabla 33. Concentración de HAdV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT).	84
Tabla 34. Concentración de HAdV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE).	85
Tabla 35. Concentración de HAdV obtenida por SYBR Green a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF).	85
Tabla 36. Valores obtenidos del PMMoV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con sonda TaqMan.	93
Tabla 37. Valores obtenidos del PMMoV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con SYBR Green.	94
Tabla 38. Valores obtenidos del HAdV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con sonda TaqMan.	95
Tabla 39. Valores obtenidos del HAdV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con SYBR Green.	96

Resumen

La contaminación de origen fecal tanto humana como animal es una problemática en aumento en los ambientes acuáticos. Este tipo de contaminación puede introducir microorganismos patógenos humanos a los ambientes acuáticos, los cuales significan un alto riesgo para la salud de las personas por el brote de enfermedades de origen hídrico. Además, de los virus que infectan a los humanos como el adenovirus humano (HAdV), otros virus eliminados en las heces pueden ser útiles para indicar la contaminación de los cuerpos de agua, como es el caso del virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Para poder realizar la detección de estos virus en el agua, existen una gran variedad de métodos, sin embargo, se ha observado que la eficiencia de los métodos depende del tipo o cuerpo de agua entre otros factores. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la optimización de un método para determinar la presencia de los virus PMMoV y HAdV en cuerpos de agua de la zona norte de Quintana Roo. Para determinar la concentración del PMMoV y del HAdV en las muestras de agua dulce (4 sitios), salobre (2 sitios) y residual (1 sitio), los volúmenes de las muestras colectadas (50 L, 20 L, 10 L y dos muestras de 5 L), se redujeron mediante tres métodos diferentes para hacer posible la concentración de las partículas virales. Posteriormente, se extrajo el ARN total para obtener el ADNc, así como el ADN total que se utilizaron como templados para la cuantificación del PMMoV y del HAdV, respectivamente. Para determinar las concentraciones virales se utilizó la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se utilizaron tres métodos para la concentración de los virus: 1) Ultrafiltración Tangencial (UFT), 2) Filtración por Adsorción-Elución (FAE) y 3) Filtración por Adsorción-Elución/Ultrafiltración (FAE/UF). Para la cuantificación por qPCR se utilizaron protocolos basados en SYBR Green y protocolos con Sondas TaqMan. Las concentraciones virales se expresaron en copias de genoma por litro (CG/L). Para establecer cuál es el método simple, rápido y eficiente para determinar la presencia de estos virus en las muestras de agua, los valores obtenidos se compararon de acuerdo a las características estimadas y se determinó que método es el óptimo basado en aquel que obtenga más valores positivos. Los resultados mostraron que con el método 1 (UFT) la prevalencia del PMMoV fue del 55% con

concentraciones que fueron de 4.32×10^0 hasta 1.91×10^4 CG/L y para el HAdV fue del 38% con concentraciones que fueron de 3.48×10^1 a 1.25×10^5 CG/L; con el método 2 (FAE) la presencia del PMMoV fue del 43% con concentraciones que fueron de 1.12×10^2 hasta 1.31×10^5 CG/L y para el HAdV fue del 71% con concentraciones que fueron de 3.17×10^3 a 4.52×10^5 CG/L, mientras con el método 3 (FAE/UF) la prevalencia del PMMoV fue del 57%, con concentraciones que fueron de 9.33×10^1 hasta 2.20×10^4 CG/L y para el HAdV fue del 64% con concentraciones que fueron de 5.63×10^2 a 1.58×10^5 CGL. En general, al determinar la presencia del PMMoV se registraron las concentraciones más altas en las muestras de agua salobre cuando se concentraron por el método 3 y éstas se cuantificaron por sonda TaqMan. En cambio, se obtuvieron concentraciones más altas para el HAdV en las muestras de agua dulce (pozo casa-habitación), cuando se concentraron por el método 2 y estas se cuantificaron con SYBR Green. Además, se detectó la presencia del PMMoV y del HAdV en todos los sitios colectados, lo que nos permite demostrar el impacto que tiene las actividades humanas sobre los ambientes acuáticos, con los que cuenta el estado de Quintana Roo y que puede representar un riesgo potencial para la población expuesta.

Abstract

Pollution from faecal origin both human and animal, is a growing problem in aquatic environments. This type of contamination can introduce human pathogenic microorganisms to aquatic environments, which pose a high risk to people's health due to the outbreak of water-borne diseases. In addition, among the viruses that infect humans such as human adenovirus (HAdV), other viruses eliminated in faeces can be useful to indicate contamination of water bodies, such as the *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). In order to detect these viruses in water, there are a wide variety of methods, however, it has been observed that the efficiency of the methods depends on the type or body of water, among other factors. Therefore, the objective of this work was to analyze the optimization of a method to determine the presence of the PMMoV and HAdV viruses in water bodies located in the northern area of Quintana Roo. In order to determine the concentration of PMMoV and HAdV in fresh water samples (4 sites), brackish samples (2 sites) and treated effluent (1 site); collected samples (in volumes of 50 L, 20 L, 10L and two 5 L samples) were concentrated by three different methods. Subsequently, total RNA was extracted to obtain the cDNA, as well as the total DNA that were used as template for the quantification of PMMoV and HAdV, respectively. Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to determine viral concentrations. Three methods were used for virus concentration: 1) UFT, 2) FAE and 3) FAE / UF. For the quantification, protocols based on SYBR Green and protocols with TaqMan Probes were used. Viral concentrations were expressed in genome copies per liter (CG/L). To establish which is the simplest, fastest and most efficient method to determine the presence of these viruses in water samples, the obtained values were compared according to the estimated characteristics, and it was determined which method is the optimal one based on the one that obtains the most positive values. The results showed that the use of method 1 (UFT) resulted in a PMMoV prevalence of 55% with concentrations that were from 4.32×10^0 to 1.91×10^4 CG/L; and for HAdV prevalence was of 38% with concentrations that were from 3.48×10^1 to 1.25×10^5 CG/L. The use of method 2 (FAE) showed a PMMoV prevalence of 43% with concentrations ranging from 1.12×10^2 to 1.31×10^5 CG/L; and for HAdV it was 71% with

concentrations ranging from 3.17×10^3 to 4.52×10^5 CG/L. Results obtained from method 3 (FAE/UF) showed a prevalence of PMMoV of 57% with concentrations that were from 9.33×10^1 to 2.20×10^4 CG/L, and for HAdV it was 64% with concentrations that were from 5.63×10^2 to 1.58×10^5 CGL . In general, when determining the presence of PMMoV, the highest concentrations were recorded in brackish water samples when they were concentrated by method 3 and when these were quantified by the qPCR essay using TaqMan probe; instead, higher concentrations for HAdV were obtained in fresh water samples (well) when they were concentrated by method 2 and quantified by the qPCR essay using SYBR Green. In addition, the presence of PMMoV and HAdV was detected in all the collected sites, therefore, results show the impact that human activities have on aquatic environments, which may represent a potential risk for the exposed population in state of Quintana Roo.

1 Introducción

El agua desempeña un papel importante tanto en las actividades humanas como en los sistemas naturales. El crecimiento de la población mundial ejerce una presión cada vez mayor sobre este recurso, provocando una severa degradación, así como mayores riesgos para la población humana (Espinosa-García *et al.*, 2004). De manera regional, la calidad del agua de la península de Yucatán (PY) puede verse afectada debido a actividades antropogénicas como el uso de fertilizantes, la descarga directa de aguas residuales y las fugas de fosas sépticas en mal estado (Granel and Hita, 2002; FONATUR, 2014). Debido a que la geología de la zona es altamente permeable, ésta permite una elevada transferencia de materia, lo que deriva en un aumento significativo potencial de contaminación de las aguas subterráneas (Marin y Perry, 1994).

Por lo anterior, es necesario monitorear la presencia de microorganismos potencialmente patógenos presentes en los cuerpos de agua y es importante medir su concentración. Estos datos proporcionarían herramientas adicionales para conocer la calidad del agua (Pace, 1997). Actualmente se utilizan distintos microorganismos como indicadores de contaminación fecal para el control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente (Bachoon *et al.*, 2010). Entre estos, las bacterias son comúnmente utilizadas como indicadores, sin embargo, su presencia no siempre está relacionada con virus u otros patógenos que también pueden estar contaminando el agua y representar un riesgo potencial para la salud (Rossen *et al.*, 2008).

No obstante, se han detectado virus entéricos en monitoreos de calidad del agua que se han relacionado con brotes de enfermedades asociados con virus aún cuando se cumple con los estándares de indicadores bacterianos (Fong and Lipp, 2005). Esto se debe a que los virus entéricos humanos a menudo son más resistentes a los procesos de tratamiento/desinfección del agua y también poseen una alta capacidad de supervivencia en ambientes acuáticos, incluso en concentraciones bajas (Lin and Ganesh, 2013). Un indicador viral de la contaminación fecal humana que comúnmente se emplea para determinar la eficiencia del tratamiento de aguas y aguas residuales, son los adenovirus

humanos (HAdV) (Silva, García-Zapata y Anunciação, 2011; Girones y Bofill-Mas, 2013). La utilidad de este virus se atribuye a su estabilidad, persistencia y amplia distribución en una gama de ambientes acuáticos e incluso en mayor abundancia en relación con otros virus entéricos en concentraciones máximas de 10^2 hasta 10^8 CG/L (Pina Pedrero, 2001; Bofill-Mas *et al.*, 2006; Haramoto *et al.*, 2007; Dong, Kim y Lewis, 2010. Los humanos son el único hospedero y no se puede replicar fuera de él. Sin embargo, un problema potencial con el uso del HAdV y otros virus humanos como indicadores, es que su abundancia en aguas residuales depende del grado de infección y desprendimiento de la población humana en un momento dado (Fong y Lipp, 2005; Rosario *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2013).

En los últimos años, se ha propuesto al virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) como un posible indicador fecal en agua, ya que este patógeno de plantas ha sido el más abundante de los virus encontrados en un estudio de metagenómica de heces humanas (Zhang *et al.*, 2006; Rosario *et al.*, 2009). Además, los productos alimenticios elaborados a base de chiles se han considerado como la fuente primaria en la prevalencia de este virus en las heces humanas, presente en concentraciones tan grandes como 10^9 partículas/g de heces (Colson *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2015). La alta prevalencia de PMMoV en aguas residuales tratadas ha llevado a muchos investigadores a buscar a este virus en aguas ambientales (Symonds, Rosario y Breitbart, 2019). Estudios realizados en todo el mundo han demostrado la ocurrencia de PMMoV en concentraciones que van de 10^1 hasta 10^{10} partículas/L en sistemas de aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas e incluso en sistemas de tratamiento de agua potable (Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018).

Actualmente, existen muchos desafíos relacionados con los estudios para determinar la presencia de virus en agua, debido a las diferencias y limitaciones en los métodos de recuperación y concentración para su detección en muestras naturales (Bosch *et al.*, 2008; Calgua de León, 2013). En la literatura se encuentran disponibles una gran variedad de métodos para realizar la detección de virus en muestras de agua (Shi, Pasco y Tarabara, 2017; Haramoto *et al.*, 2018). No obstante, se ha observado que la eficiencia

de los métodos depende del tipo o volumen de agua, así como las propiedades de los virus. Por lo tanto, es importante el desarrollo de pruebas de diagnóstico económicas, rápidas y precisas para detectar y caracterizar virus, ya que en la actualidad no existe un método estandarizado para la detección de todos los virus que pueden estar presentes en estos ambientes.

En la PY se ha reportado la presencia del PMMoV y el HAdV en el acuífero, en concentraciones que van desde 10^0 a 10^4 CG/L (Rosiles-González *et al.*, 2017; Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019; Rosiles-González *et al.*, 2019). Estos virus tienen un gran potencial para utilizarse como indicadores de contaminación fecal en la PY. Con el fin de establecer un método óptimo de concentración para la detección viral mediante qPCR en muestras de agua dulce, salobre y residual tratada, el objetivo de esta investigación fue comparar diferentes métodos de concentración y de cuantificación empleados para los virus PMMoV y HAdV. Los resultados obtenidos en el presente estudio representan el primer trabajo de comparación de métodos para la concentración y cuantificación de estos virus en diferentes cuerpos de agua en México. De igual manera, las concentraciones del PMMoV y del HAdV en los cuerpos de agua estudiados, permite demostrar el impacto que tiene la actividad humana sobre los recursos hídricos con los que cuenta el estado de Quintana Roo.

2 Antecedentes

2.1 Microorganismos presentes en los recursos hídricos

Se ha demostrado que en los ecosistemas acuáticos existen diferentes tipos de microorganismos que pueden convertirse en un riesgo para la salud humana, como es el caso de los agentes patógenos transmitidos por origen hídrico, que constituyen un problema de salud mundial (Vargas *et al.*, 1996). Además, se debe diferenciar a los microorganismos que de manera natural forman parte de un sistema acuático y de los que están presentes sin ser parte de él (Yates *et al.*, 1985).

En el caso de aguas residuales, éstas cuentan con un alto contenido de microorganismos, entre ellos agentes patógenos que son descargados a los cuerpos de agua naturales y que pueden representar un problema de salud pública, principalmente debido a que pueden provocar un gran número de enfermedades, incluyendo las gastrointestinales de etiología viral (Nasser y Oman, 1999).

Existen diversas fuentes naturales de agua tanto superficiales como subterráneas, que pueden contener cantidades variables de virus de forma natural. La concentración de virus en aguas naturales no contaminadas se ha estimado entre 10^5 hasta 10^8 partículas por mL (Pina Pedrero, 2001). Entre los virus transmitidos por agua contaminada se encuentran principalmente los entéricos (Tabla 1) (Hamza *et al.*, 2011b). Se les denomina de esa manera porque infectan las células del epitelio intestinal (enterocitos), causando daño al epitelio y en consecuencia produciendo un desbalance en los electrolitos por la mala absorción del agua, llevando finalmente al desarrollo de cuadros diarreicos (Yuan y Saif, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Además, este grupo de virus son relativamente estables en los procesos de inactivación de las depuradoras de agua residual e incluso a las condiciones del medio ambiente, como la temperatura y la radiación solar (Carter, 2005).

Tabla 1. Virus humanos transmitidos potencialmente por agua contaminada (Modificado de Hamza *et al.*, 2011b).

Familia	Género	Principales enfermedades
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus (Adenovirus humano A–G)	Gastroenteritis, Enfermedades Respiratorias, Conjuntivitis
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus humanos	Gastroenteritis
<i>Caliciviridae</i>	Norovirus, Sapovirus	Gastroenteritis
<i>Hepeviridae</i>	Hepevirus (Virus de la hepatitis E)	Hepatitis
<i>Picornaviridae</i>	Hepatovirus (Virus de la hepatitis A)	Hepatitis
	Enterovirus (Enterovirus humanos A-D)	Gastroenteritis, Meningitis, Miocarditis, Conjuntivitis
	Kobuvirus (Aichi virus)	Gastroenteritis
<i>Poliomaviridae</i>	Poliomavirus (JC; BK; KI; WU; MC)	Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva, Nefritis, Neumonía y Carcinoma de las Células de Merkel
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus (A-C)	Gastroenteritis
	Orthoreovirus (Reovirus)	Gastroenteritis y enfermedades respiratorias
<i>Parvoviridae</i>	Bocavirus (Bocavirus humano)	Gastroenteritis y enfermedades respiratorias
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus (Picobirnavirus humano)	Gastroenteritis
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Gastroenteritis y enfermedades respiratorias
<i>Papillomaviridae</i>	Papillomavirus	Verrugas genitales y cutáneas, Cáncer Cervical, otros tipos de Cáncer menos comunes

Existen diferentes vías en que los humanos podemos tener contacto directo y frecuente con estas aguas contaminadas (Figura 1). Los virus entéricos son transmitidos por la ruta fecal-oral, sin embargo, pueden transmitirse además a través del agua contaminada (Bosch, 1998). Entre otros factores, estos virus primeramente infectan y se replican en el tracto gastrointestinal del hospedero, de igual forma se pueden llegar a excretar en concentraciones tan elevadas como 10^5 a 10^{11} partículas víricas/g de heces de individuos con infecciones agudas, además se ha demostrado que varios virus son excretados a través de la orina y las heces de individuos sanos (Fong y Lipp, 2005; Bosch *et al.*, 2008).

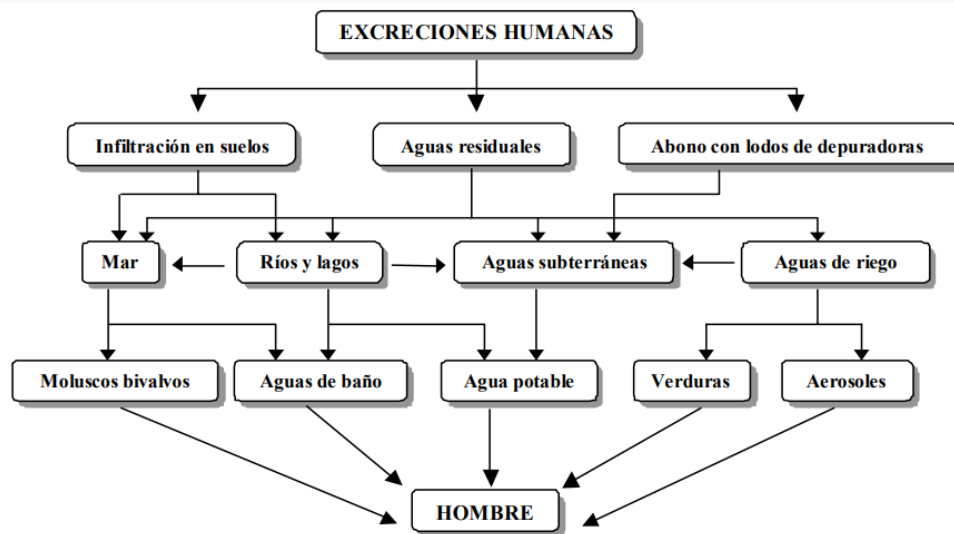


Figura 1. Ruta de transmisión fecal-oral de los virus entéricos humanos en el medio ambiente (Tomada de Pina Pedrero, 2001).

Sin embargo, hay una gran dificultad en la determinación de la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental. Por lo cual surge la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua. Como resultado a este problema, ha surgido la necesidad de trabajar con organismos indicadores (Campos, 1999).

2.2 Microorganismos para el control de la calidad del agua

Actualmente, la contaminación de los cuerpos naturales de agua es una problemática originada, entre otras causas, por actividades humanas tales como descarga directa de aguas residuales, fecalismo al aire libre, fallas en los sistemas de drenaje, el uso de fosas sépticas en mal estado, etc. (ver referencias en Ávila-Torres, 2017; Muñoz-Cortes, 2018). Por ello, es necesario determinar los microorganismos presentes en el agua así como determinar su concentración. Estos datos proporcionan herramientas de información complementaria para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control y tratamiento de aguas residuales, así como la conservación de ecosistemas (Pace, 1997; Larrea-Murrell *et al.*, 2013).

Los microorganismos han sido empleados como indicadores para el control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente. De igual manera, podrían ser utilizados para evaluar la calidad de los alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano (Bachoon *et al.*, 2010).

Un microorganismo indicador presenta un comportamiento similar al de los microorganismos patógenos en cuanto a su concentración en los cuerpos de agua y su reacción frente a distintos factores ambientales, pero la ventaja es que son más fáciles, rápidos y económicos de detectar (Campos, 1999). Una vez detectado e identificado, su presencia determina la existencia de otros microorganismos patógenos y permite comparar su comportamiento frente a diferentes factores como cambios de temperatura, pH, nutrientes, tiempo de retención hídrica entre otros factores, la cuál será similar a la del indicador (Ríos-Tobón, Agudelo-Cadavid y Gutiérrez-Builes, 2017).

Para ser considerado un indicador de contaminación fecal, un microorganismo debe reunir la mayoría de las siguientes características (Fernández *et al.*, 2001):

- Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal.
- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.

Para evaluar la presencia de microorganismos patógenos es fundamental la determinación de indicadores de contaminación fecal y su grado de persistencia en el agua, así como para establecer la relación causa-efecto de incidencia de enfermedades (Pruss, 1998). Actualmente no existe un microorganismo indicador universal ya que no

existe ninguno que reúna todos los criterios, solo algunos grupos satisfacen parcialmente estos requisitos por lo que se debe seleccionar el más adecuado para la situación específica en cada estudio (Bachoon *et al.*, 2010).

2.3 Los virus como indicadores de contaminación fecal en el agua

En la actualidad, la contaminación de los ambientes acuáticos es una gran preocupación para la salud pública en todo el mundo. La contaminación fecal de los recursos hídricos puede tener un impacto negativo en la sociedad, provocando un gran número de enfermedades gastrointestinales (Kuroda *et al.*, 2015).

Existen indicadores microbianos y químicos que son útiles para el monitoreo de la contaminación fecal, la identificación de las fuentes de contaminación, el control y la prevención de eventos de contaminación, así como para evaluar el desempeño y tratamiento de aguas residuales (Rosario *et al.*, 2009). No obstante, hoy en día se discute la idoneidad del uso de los indicadores microbianos de contaminación fecal más utilizados como coliformes totales, *Escherichia coli* y Enterococos (Rossen *et al.*, 2008), ya que en estudios realizados por Desmarais *et al.* (2002), González *et al.* (2010) y Méndez *et al.* (2010), indican que existen numerosas limitaciones asociadas con la aplicación de estos microorganismos como indicadores, así como su escasa supervivencia en cuerpos de agua y de fuentes no fecales, su habilidad para multiplicarse después de su liberación en el agua y la debilidad frente a los procesos de desinfección, entre otros aspectos (Desmarais, Solo-Gabriele y Palmer, 2002; González, Paranhos y Lutterbach, 2010; Novelo *et al.*, 2010).

Los patógenos virales en la mayoría de los casos presentan especificidad de hospedero. Debido a esto han sido sugeridos como una herramienta prometedora para determinar la fuente de los contaminantes fecales en ambientes acuáticos, pudiendo ser usados conjuntamente con indicadores bacterianos, para evaluar la calidad del agua y mejorar la vigilancia de la salud pública. En general, los virus entéricos muestran un gran potencial para ser usados como indicadores de la calidad del agua, para evaluar los riesgos asociados con la transmisión de virus infecciosos (Fong y Lipp, 2005).

Se han propuesto a varios virus como buenos indicadores de contaminación fecal, los cuales pueden utilizarse en adición a los indicadores bacteriológicos para realizar el monitoreo de aguas residuales y los riesgos asociados para la salud pública. Hasta el momento, la mayoría de los indicadores virales propuestos para determinar la contaminación fecal son los virus entéricos transmitidos por vía fecal-oral, incluidos los miembros de las familias *Adenoviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* y *Reoviridae* y del género *Anellovirus* (Rosario *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2011b). Este grupo de virus son capaces de resistir los tratamientos de aguas residuales o métodos de desinfección más comunes y una vez descargados en el ambiente pueden permanecer y convertirse en contaminantes del agua (Lin y Ganesh, 2013).

Por esta razón, se ha propuesto utilizar indicadores alternativos a los ya establecidos en la normatividad. Por ejemplo, en Europa se han realizados trabajos para proponer la utilización de Adenovirus como indicadores de contaminación fecal humana (Bonfil-Mas *et al.*, 2010). No obstante, un problema potencial con el uso de virus humanos como indicadores es que su abundancia en las aguas residuales depende del grado de infección y del desprendimiento en la población humana en un momento dado (Rosario *et al.*, 2009).

2.4 Virus del Moteado Suave del Pimiento (PMMoV)

En los últimos años, se ha propuesto al virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV por sus siglas en inglés) como un posible indicador fecal en agua. Este virus patógeno de plantas ha sido encontrado como uno de los virus más abundantes en un estudio metagenómico de los virus de ARN presentes en heces humanas (Zhang *et al.*, 2006). De igual manera, se ha encontrado al PMMoV en algunas muestras de heces de especies animales (pollos, vacas, gansos y gaviotas), pero en concentraciones mucho más bajas que en los humanos (Rosario *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2011a).

El PMMoV está conformado por partículas en forma de varilla rígida sin envoltura, que tienen aproximadamente un diámetro de 18 nm y una longitud de 300-312 nm (Wetter, 1984; Melgarejo *et al.*, 2010; ViralZone, 2020) (Figura 2). La cápside está constituida por

una única molécula polipeptídica de 17 a 21 kDa denominada CP que se encuentran distribuidos helicoidalmente alrededor de una molécula de ARN monocatenario con polaridad positiva (ssRNA+), con un peso molecular de 2×10^3 kDa y un tamaño de 6.36 Kb (Tostado Álvarez, 1995; Tena Fernández, 2012). El genoma del PMMoV está constituido por 6,357 nucleótidos y codifica para al menos cuatro proteínas: proteínas de replicación de 126 kDa y 183 kDa, proteína de movimiento (MP) y proteína de la cubierta (CP) (Tostado Álvarez, 1995; ICTV, 2020).

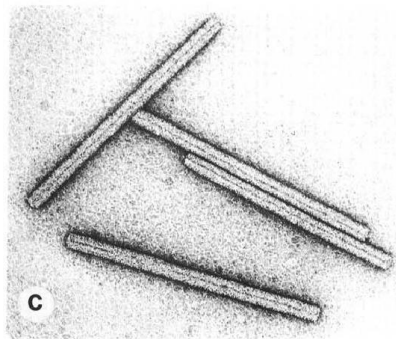


Figura 2. Micrografía electrónica de los viriones del PMMoV obtenidos por gradiente de densidad en centrifuga (185,000x) (Tomada de Wetter, 1984).

El PMMoV cumple algunos de los criterios de un organismo indicador de contaminación fecal humana en ambientes acuáticos (Kitajima, Sassi y Torrey, 2018) (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de idoneidad del PMMoV como un organismo indicador de la contaminación fecal humana (Tomada de Kitajima *et al.*, 2018).

Criterios para un organismo indicador ideal	Idoneidad de PMMoV	Referencias representativas
Debe ser eficiente para todo tipo de agua.	Sí, es altamente apropiado en todo tipo de agua.	(Rosario <i>et al.</i> , 2009; Kitajima <i>et al.</i> , 2014)
Presente siempre que están presentes patógenos entéricos.	Sí, mayor presencia que la mayoría de los patógenos entéricos.	(Kitajima, Sassi y Torrey, 2018)
Mayor tiempo de supervivencia que los patógenos entéricos.	Sí, más persistentes que los virus entéricos humanos.	(Rosario <i>et al.</i> , 2009; Rachmadi <i>et al.</i> , 2016)
Incapaz de multiplicarse en el agua.	No hay crecimiento sin su organismo huésped.	(Wetter, 1984)
Detección fácil y rápida mediante metodologías establecidas	Sí, se pueden examinar junto con patógenos virales. Sin embargo, su detección requiere técnicas especializadas como PCR o qPCR.	(Kuroda <i>et al.</i> , 2015)
La densidad tiene alguna relación directa con el grado de contaminación fecal.	Sí, pero puede ser demasiado persistente para discernir la contaminación reciente.	(Hamza <i>et al.</i> , 2011a; Kuroda <i>et al.</i> , 2015)
Ser un constituyente de la microflora intestinal de animales homeotermos	Sí, abundante en la flora intestinal de humanos sanos.	(Zhang <i>et al.</i> , 2006; Colson <i>et al.</i> , 2010)

2.4.1 El PMMoV en alimentos y matrices ambientales

El PMMoV, así como muchos otros virus que infectan a las plantas, pueden estar presentes en los frutos y productos procesados elaborados a base de estos frutos; los cuales, al ser ingeridos por el humano pasan por el tracto digestivo y son liberados como viriones viables a través de las heces, por lo que estos patógenos pueden llegar a las aguas residuales y por consiguiente en ocasiones pueden contaminar los ecosistemas acuáticos (Symonds *et al.*, 2019) (Figura 3).

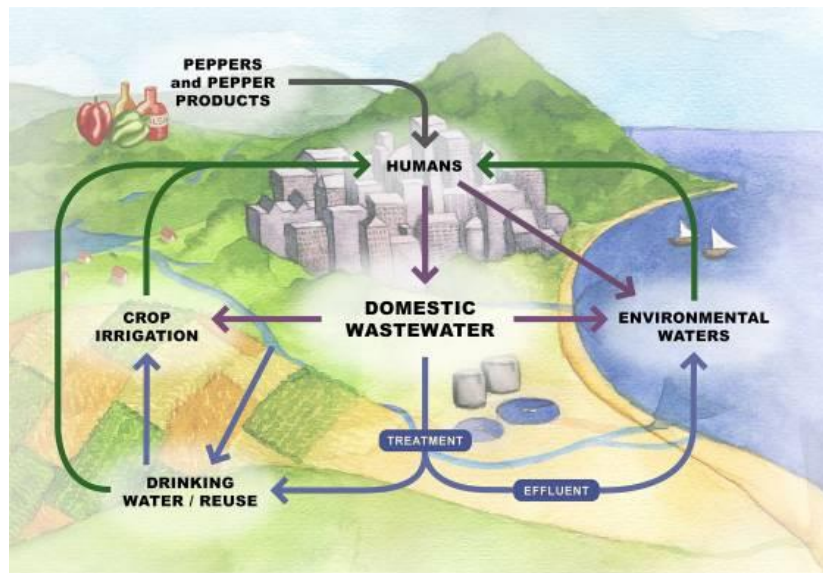


Figura 3. El virus PMMoV se ha convertido en un indicador viral útil de la contaminación de las aguas residuales debido a su presencia en todo el ciclo de las aguas residuales domésticas (Tomada de Symonds, Rosario y Breitbart, 2019)

La alta prevalencia del PMMoV en las aguas residuales tratadas ha llevado a muchos investigadores a buscar este virus en aguas ambientales. Actualmente existe una cantidad de datos disponibles sobre la aparición y persistencia de PMMoV en diferentes cuerpos de agua (Figura 4), como en sistemas de aguas residuales tratadas y no tratadas en concentraciones que van de 10^5 a 10^{10} partículas/L (Rosario *et al.*, 2009; Kuroda *et al.*, 2015), en aguas superficiales en concentraciones de 10^5 hasta 10^6 partículas/L (Hamza *et al.*, 2011a; Betancourt *et al.*, 2014), en agua subterráneas en concentraciones de 10^0 a 10^7 partículas/L (Hruby *et al.*, 2015; Rosiles-González *et al.*, 2017; Shrestha *et al.*, 2018), así como en sistemas de tratamiento de agua potable en concentraciones que variaron de 10^3 hasta 10^5 partículas/L (Haramoto *et al.*, 2013; Sangsanont *et al.*, 2016). Sin embargo, la tasa de detección varía entre los estudios, probablemente debido a las diferencias en los métodos de concentración o detección de PMMoV. También se ha demostrado la presencia del PMMoV en las heces y en el agua residual en diferentes áreas geográficas (Kitajama *et al.*, 2018; Symonds *et al.*, 2018) (Figura 4).

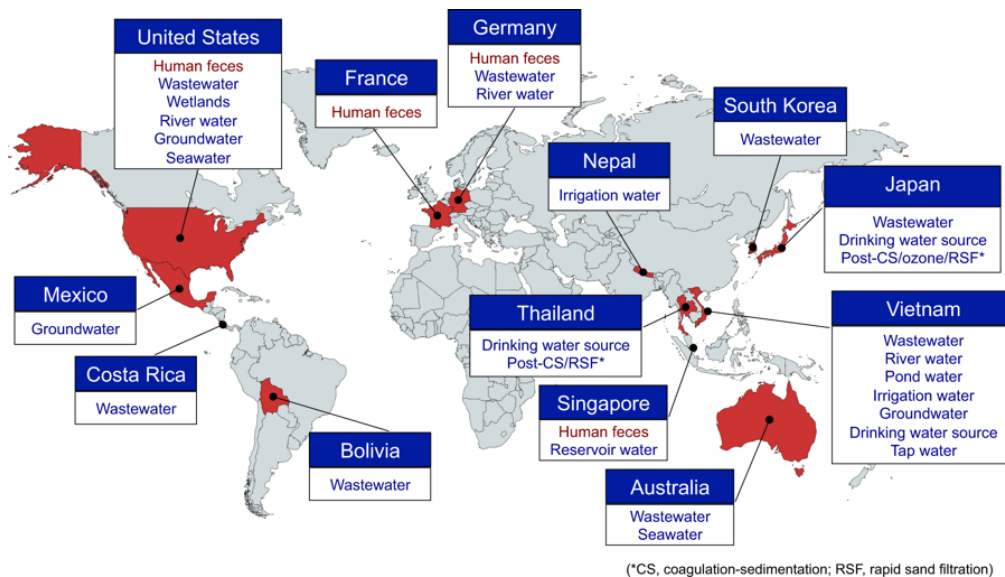


Figura 4. Países y tipos de muestra en la detección de PMMoV informada en heces humanas y ambientes acuáticos (Tomada de Kitajama et al., 2018).

Con base en lo anterior, es evidente que aún se cuenta con datos limitados sobre la distribución geográfica y co-ocurrencia del PMMoV con otros patógenos en diferentes cuerpos de agua. Por lo tanto, hasta el momento no han sido investigados con mayor claridad la aparición y el destino del PMMoV en otros tipos de cuerpos de agua, tales como aguas superficiales estancadas (estanques o lagos), aguas subterráneas y agua potable (Glassmeyer et al., 2005). Además, es importante desarrollar metodologías particulares para cada ambiente y ubicación geográfica que permitan obtener métodos eficientes, rápidos y económicos para contribuir al uso potencial del PMMoV como indicador de contaminación fecal.

2.5 Virus entéricos como indicadores: Adenovirus Humanos (HAdV)

Las primeras cepas de adenovirus humanos (HAdV) fueron descubiertas en 1959 mientras analizaban la causa del resfriado común. Los virus fueron aislados en cultivo de tejidos primarios degenerados que se originan a partir de las glándulas adenoides y amígdalas humanas (Rowe et al., 1953; Mena y Gerba, 2009) (Figura 5). Estos virus fueron descritos como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas, infecciones gastrointestinales, oculares así como urinarias (Mena y Gerba, 2009).

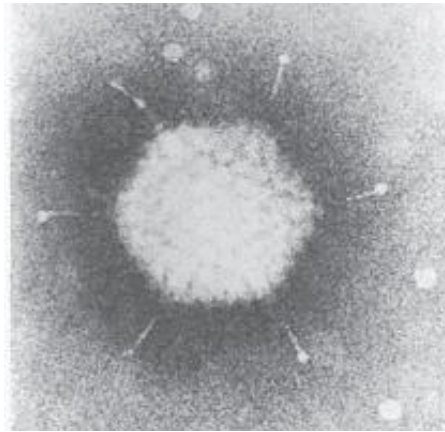


Figura 5. Microfotografía electrónica de Adenovirus (285,000x) (Tomada de Brooks *et al.*, 2014).

Actualmente, los adenovirus constituyen una familia de virus que está conformada por cinco géneros diferentes que infectan a los humanos así como un amplio número de especies animales (mono, serpiente, cerdo, oveja, caballo, rana, aves, perro, gato, ratón, ballena, entre otros) (Pina Pedrero, 2001; Calgua de León, 2013; Rubio Guerri, 2015). Por otra parte, los adenovirus humanos (HAdV) pertenecen al género *Mastadenovirus*, que comprende siete especies o subgéneros conocidas como HAdV-A hasta HAdV-G. Esta clasificación se basa en función de sus características genéticas, biológicas, físicas, químicas e inmunológicas (Pina Pedrero, 2001; Brooks *et al.*, 2014; Ghebremedhin, 2014; Allard y Vantarakis, 2019) .

Los adenovirus son partículas víricas que tienen un tamaño entre 60 y 90 nm de diámetro, muestran una simetría icosaédrica y se encuentran entre los virus sin envoltura más complejos que existen (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Rubio Guerri, 2015). Además, cuentan con un peso molecular entre 175 a 185 Kda, y su genoma codifica para 13 polipéptidos estructurales, así como para 35 proteínas no estructurales (Calgua de León, 2013; Brooks *et al.*, 2014). El genoma de los adenovirus está constituido por una molécula de ADN bicatenario de forma lineal con un tamaño que oscila entre 26 a 48 Kb (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011; Rodríguez Manzano, 2012).

2.5.1 *Los HAdV en matrices ambientales*

Hasta el momento se ha reportado que las heces (humanas), son fuente de los HAdV en el ambiente y se han detectado varios tipos de HAdV en altas concentraciones, principalmente en aguas residuales domésticas de todo el mundo (Figura 6). Es probable que la presencia de HAdV en ambientes acuáticos se deba a la contaminación con aguas residuales no tratadas o tratadas. Estudios realizados en todo el mundo han demostrado la ocurrencia del HAdV en sistemas de aguas residuales tratadas y no tratadas en concentraciones que van de 10^4 a 10^8 partículas/L (Haramoto *et al.*, 2018), en aguas superficiales en concentraciones de 10^2 hasta 10^4 partículas/L (Hamza *et al.*, 2009; Sibanda and Okoh, 2012), en agua subterráneas en concentraciones de 10^0 a 10^4 partículas/L (Betancourt *et al.*, 2014; Rosiles-González *et al.*, 2019) e incluso en sistemas de tratamiento de agua potable en concentraciones que variaron de 10^0 hasta 10^7 partículas/L (García *et al.*, 2012; Grøndahl-Rosado *et al.*, 2014). En varios casos, los HAdV se han detectado en más del 80% de las aguas residuales bajo estudio (Prado *et al.*, 2011; Amdiouni *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013). La aparición y concentración de HAdV en las aguas residuales tienen poca variabilidad estacional (Jiang, 2006; Allard y Vantarakis, 2019).

En algunos estudios se ha demostrado que los HAdVs, especialmente los tipos HAdV 40 y 41, sobreviven más tiempo que los indicadores bacteriológicos presentes en las aguas residuales, así como en el medio ambiente (Enriquez, Hurst y Gerba, 1995), debido a que son muy resistentes a la luz UV (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). Además, se ha observado que la cloración parece ser el único método efectivo para eliminar a los HAdV presentes en el agua (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). Por lo tanto, los HAdV pueden llegar al ambiente acuático a través efluentes de aguas residuales que cumplen con el estándar de indicadores bacterianos. Por lo anterior, se ha propuesto su uso como indicadores potenciales de la presencia de aguas residuales humanas, ya que se ha observado una correlación entre la presencia de los HAdV con otros virus en aguas residuales como el Poliomavirus Humano o el Norovirus (NoV) (La Rosa *et al.*, 2010; Kokkinos *et al.*, 2011; Hewitt *et al.*, 2013).

Además, se ha encontrado que los HAdVs prevalecen en varios depósitos de agua naturales y artificiales en todo el mundo. Por otro lado, las amebas de vida libre han sido recuperadas de reservorios en cuerpos de agua similares y se ha demostrado que estos parásitos pueden actuar como reservorios o vehículos de varios microorganismos que viven en el mismo ambiente. Con base en lo anterior, se han realizados varios trabajos sobre la relación que podrían tener los HAdV y otros microorganismos presentes en ambientes acuáticos. Lorenzo-Morales *et al.*, (2007) detectaron ADN viral de 4 serotipos diferentes de los HAdV en el 14.4% (34/236) de las cepas aisladas de *Acanthamoeba* spp. en muestras de agua de grifo de las Islas Canarias, España. En este trabajo, se evidenció que HAdV-2 era el serotipo detectado con mayor frecuencia entre las cepas de *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que los HAdV podrían incorporarse a *Acanthamoeba* spp. probablemente a través de la fagocitosis (Scheid y Schwarzenberger, 2012). En un estudio realizado por Verani *et al.*, (2016), se demostró que el serotipo de HAdV-5 internalizado por *Acanthamoeba polyphaga*, lo cual brindó un papel en la protección de este virus contra la desinfección química (5 mg/L de NaClO durante 24 horas) (Verani *et al.*, 2016). Estos estudios sugieren un papel importante para estos protozoos en la propagación de virus y en su protección contra desinfectantes tanto naturales como artificiales (Battistini *et al.*, 2013).

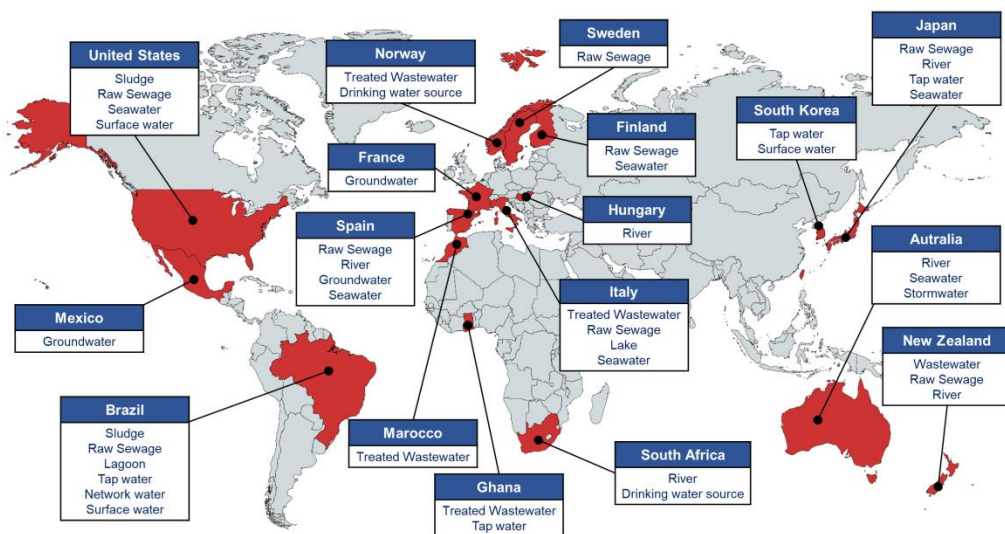


Figura 6. Países y tipos de muestra en los que se han detectado HAdVs en aguas residuales y ambientes acuáticos.

En conclusión, es necesaria una investigación epidemiológica en agua potable y en aguas recreativas para incluir indicadores virales, como los HAdV, así como de las bacterias indicadoras fecales tradicionales para entender la relación entre el riesgo para la salud humana y la aparición de patógenos virales humanos (Jiang, 2006).

2.6 Métodos de concentración y detección de virus a partir de muestras ambientales

2.6.1 Métodos de concentración de virus en agua

Las aguas residuales domésticas contienen concentraciones de virus suficientemente elevadas que permiten la detección directa o tras una etapa sencilla de concentración (Pina Pedrero, 2001), mientras que en la mayoría de los ambientes acuáticos se reportan la aparición de números bajos de partículas virales, así como diversos virus pertenecientes a diferentes familias (Bofill-Mas *et al.*, 2005). Por lo tanto, es necesario concentrar grandes volúmenes de muestras agua para poder detectarlos y caracterizarlos (Abbaszadegan, Stewart y LeChevallier, 1999; Bosch *et al.*, 2008). Este paso constituye uno de los problemas principales del análisis virológico en el medio ambiente (Bosch *et al.*, 2008).

Los métodos para concentrar virus son muy diversos y a través del tiempo estos han ido evolucionando con la principal finalidad de ser más eficientes y sencillos. Sin embargo, en la actualidad no existe un método estandarizado para la detección de todos los virus que pueden estar presentes en ambientes acuáticos (Saavedra, Tovar y Betancourt, 2012) (Tabla 3).

Tabla 3. Métodos para la concentración de virus a partir de muestras de agua (Tomada y modificada de Bosch *et al.*, 2008; Ikner, Gerba y Bright, 2012; Cashdollar y Wymer, 2013).

Métodos	Principio	Ventajas	Desventajas
Métodos por Adsorción-Elución (AE)			
Filtros electronegativos	Carga iónica	<ul style="list-style-type: none"> Económico Puede filtrar grandes volúmenes incluso en aguas muy turbias antes de que se obstruya Ha sido probado con una variedad de virus entéricos 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere una filtración previa o preacondicionamiento de la muestra
Filtros electropositivos		<ul style="list-style-type: none"> No se requiere preacondicionamiento de la muestra de agua. Ha sido probado con una variedad de virus entéricos. Puede filtrar grandes volúmenes incluso en aguas turbias antes de que ocurra la obstrucción 	<ul style="list-style-type: none"> Costo alto por medio filtrante
Lana de vidrio		<ul style="list-style-type: none"> Económico No se requiere preacondicionamiento de la muestra de agua. Fácil de usar Campo-desplegable 	<ul style="list-style-type: none"> El agua turbia puede causar obstrucciones Requiere que cada laboratorio ponga los aparatos de filtro juntos, lo que podría causar una variación entre laboratorios. Datos limitados disponibles para determinar su efectividad con múltiples patógenos virales
Métodos por precipitación			
Floculación orgánica	Precipitación química	<ul style="list-style-type: none"> Eficiente para muestras turbias Eficaz como un método secundario de concentración 	<ul style="list-style-type: none"> El extracto de ternera es inhibidor de las enzimas de RT-PCR
Sulfato de amonio		<ul style="list-style-type: none"> Eficiente para muestras turbias Eficaz como método secundario de concentración 	<ul style="list-style-type: none"> Alta citotoxicidad Inhibidor de las enzimas de RT-PCR

Polietilenglicol (PEG)		<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente para muestras turbias • Eficaz como un método secundario de concentración 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad intraensayo
Métodos por separación física			
Ultracentrifugación	Sedimentación física	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente como un método secundario de concentración 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo elevado
Ultrafiltración tangencial (UFT)	Separación por tamaños de partículas	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración multipatógena • Económico • No se requiere preacondicionamiento de la muestra de agua 	<ul style="list-style-type: none"> • El agua turbia puede causar obstrucciones • No es fácilmente desplegable en el campo • Tasa de filtración lenta • Datos limitados disponibles para determinar su efectividad con múltiples patógenos virales

Los distintos métodos de concentración de virus aprovechan las propiedades físico-químicas de las macromoléculas proteicas de los virus, de igual forma, se han ido modificando o combinándose para mejorar la recuperación viral y tener una mayor eficiencia en general (Pina Pedrero, 2001).

La elección del método de concentración está determinada por las características del agua, así como por el volumen de agua que debe analizarse y los efectos de las propiedades del virus. A menudo se usan una serie de técnicas de concentración consecutivas para reducir el volumen de la muestra (Rames *et al.*, 2016).

Aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y para cualquier tipo de virus, un buen método de concentración debe ser lo más simple, rápido y económico posible. Por ello, se sugiere que un método de concentración debe cumplir varios requisitos importantes, tales como (Ruhanya, Kabego y Otwoma Gichana, 2016):

- Debe recuperar grandes cantidades de virus
- Ser aplicable a la recuperación de diferentes virus
- Debe ser técnicamente fácil de realizar y en corto tiempo

- Debe proporcionar altas tasas de recuperación
- No debe ser costoso
- Debe ser capaz de procesar grandes volúmenes de muestra
- Debe ser repetible (dentro de un laboratorio) y reproducible (entre laboratorios)

Estos métodos deben ser diseñados para evitar concentrar grandes cantidades de sustancias tóxicas o compuestos inhibidores (metales tóxicos, ácido húmico y el ácido fúlvico asociados con aguas residuales, fluviales y costeras) presentes en las matrices ambientales, que afecten los análisis moleculares o de cultivo celular para la detección de los virus, para que estas muestras puedan ser utilizadas en procesos posteriores (Jiang, 2006; Calgua de León, 2013). Por lo tanto, la purificación de la muestra es necesaria después de la concentración para reducir el efecto citotóxico o inhibidor. Sin embargo, existe una pérdida entre los múltiples pasos de purificación en la tasa de recuperación de partículas virales objetivo o ácido nucleico viral (Jiang, 2006).

2.6.1.1 Concentración de virus por adsorción-elución

El desarrollo de métodos de adsorción/elución o conocido como VIRADEL, se acredita a Wallis y Melnick (1967), como unos de los primeros métodos en la virología ambiental (Cashdollar y Wymer, 2013). Estos métodos se basan en el principio de la adsorción o retención de partículas virales a los medios filtrantes por interacción de carga y la elución posterior del virus con una solución orgánica (Ruhanya, Kabego y Otwoma Gichana, 2016; Matrajt *et al.*, 2018) (Figura 7).

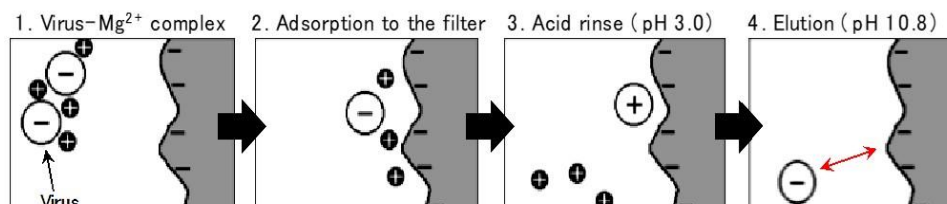


Figura 7. Principio de concentración viral en agua mediante filtración por adsorción-elución utilizando membranas electronegativas (Tomada de Katayama, Shimasaki y Ohgaki, 2002).

Una gran parte de los virus presentes en ambientes acuáticos son virus desnudos, es decir, no cuentan con una envoltura lipídica alrededor de la cápside proteica, que contiene

aminoácidos con grupos ionizables que le confieren a los virus una carga eléctrica dependiente del pH (Pina Pedrero, 2001). El punto isoeléctrico (pI) de los virus permite conocer la carga global del mismo en unas condiciones determinadas de pH. La mayor parte de los virus en el agua poseen una carga superficial neta de forma negativa a pH natural del agua (pH cercano o igual a 7) (Pina Pedrero, 2001; Matrajt *et al.*, 2018).

Debido a lo anterior, los diferentes soportes utilizados para concentración por adsorción/elución revelan a la capacidad de los virus presentes en la muestra para asociarse a diferentes materiales tales como: polvo de vidrio, lana de vidrio, membranas o cartuchos de derivados de celulosa, carbón activado entre otros (Lucena *et al.*, 1991). Existen dos tipos de soportes básicos utilizados para adsorber virus en el agua: filtros electronegativos y filtros electropositivos (Cashdollar y Wymer, 2013).

Los filtros electronegativos de uso común incluyen membranas hechas de una mezcla de nitrato de celulosa y acetato de celulosa (Shi, Pasco y Tarabara, 2017). La popularidad de las membranas de nitrato de celulosa HA (Millipore) radica en su disponibilidad en varios tamaños de poro, configuraciones y composiciones, por lo que la elección del filtro dependerá en parte de la muestra a estudiar (Wyn-Jones y Sellwood, 2001). Debido a la carga negativa de la mayoría de los virus a valores de pH típicos para muestras de agua ambiental, la carga neta del virus debe modificarse a positiva para que el virus se adsorba eficientemente a la matriz electronegativa, esto se realiza adicionándole sales mono/polivalentes (NaCl, MgCl₂, AlCl₃) a la muestra y obteniendo un pH 5 o inferior (Lukasik *et al.*, 2000; Shi, Pasco y Tarabara, 2017; Matrajt *et al.*, 2018). Todo esto se realiza para promover la adsorción, lo cual contribuye a eliminar las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los viriones y la superficie de los filtros (Lucena *et al.*, 1991). Sin embargo, esta situación limita procesar volúmenes grandes de muestra y puede provocar la inactivación de ciertos virus a pH ácido (Pina Pedrero, 2001). Una vez que los virus se hayan unido a la membrana, éstos se eluyen empleando frecuentemente extracto de carne, solución de leche desnatada o NaOH (Wyn-Jones y Sellwood, 2001). No obstante, se ha reportado que el uso de matrices electronegativas es más eficiente que las matrices electropositivas (Hsu *et al.*, 2007).

La adsorción de los virus sobre filtros microporosos se ve afectada por la temperatura, el pH, la turbidez y la concentración de materia orgánica en suspensión, que hacen variar la eficiencia de la recuperación, sugiriendo así que cada virus podría tener una eficiencia específica de adsorción a las matrices empleadas por estos métodos (Pina Pedrero, 2001; Calgua de León, 2013). Por último, los métodos basados en adsorción/elución empleando filtros electronegativos son de los más utilizados para concentrar virus en agua en todo el mundo (Ruhanya, Kabego y Otwoma Gichana, 2016).

2.6.1.2 Concentración de virus por ultrafiltración de flujo tangencial

Este método es comúnmente utilizado, sin embargo, aunque el caudal de filtración suele ser entre 10 y 100 L, este se encuentra limitado por la saturación de los filtros y el tipo de matriz. Se ha aplicado comúnmente a aguas con una turbidez baja y como un método de concentración secundaria. Las ventajas de este método es que las muestras no requieren un acondicionamiento y, por lo tanto, una amplia variedad de virus y de otros microorganismos pueden ser concentrados (Fong y Lipp, 2005; Grassi *et al.*, 2010; Pepper *et al.*, 2015).

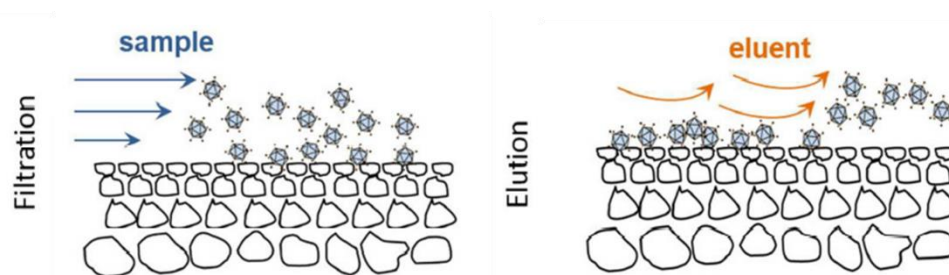


Figura 8. Principio de concentración viral en agua a través de la ultrafiltración de flujo tangencial usando filtros de fibra hueca (Tomada de Shi, Pasco y Tarabara, 2017).

Esta técnica permite la separación mecánica de las partículas en función de su peso molecular (Pina Pedrero, 2001; Wyn-Jones y Sellwood, 2001) y se ha convertido en una alternativa prometedora al VIRADEL (Olszewski, Winona y Oshima, 2005; Shi, Pasco y Tarabara, 2017). La filtración de flujo tangencial es un tipo de proceso de flujo cruzado, durante el cual la alimentación de la muestra de agua se dirige rápidamente de forma tangencial a lo largo de la superficie de las membranas del ultrafiltro (Ikner, Gerba y

Bright, 2012) (Figura 8). Este flujo pasa a través de las membranas creando un diferencial de presión, debido al tamaño del poro, permite que el agua y las sustancias de bajo peso molecular pasen a través de las fibras hacia el filtrado, mientras que las sustancias más grandes, como los virus y otros microorganismos, quedan atrapadas y se retienen en la solución de alimentación, que se recircula a través del dispositivo hasta que se alcanza el volumen de concentrado deseado (Ikner, Gerba y Bright, 2012; Cashdollar y Wymer, 2013; Shi, Pasco y Tarabara, 2017). El flujo cruzado hace posible filtrar grandes volúmenes de agua, también evita la acumulación de contaminantes y la obstrucción de las membranas (Morales-Morales *et al.*, 2003; Polaczyk *et al.*, 2008). Por lo tanto, el flujo tangencial se usa comúnmente con aguas de menor calidad, como las aguas residuales (Ikner, Gerba y Bright, 2012). La selección adecuada de un límite de peso molecular MWCO de la membrana debería garantizar una pérdida mínima de virus en el filtrado. Varias membranas oscilan entre 5,000 y 100,000 MWCO (5–100 kDa) (Wyn-Jones y Sellwood, 2001; Ikner, Gerba y Bright, 2012; Cashdollar y Wymer, 2013).

Las ventajas de la ultrafiltración son principalmente que se eliminan compuestos de bajo peso molecular (solutos) que pueden inhibir posteriormente la detección aguas abajo, ya que estos compuestos pasan a través de la membrana y no se concentran junto con los microorganismos. También el flujo cruzado minimiza la saturación de la membrana y la deposición de virus sobre la membrana y, por lo tanto, podría aumentar la recuperación de los virus. Además, esta técnica puede concentrar simultáneamente múltiples tipos de microorganismos, ya que la muestra no requiere preacondicionamiento (Ikner, Gerba y Bright, 2012; Shi, Pasco y Tarabara, 2017). Las principales limitaciones para su uso son el alto costo y que, a pesar de las ventajas del flujo tangencial, las muestras turbias todavía tienden a obstruir la membrana (Wyn-Jones y Sellwood, 2001).

2.6.2 *Métodos empleados para concentración de PMMoV en muestras de agua*

El aislamiento del ácido nucleico es el primer paso en el proceso de detección del PMMoV y los métodos para realizarlo varían según el tipo de muestra. En los productos alimenticios procesados, las aguas residuales domésticas y las heces, el ARN de PMMoV

a menudo se encuentra en concentraciones suficientemente altas para detectarlo directamente, es decir, sin necesidad de concentrar las muestras (Colson *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2015; Symonds *et al.*, 2016). Si se cree que PMMoV se encuentra en concentraciones inferiores, como suele ser el caso en muestras ambientales, los métodos de concentración de virus son necesarios antes de los análisis de detección y estos métodos varían según el tipo de agua (Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018).

En muestras con mayor volumen (>20 L) que regularmente se usan para analizar aguas subterráneas o agua potable, se ha concentrado a este patógeno de plantas utilizando filtros Nanoceram para concentrar la muestra (Betancourt *et al.*, 2014), así como con filtros de lana de vidrio (Hruby *et al.*, 2015) y ultrafiltros de fibra hueca (Rosiles-González *et al.*, 2017; McGinnis *et al.*, 2018). Para muestras de agua con volúmenes pequeños (<2 L), se aísla tradicionalmente al PMMoV usando métodos basados en adsorción-elución empleando membranas electronegativas (Betancourt *et al.*, 2014; Kitajima *et al.*, 2014; Sangsanont *et al.*, 2016; Schmitz *et al.*, 2016; Kato *et al.*, 2018; Sassi *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018; Tandukar *et al.*, 2018). En ocasiones estas muestras concentradas se utilizan para realizar una segunda concentración a través de la precipitación química mediante la adición de PEG (Hamza *et al.*, 2011a) o pasos adicionales con filtros centrífugos como el Centriprep YM-50 (Kitajima *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018) y filtros Centricon Plus-70 (Sangsanont *et al.*, 2016).

Además, se han empleado filtros centrífugos para concentrar directamente volúmenes más pequeños (<20 mL) como método primario (Rosario *et al.*, 2009). También ha sido posible extraer directamente el material genético de PMMoV de membranas electronegativas, que son utilizadas en los métodos de adsorción-elución (Hughes *et al.*, 2017; Symonds *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018).

Todos los métodos de concentración de virus mencionados anteriormente se han desarrollado para virus entéricos que tienen formas y estructuras de cápside diferente en comparación con el PMMoV. Por ello, las futuras investigaciones deberían garantizar que este virus se concentre de manera similar (Kitajima, Sassi y Torrey, 2018). Además, el

uso de controles de proceso, que generalmente es un virus similar al virus de referencia que será analizado, son necesarios para asegurar una concentración y detección de virus efectiva (Haramoto *et al.*, 2018).

Recientemente, en un estudio realizado por Kato *et al.* (2018), incorporaron al virus *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), también perteneciente al género Tobamovirus, como un control del proceso de concentración de virus para PMMoV (Kato *et al.*, 2018). No obstante, el virus Murine norovirus (MNV) se ha introducido ampliamente como un control molecular en diferentes estudios (Haramoto *et al.*, 2018). Sin embargo, el MNV es filogenéticamente y morfológicamente diferente (PMMoV forma de barra y MNV forma icosaédrica) y tiene una carga superficial diferente (pI: 3.2–3.8 para PMMoV y pI: 4.8 para MNV (Kitajima *et al.*, 2014). Por lo cual, el CGMMV que tiene una mayor similitud con el PMMoV, ha sido elegido como un control molecular más apropiado para este tipo de estudios (Kato *et al.*, 2018).

2.6.2.1 Métodos empleados para concentración de HAdV en muestras de agua

Los HAdV como otros virus necesitan ser concentrados cuando se quieren detectar en las muestras ambientales y especialmente en ambientes acuáticos, antes de que se pueda lograr la detección, debido a que se encuentran típicamente en concentraciones bajas y además por su pequeño tamaño (Jiang, 2006; Allard y Vantarakis, 2019).

Para muestras con volúmenes pequeños (≤ 1 L), las muestras de aguas residuales no tratadas utilizadas para detectar HAdV se pueden procesar por ultrafiltración de flujo tangencial con filtros de fibra hueca (Carducci y Verani, 2013), mediante ultracentrifugación (Calgua *et al.*, 2008; La Rosa *et al.*, 2010), así como por adsorción/elución usando membranas electronegativas (Rigotto *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2010; Grøndahl-Rosado *et al.*, 2014). En muestras con volúmenes de 1-10 L, que normalmente se aplican para analizar aguas residuales tratadas, se han concentrado a este virus entérico utilizando filtros de fibra hueca (Carducci *et al.*, 2009; Carducci y Verani, 2013), mediante ultracentrifugación (Bofill-Mas *et al.*, 2006; La Rosa *et al.*, 2010) y comúnmente a través del uso de membranas electronegativas (Schlindwein *et al.*, 2010;

Prado *et al.*, 2011; Hokajärvi *et al.*, 2013; Silverman *et al.*, 2013; Adefisoye *et al.*, 2016). Mientras que para muestras con volúmenes promedios mayores (>10 L), se aísla regularmente a HAdV en aguas superficiales, costeras, subterráneas y potable, a través de métodos tales como membranas electronegativas (Haramoto *et al.*, 2007; Fong *et al.*, 2010; Futch, Griffin y Lipp, 2010; Fongaro *et al.*, 2013), con membranas electropositivas Zeta Plus 1MDS (Ogorzaly *et al.*, 2010), también con filtros Nanoceram (Love *et al.*, 2014), filtros de lana de vidrio (Borchardt *et al.*, 2012) al igual por ultrafiltración de flujo tangencial con filtros de fibra hueca (Dong, Kim y Lewis, 2010; Rhodes *et al.*, 2016). Además, es común que se utilice una segunda o tercera concentración a las muestras empleando precipitación química mediante la adición de PEG (Borchardt *et al.*, 2012; Carducci y Verani, 2013; Grøndahl-Rosado *et al.*, 2014; Love *et al.*, 2014) o la separación física con filtros centrífugos como el Centriprep YM-50 (Haramoto *et al.*, 2007; Futch, Griffin y Lipp, 2010; Fongaro *et al.*, 2013; Adefisoye *et al.*, 2016) y filtros Amicon Ultra 100K (Fong *et al.*, 2010).

No obstante, se han utilizado algunas técnicas de reconcentración como métodos primarios como por ejemplo, mediante precipitación química con PEG (Dong, Kim y Lewis, 2010; Hewitt *et al.*, 2013), por floculación orgánica con extracto de carne (Rodríguez *et al.*, 2013), con agentes aglutinantes como las Celitas (Brinkman *et al.*, 2013), así como con filtros centrífugos (Sidhu, Ahmed y Toze, 2013). También este virus ha sido detectado a través de la extracción directa del material genético de membranas electronegativas (Ahmed *et al.*, 2015).

En cuanto a la determinación de la eficiencia en la recuperación del HAdV se ha utilizado el bacteriófago PP7 en muestras de agua superficial (Kundu, McBride y Wuertz, 2013) y al bacteriófago MS2 en muestras de agua costeras y pluviales (Dong, Kim y Lewis, 2010). También, el Poliovirus (PV) ha sido empleado como control de eficiencia en muestras de agua superficial (Hata *et al.*, 2014) e incluso algunos serotipos de este mismo virus (HAdV-5) en muestras de agua residual y superficial (Prevost *et al.*, 2015). Estos virus han sido probados en muchas investigaciones como un modelo de comportamiento de virus entérico en el tratamiento del agua, los cuales tiene propiedades y características

bien conocidas. Además, estos virus son indicadores de bajo riesgo, fácil de enumerar o de cuantificar (Dong, Kim y Lewis, 2010).

2.7 Métodos de detección de virus en agua

La investigación de los virus presentes en medios acuáticos, necesita un proceso de recuperación de las partículas víricas e incluir un análisis para la detección de los virus estudiados (Calgua de León, 2013). En las últimas décadas, el empleo de técnicas de biología molecular ha permitido incrementar la sensibilidad y especificidad. Además, proporcionan resultados en el menor tiempo posible (Pina Pedrero, 2001). No obstante, la detección molecular de virus en el ambiente no aporta información sobre la viabilidad de las partículas víricas (Sobsey *et al.*, 1998).

A pesar de la vital contribución de los microorganismos en los sistemas acuáticos, no todos pueden ser investigados frecuentemente en estos sistemas, entre ellos los virus, ya que son muy numerosos y cada uno requiere de métodos específicos para su detección en el agua (IDRC, 1997).

Los métodos de detección de virus se han aplicado durante muchos años en el diagnóstico médico. Algunos de estos métodos han sido modificados y adaptados para ser utilizados en el análisis de muestras ambientales (Hryniszyn, Skonieczna y Wiszniowski, 2013). En la Tabla 4 se analizan las herramientas de detección más aplicadas en virología ambiental.

Tabla 4. Comparación de métodos utilizados para la detección de virus en fuentes ambientales (Tomada y modificada de Fong y Lipp, 2005; Hamza y Bibby, 2019).

Métodos	Ventaja	Desventajas
Técnicas de infectividad		
Inoculación en Animales	<ul style="list-style-type: none"> Permite estudiar patogenicidad 	<ul style="list-style-type: none"> Método lento y costoso Aplicable sólo a algunos virus
Cultivo celular	<ul style="list-style-type: none"> Permite estudiar viabilidad Permiten cuantificar partículas infecciosas 	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidad variable en función de la línea celular y el tipo de virus Aplicable sólo para algunos virus Método lento y caro Necesidad de utilizar de forma combinada técnicas inmunológicas o moleculares
Técnicas de microscopia		
Microscopio electrónico	<ul style="list-style-type: none"> Detección rápida Información morfológica 	<ul style="list-style-type: none"> Baja sensibilidad Posibilidad de confusión ya que el diagnóstico se realiza basándose en criterios morfológicos
Técnicas moleculares		
PCR punto final	<ul style="list-style-type: none"> Detección rápida Mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo de células 	<ul style="list-style-type: none"> Presencia o ausencia solamente Inhibidores presentes en las muestras ambientales pueden interferir con la amplificación
Multiplex PCR	<ul style="list-style-type: none"> Varios tipos, grupos o especies de virus se pueden detectar en una sola reacción Detección rápida y bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> Difícil de lograr la igualdad de sensibilidad para todas las especies de virus específicos, grupos o tipos Puede producir la amplificación no específica en muestras ambientales
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> Proporciona datos cuantitativos Bajo riesgo de contaminación Muy sensible y específico 	<ul style="list-style-type: none"> Costo elevado Sensible a los inhibidores Incapaz de evaluar la infectividad
PCR Digital	<ul style="list-style-type: none"> Menos afectado por los inhibidores de la PCR; Mayor precisión No se realiza curva estándar 	<ul style="list-style-type: none"> Instrumentos y reactivos costosos Volumen de reacción limitado Bajo rango dinámico y rendimiento
Metagenómica	<ul style="list-style-type: none"> No es necesario cultivar o clonar antes del análisis de secuencias Proporciona información detallada sobre diversidad microbiana 	<ul style="list-style-type: none"> Costoso Análisis de datos complejos No puede estudiar genomas menos abundantes Métodos aún en desarrollo

En la aplicación de estas técnicas de detección se requieren pasos previos de extracción y purificación de los ácidos nucleicos (ADN/ARN) virales, lo cual es fundamental para lograr la sensibilidad de detección requerida considerando el número relativamente bajo de partículas virales presentes en aguas ambientales (Girones *et al.*, 2010; Saavedra, Tovar y Betancourt, 2012).

Con la contribución de dichas técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), la utilización de esta metodología para la detección de virus en sistemas acuáticos ha sido rápida, específica y de una sensibilidad de hasta una partícula viral (Hryniszyn, Skonieczna y Wiszniowski, 2013; Hamza y Bibby, 2019). De igual manera, al desarrollarse la técnica de transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), ha sido especialmente importante para la detección de virus de ARN (Grabow, Taylor y de Villiers, 2001). La especificidad de estas dos técnicas radica en que se detectan secuencias de nucleótidos del genoma del virus de interés, aunque no es posible saber si los virus detectados son activos o infecciosos (Sobsey *et al.*, 1998; Abbaszadegan, Stewart y LeChevallier, 1999).

La mayoría de virus de origen fecal no se pueden detectar con los métodos convencionales de cultivo celular o su eficacia de detección es muy bajo. Por esta razón, los métodos moleculares para virus en el agua, han encontrado rápidamente su camino en el análisis del medio ambiente, ya que pueden ser muy específicos para especies particulares y proporcionar más información filogenética sobre los patógenos. Por lo tanto, los métodos moleculares parecen ser más adecuados para las evaluaciones de riesgos para la salud (Girones *et al.*, 2010; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

2.7.1 *Detección de virus en agua mediante PCR cuantitativa (qPCR)*

La sensibilidad de la técnica de PCR en punto final es muy elevada, pero presenta algunas desventajas. Por ejemplo, tiene una alta probabilidad de tener falsos positivos por contaminación y, además, no proporciona datos cuantitativos. Para resolver este último problema, se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR,

dando lugar a la PCR cuantitativa (qPCR), o PCR en tiempo real (Girones *et al.*, 2010). La importancia en la qPCR es la posibilidad de detectar en tiempo real nuestro gen de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN complementario o en sistemas fundamentados en reporteros fluorescentes (Foy y Parkes, 2001; Zipper *et al.*, 2004). En general, estas técnicas pueden ser clasificadas en métodos específicos y no específicos (Figura 9).

Los métodos específicos se basan en el principio conocido como transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET por sus siglas en inglés) para generar la señal; esta técnica consiste en transferir energía desde un donador (reportero) fluorescente a un aceptor (apagador o quencher) (Kubista *et al.*, 2006). Existen dos métodos específicos basadas en hidrólisis, por hibridación y sondas de horquilla. Los primeros se basan en sondas que tienen incorporada una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe la fluorescencia, de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de un sitio por acción del ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del inhibidor de la fluorescencia, y emite fluorescencia al ser iluminada. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan (Livak, Flood y Marmaro, 1995; Cornejo, Serrato y Rendón, 2014) (Figura 9b).

Los métodos no específicos son aquellos que se basan en el empleo de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena (se unen al surco menor) y cuando son oxidados producen una señal fluorescente. Dicha fluorescencia emitida es detectada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. La sonda más utilizada para estos fines se llama SYBR Green (Lutfalla y Uze, 2006; Cornejo, Serrato y Rendón, 2014) (Figura 9a).

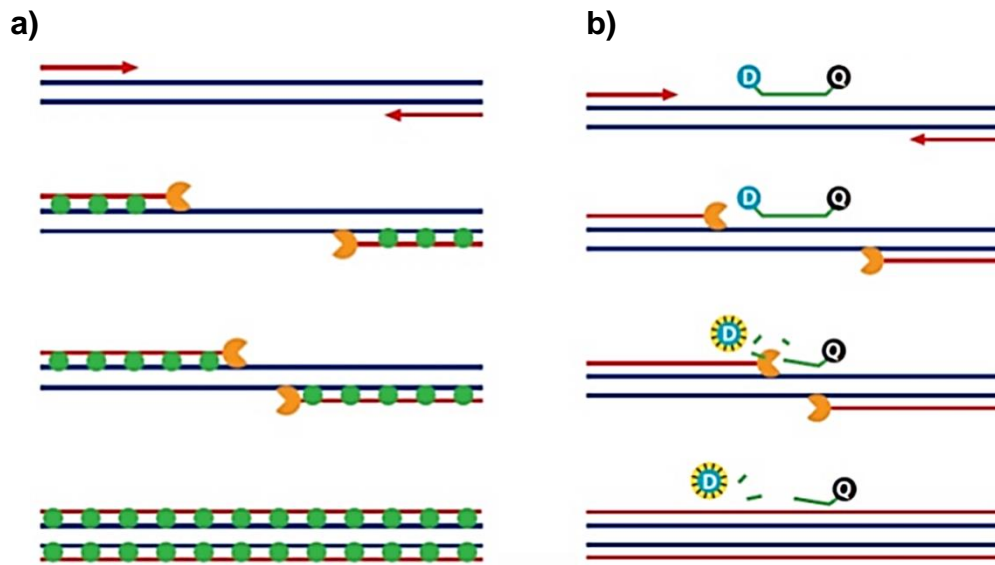


Figura 9. Métodos para la realización de PCR cuantitativo: no específicos (a. colorante SYBR Green) y específicos (b. sonda TaqMan) (Tomada de <https://image.slidesharecdn.com/meltcurvepresentationv4-150402130636-conversion-gate01/95/understanding-melt-curves-for-improved-sybr-green-assay-analysis-and-troubleshooting-3-638.jpg?cb=1427980186>)

2.8 La península de Yucatán: problemática de contaminación del acuífero

A nivel nacional se reconoce que los acuíferos de la península de Yucatán (PY) son la gran reserva de agua dulce del país. En la PY, como en cualquier zona de karst (deriva del alemán y significa “país rocoso” utilizado en un principio para referirse a una región de roca caliza) (Renault, 1986), el acuífero es la principal fuente de abastecimiento para todas las actividades humanas (uso y consumo humano) y soporta gran cantidad de biomasa terrestre (Bautista, 2011) .

Una característica importante de la PY es la presencia de cenotes, los cuales son los más abundantes sistemas acuáticos permanentes de la región suroeste de México (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). El término cenote es una palabra de origen maya ts’ono’ot o d’zonot, que significa caverna con depósito de agua y se refiere a cualquier espacio subterráneo con agua, con la única condición de que esté abierto al exterior en algún grado y son los principales signos visibles del sistema acuático subterráneo distintivo de la PY (Beddows *et al.*, 2007).

En los últimos años, el incesante desarrollo económico y el crecimiento de la población de la PY constituye un serio riesgo para la calidad del agua subterránea, ya que en las áreas urbanas se presenta un panorama complejo de actividades humanas potencialmente contaminantes (Foster *et al.*, 2002; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). Ya que una parte de la población que no cuenta con los servicios de drenaje sanitario y saneamiento, recurren a sistemas alternativos para la evacuación de las aguas residuales que generan, como son las fosas sépticas mal diseñadas (Granel y Hita, 2002; FONATUR, 2014). Tan solo en las zonas conurbadas del norte del estado de Quintana Roo, se estima que existen 140 mil viviendas ubicadas en sitios irregulares carentes de servicios públicos. Ante la falta del vital líquido los habitantes recurren a diversas prácticas para conseguir el agua, como es la instalación de pozos a particulares y el acarreo del agua desde diversas fuentes alternas como los cenotes (CAPA, 2016).

La calidad del agua subterránea de la PY puede deteriorarse debido a un rápido desarrollo urbano y al aumento en la densidad poblacional, ya que es una de las principales regiones turísticas en México (Secretaría de Turismo del estado de Quintana Roo, 2017). Por ejemplo, una práctica común en la PY es disponer de las aguas residuales tratadas a través de la inyección a los acuíferos de la zona, la introducción de estos contaminantes aumenta el riesgo de que las aguas residuales, con el tiempo, contaminen el acuífero de abajo hacia la superficie (Beddows *et al.*, 2005; Leal-Bautista *et al.*, 2013). Por lo cual, esto deriva en un aumento significativo del potencial de contaminación de las aguas subterráneas (Perry *et al.*, 1989; Marin y Perry, 1994; Mc Murry *et al.*, 1998).

2.9 Contaminación microbiológica del agua en la Península de Yucatán

En los últimos años, se ha reportado la presencia de diversos contaminantes en las aguas subterráneas del acuífero de la PY (Pacheco y Cabrera, 1997; Vazquez-Borges, 1997). En la región se han realizado varios estudios para determinar las causas y los efectos de los contaminantes que resultan de las actividades humanas (Marín *et al.*, 2000; Metcalfe

et al., 2011), con un énfasis particular en la contaminación bacteriológica (Hernández-Terrones *et al.*, 2011; Leal-Bautista *et al.*, 2013).

Por lo que respecta a los virus, en los últimos años se han realizado pocos estudios sobre la presencia de estos microorganismos en cuerpos de agua en la PY. Uno de los primeros trabajos se llevó a cabo por Rosiles-González *et al.*, 2017, en el cual se reportó la presencia de colifagos y del virus de plantas PMMoV en agua de cenotes y salobre (Rosiles-González *et al.*, 2017). De igual manera, en ese mismo año se detectó la presencia de colifagos así como al virus entérico HAdV (Ávila-Torres, 2017) y posteriormente se reportó la presencia de Norovirus GI y Norovirus GII en el acuífero (Rosiles-González *et al.*, 2019). Algunos otros trabajos han reportado la presencia de HAdV, Aichivirus (AiV), NoV (GI y GII) y HAdV en cenotes y en descargas de agua subterránea en la zona costera (Hernández-Flores, 2018; Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019).

Con base en lo anterior, surge la necesidad de optimizar métodos para determinar la cantidad de los virus PMMoV y HAdV presentes en el acuífero de la PY, ya que estos resultados tienen el fin de tener un mejor panorama que permita predecir o minimizar los riesgos para la salud de la población expuesta a cuerpos de agua contaminados con materia fecal.

3 Justificación

Actualmente se necesitan indicadores precisos de contaminación fecal para minimizar los riesgos para la salud pública asociados con la contaminación de aguas residuales en ambientes acuáticos. Sin embargo, los indicadores bacterianos utilizados actualmente para monitorear la calidad del agua no siempre se correlacionan con la presencia de patógenos virales.

Recientemente se ha propuesto al virus de plantas *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y los Adenovirus Humanos (HAdV) como un posible indicador fecal en agua, puesto que se han reportado su presencia en concentraciones de hasta 10^8 CG/L en diferentes

muestras de agua como: residual, tratada, potable, superficial, marina e incluso en aguas subterráneas.

Debido a que la presencia de estos virus en diversos cuerpos de agua es muy frecuente, incluso ambos han sido reportados en la PY, es de suma importancia conocer el estado de los cuerpos de agua y conocer en qué medida la presencia de los virus está relacionada con la salud pública. Sin embargo, existen una gran variedad de métodos para concentrar y detectar a PMMoV y HAdV en muestras de agua, aunque se ha observado que la eficiencia de los métodos depende del tipo o cuerpo de agua entre otros factores. Por ello, es de gran importancia contar con métodos de diagnóstico rápidos, económicos y eficientes que permitan monitorear la presencia de estos virus en una variedad de aguas ambientales.

4 Hipótesis

La comparación de los métodos para concentrar muestras y detectar virus como PMMoV y HAdV presentes en el agua, permitirá identificar un método eficiente que puede aplicarse en diferentes cuerpos de agua del acuífero de Quintana Roo.

5 Objetivo general

Optimizar métodos para determinar la presencia de los virus PMMoV y HAdV en cuerpos de agua de la zona norte de Quintana Roo.

6 Objetivos específicos

- Realizar la concentración de las muestras de agua a través del uso de tres métodos
- Cuantificar al PMMoV y a los HAdVs a través del ensayo de qPCR utilizando sondas TaqMan y SYBR Green en diferentes muestras de agua concentradas a través de tres métodos

- Comparar los métodos de concentración y las concentraciones obtenidas del PMMoV y de los HAdVs
- Realizar una valoración técnica y económica de las metodologías utilizadas para determinar la presencia de PMMoV y HAdV en diferentes tipos de agua

7 Materiales y métodos

7.1 Estrategia experimental

Para determinar la presencia del PMMoV y de HAdVs en los cuerpos de agua bajo estudio, los volúmenes de las muestras colectadas para cada virus (50 L, 20 L, 10 L y dos muestras de 5 L), se concentraron para obtener las partículas virales y la posterior detección por técnicas moleculares. Para ello, se realizó la concentración de las muestras mediante tres métodos; el primero método fue por ultrafiltración tangencial, seguido de una precipitación con PEG y una centrifugación siguiendo la metodología descrita por Hill *et al.* (2007) y Hernández-Morgan *et al.* (2009) y finalmente una separación entre fases, de la cual se seleccionó la fase acuosa superior. El segundo método fue por filtración tradicional, para esto se utilizaron filtros cargados negativamente de acuerdo a lo publicado previamente por Katayama *et al.* (2002), el cual consistió en un acondicionamiento de la muestra con $MgCl_2$, seguido de un enjuague ácido mediante ácido sulfúrico y la elución alcalina de las partículas víricas con hidróxido de sodio. En el tercer método se utilizó la misma metodología que el método 2, sin embargo, a estas muestras se les aplicó una segunda concentración por ultrafiltración mediante filtros centrífugos. Posteriormente, se extrajo el ARN total para obtener el ADNc así como el ADN total que se utilizaron como templado para la cuantificación del PMMoV y del HAdV, respectivamente. Para determinar las concentraciones virales se utilizó la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), empleando dos metodologías diferentes (SYBR Green y Sonda TaqMan), para ello se utilizaron cebadores y sondas específicas para los virus a estudiar. Las concentraciones se expresaron en Copias de Genoma viral por Litro de agua (CG/L). El esquema de la estrategia experimental se muestra en la Figura 10.

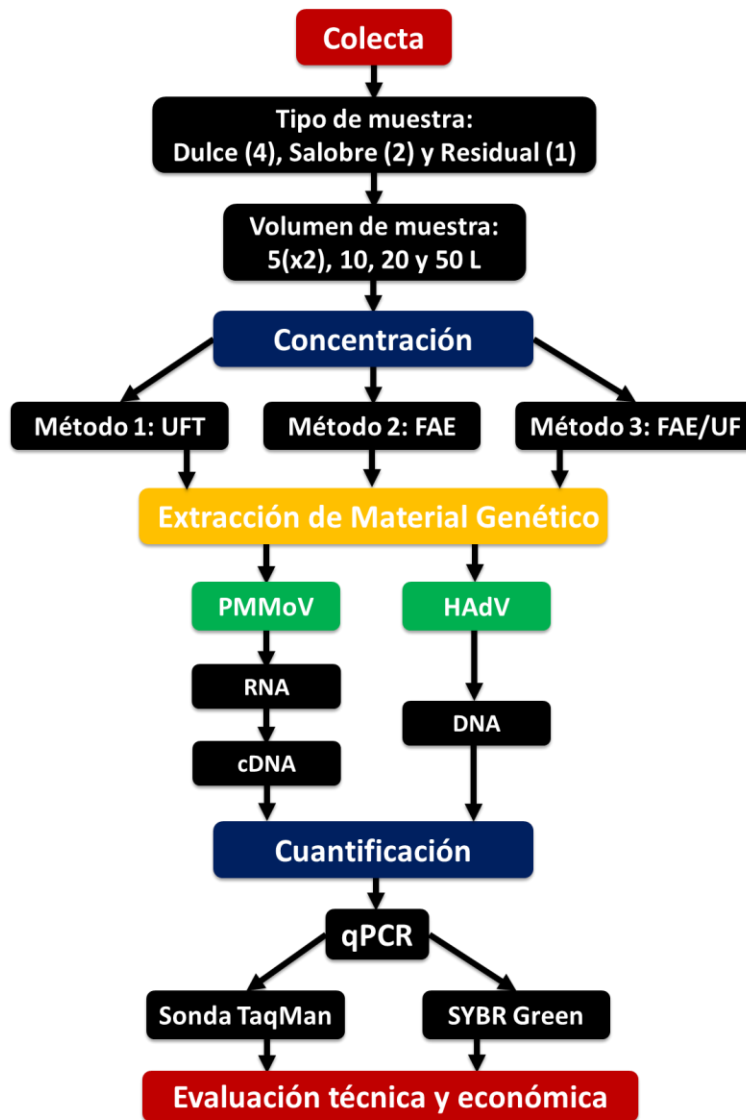


Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental seguida para cumplir los objetivos del presente trabajo.

7.2 Área de estudio y colecta de muestras de agua

Se colectaron un total de 35 muestras de agua a partir de siete sitios ubicados en la zona norte de Quintana Roo. La zona de colecta comprendió las localidades de Cancún, Puerto Morelos, Leona Vicario y la localidad de Akumal (Figura 11). Cuatro sitios corresponden a cuerpos de agua dulce (dos pozos y dos cenotes), dos son sitios de agua salobre (mezcla de descargas de aguas subterráneas y agua de mar) y un sitio de efluente de planta de tratamiento de aguas residuales (Tabla 7). Además, se colectaron 3 volúmenes

de agua diferentes (50, 20 y 10 L) los cuales fueron concentrados por el método 1. Se colectaron 5 L (dos veces) los cuales fueron procesados de acuerdo al método 2 y el método 3 (5 L para el método 2 y 5 L para el método 3). Se determinó la calidad del agua mediante la medición de parámetros fisicoquímicos tales como temperatura ($^{\circ}\text{C}$), conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), salinidad y sólidos disueltos totales (g/L), utilizando una sonda multiparamétrica YSI 600QS, mientras que el Ph y oxígeno disuelto (mg/L) se midieron con una sonda HACH HQd. Todos los parámetros se midieron *in situ* por triplicado durante las colectas. Las muestras se recolectaron en la superficie del cuerpo de agua y se almacenaron en contenedores de 10 L de polietileno a temperatura ambiente. En campo, antes de tomar la muestra, los contenedores fueron enjuagados tres veces con agua del sitio de colecta.

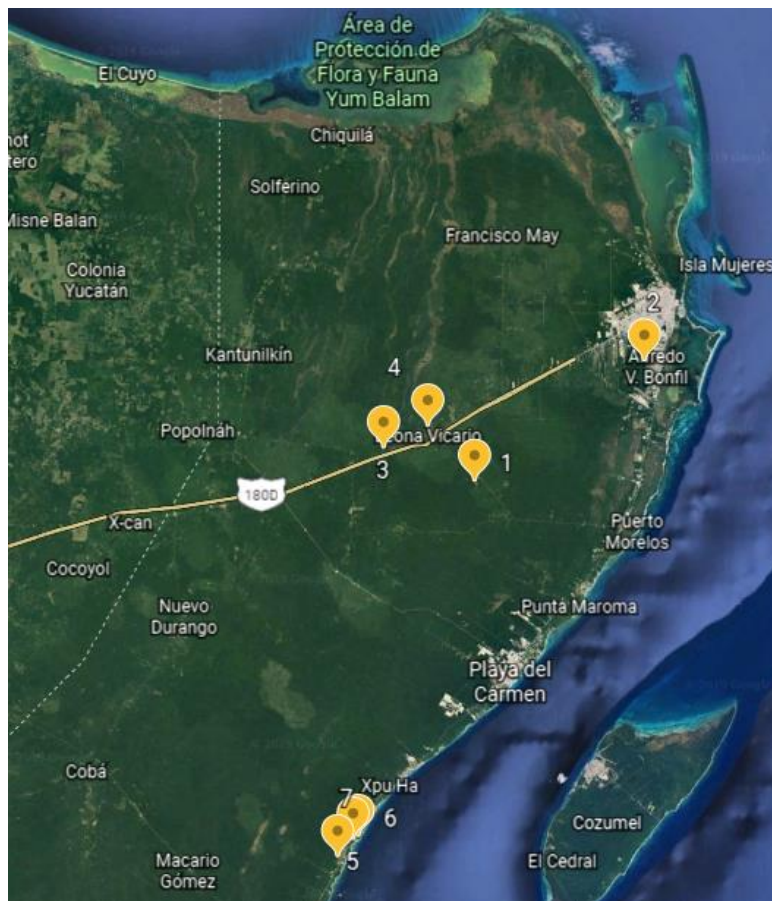


Figura 11. Ubicación de los sitios de muestreo en la zona norte de Quintana Roo, México.

Tabla 5. Nombres, ubicaciones y tipo de los cuerpos de agua colectados para este estudio.

Tipo de agua	Tipo de muestra	Sitio de muestreo	Localidad	Número asignado a cada muestra
Agua dulce	Agua subterránea	Pozo Casa-Habitación	Alfredo V. Bonfil	1
	Agua subterránea	Pozo de Extracción	Puerto Morelos	2
	Cenote urbano	Leona Vicario Carretera	Leona Vicario	3
	Cenote rural	Leona Vicario Ciudad	Leona Vicario	4
Agua salobre	Descarga de agua subterránea	Punta Norte	Akumal	5
	Descarga de agua subterránea	Punta Sur	Akumal	6
Agua residual	Efluente de PTAR	PTAR	Akumal	7

7.3 Método 1 – Concentración de partículas virales por Ultrafiltración Tangencial (UFT)

Las muestras ambientales se concentraron mediante el método descrito por Hill *et al.* (2007) y Hernández-Morga *et al.* (2009), con ligeras modificaciones (Figura 12). Se utilizó un filtro de diálisis de la marca Fresenius F80A de fibra hueca de polisulfona con un diámetro 200 µm y un área nominal de 1.8 m². El tamaño del poro utilizado retiene partículas de un peso molecular de 15,000 – 20,000 MWCOs. Todos los materiales y soluciones fueron esterilizados antes de cada uso y los filtros no se reutilizaron.



Figura 12. Fotografía del sistema de ultrafiltración tangencial utilizado para este estudio (UCIA, 2018).

Previo a la ultrafiltración se adicionó Polifosfato de Sodio (NaPP) a cada muestra de agua para obtener una concentración de 0.01 % (w/v) y se mezcló mediante agitación manual. Después, se circuló 500 mL de la solución de bloqueo (NaPP al 0.1%) con un flujo de 1700 mL/min por ~15 min, manteniendo el puerto de permeado cerrado y aplicando presión menor a 10 psi a la manguera del retentado. El valor del flujo se mantuvo durante todo el proceso. Transcurrido este tiempo, se procedió a abrir el puerto de permeado y se recirculó la solución de bloqueo hasta que toda la solución inicial salió por el puerto de permeado. Posteriormente, las muestras de agua/NaPP (10, 20 y 50 L) se recirculó en el sistema de ultrafiltración con el puerto de permeado abierto y se aplicó presión a la manguera del retentado manteniendo la presión menor a 10 psi. Obteniendo así un concentrado final entre 100 a 200 mL de la muestra inicial. Se repitió lo anterior para concentrar todas las muestras colectadas. Después, se hizo circular 500 mL de la solución de retrolavado (Tween 80 al 0.01%, NaPP al 0.01% y Antifoam Y-30 al 0.001%) por 5 min en el sistema de ultrafiltración con el puerto de permeado cerrado y de igual forma se quitó la presión ejercida a la manguera del retentado. Transcurrido este tiempo, se procedió a abrir el puerto de permeado con una presión aplicada menor a 10 psi a la manguera del retentado y se recirculó la solución de retrolavado hasta que se obtuvo un concentrado final entre 150 a 200 mL de la solución inicial. El volumen concentrado de las muestras de agua se añadió al volumen del concentrado del retrolavado hasta obtener un volumen final de 350 mL para las muestras de 50 L y 250 mL para las muestras de 20

y 10 L. Este concentrado final se le realizó una segunda concentración para la precipitación de las partículas virales como lo describió previamente (Hernández-Morgan, 2009). Para esto, se le agregó Polietilenglicol (PEG 8000) al 12% y NaCl a 0.8 mol/L. Se mezcló hasta homogenizar y se incubó toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, la tercera concentración se llevó a cabo centrifugando a 7000 rpm por 30 min a 4 °C, descartando el sobrenadante y concentrando todo el volumen obtenido. Se rescataron las pastillas y se resuspendieron con 5 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X. De igual manera, se añadieron 5 mL de Butanol:Cloroformo (1:1), se mezcló por inversión 10 veces y se centrifugó a 7000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, se rescató la fase acuosa y se separaron en alícuotas de 1.5 mL. Finalmente, se almacenaron los concentrados a -18 °C (Figura 13).

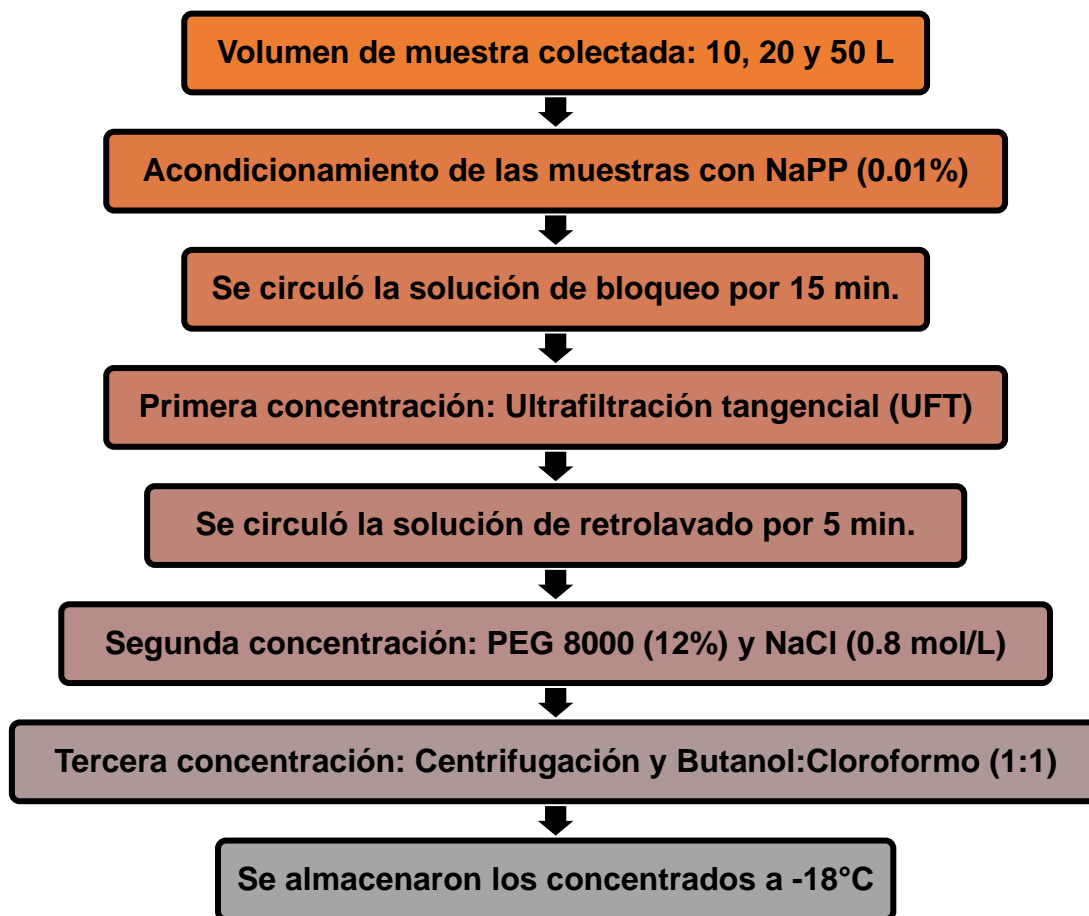


Figura 13. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 1 (UFT).

7.4 Método 2 – Concentración de partículas virales por Filtración de Adsorción-Elución (FAE)

De igual manera, las partículas virales se concentraron mediante un método similar al descrito por Katayama *et al.* (2002), con ligeras modificaciones (Figura 14). Brevemente, las muestras de aguas se acondicionaron con MgCl_2 a 2.5 M para obtener una concentración final de 25 Mm (es decir, 1 mL de MgCl_2 por cada 100 mL de muestra) y se mezcló vigorosamente. Esto se realizó para que los virus se adhieran al filtro por un diferencial de cargas. Después, en volúmenes de 200 mL se transfirió la muestra acondicionada a un filtro electronegativo de esteres de celulosa con un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ (HAWP-090-00, Merck Millipore), unido a un portafiltro de plástico aplicando vacío hasta que el filtro se bloqueó en ~95%. Luego, se realizó un enjuague con ácido a la membrana con 200 mL de H_2SO_4 a 0.5 Mm (pH 3) para remover los cationes que se encontraban en el filtro. Posteriormente, se realizó una elución alcalina con 10 mL de NaOH a 1 Mm (pH 10.3) para eluir los virus en el filtro, el eluato se recibió y neutralizó con ayuda de un tubo Falcon de 50 mL que contenía 10 μL de H_2SO_4 a 100 Mm y 100 μL de TAE 1X. Por último, se almacenaron los concentrados a -18°C (Figura 15).



Figura 14. Fotografía del sistema de filtración por adsorción-elución utilizado para este estudio (UCIA, 2018).

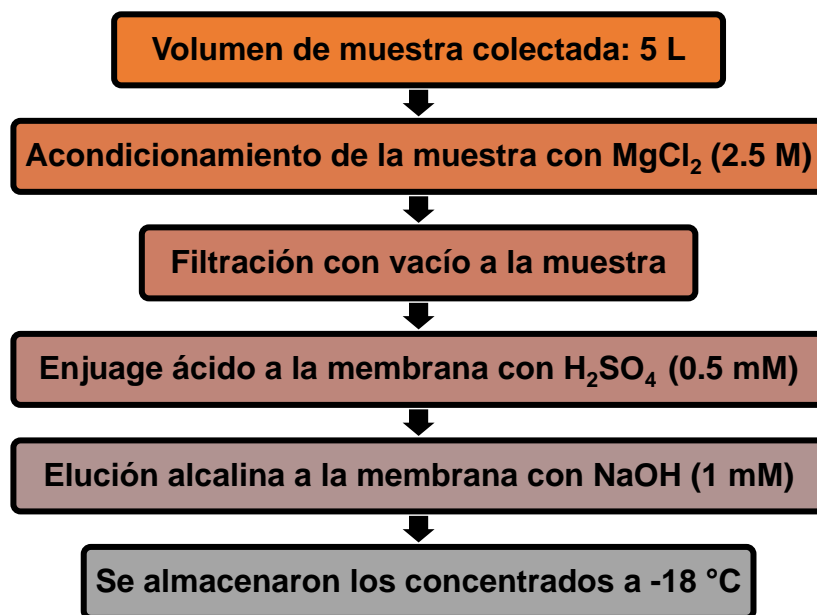


Figura 15. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 2 (FAE).

7.5 Método 3 - Concentración de partículas virales por Filtración Adsorción-Elución/Ultrafiltración (FAE/UF)

Con respecto a este método, primero se concentraron las muestras a partir del método 2 y posteriormente al volumen obtenido se le realizó una segunda concentración mediante un filtro centrífugo (Centriprep[®] YM-50, Merckmillipore[®]) con un límite de peso molecular nominal (NMWL) de 50 kDa, tal como lo describe Kitajima *et al.*, (2004). Para esto, se adicionó el concentrado que se obtuvo por el método 2 al filtro centrífugo y se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min. Se descartó la porción que pasó a través de la membrana y se centrifugó nuevamente a 2,500 rpm durante 5 min para obtener un volumen final de 600 – 650 μ L y se conservó a -18 °C (Figura 16).

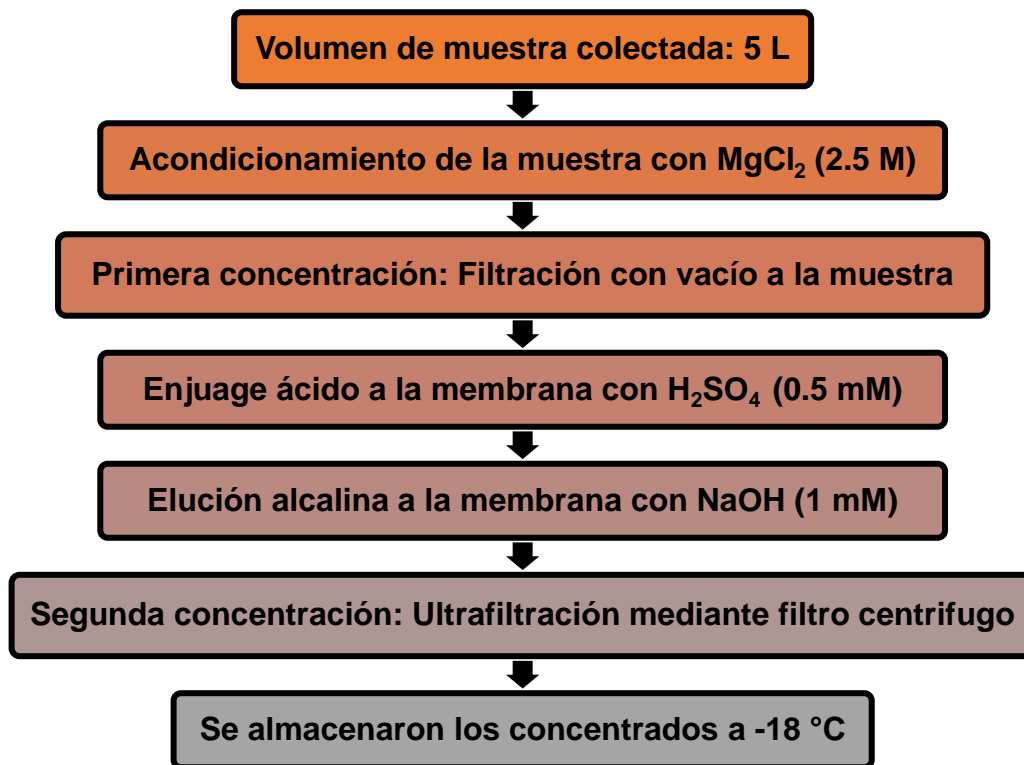


Figura 16. Diagrama de flujo de concentración de partículas virales en agua por el método 3 (FAE/UF).

7.6 Cálculo del factor de reducción de las muestras de agua concentradas

Para la obtención del factor de reducción del volumen de las muestras de agua que fueron concentradas mediante los métodos 1, 2 y 3, se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Factor de reducción} = \frac{\text{Volumen de la muestra inicial (L)}}{\text{Volumen de la muestra final (L)}}$$

Donde, el volumen inicial corresponde al volumen total de la muestra que fue procesada a través de los tres métodos de concentración viral, mientras que el volumen final se refiere al volumen total de la muestra que se obtuvo luego de ser concentradas mediante los tres métodos de concentración viral.

7.7 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de DNA total de las muestras de agua concentradas se utilizó el kit QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen®), con el doble del volumen por muestra y reactivos en relación a lo indicado en las instrucciones del fabricante, que se describen a continuación:

Previamente, se limpió el área, equipos así como materiales con alcohol y cloro. En un tubo Eppendorf, se pipetearon 40 µl de Proteinasa K. Al tubo se le adicionaron 400 µl de muestra de agua concentrada. Después, a la mezcla anterior se le añadieron 400 µl de buffer AL2, se homogeneizó mediante agitación por vortex durante 15 seg y se incubó en baño seco a 56 °C por 10 minutos. Después de la incubación se agregaron 400 mL de etanol 96-100 % a la mezcla y se mezcló en un vortex, se centrifugó la mezcla para quitar gotas de tapa y paredes del tubo. Seguidamente, la mezcla obtenida en el paso anterior se trasladó a una mini columna y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min, la mini columna se colocó un nuevo tubo colector, descartando el anterior con el filtrado. Después se añadieron 500 µl de Buffer AW1 a la mini columna y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Nuevamente se cambió la mini columna a un nuevo colector, descartando el anterior y se añadieron 500 µl de Buffer AW2 a la mini columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min. Luego, se colocó la mini columna en un tubo Eppendorf nuevo, descartando el colector anterior con el filtrado y el tubo con la mini columna se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Luego, se cambió el tubo Eppendorf por uno nuevo y se añadieron 30 µl de Buffer AE dejando incubar 3 min a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de incubación, el tubo con la mini columna se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Del mismo modo, se añadieron 20 µl de Buffer AE y se dejó incubar 3 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 8,000 rpm por 1 min. Finalmente, se descartó la mini columna mientras que el tubo con el ADN total se almacenó a -80°C.

Para verificar el resultado de la extracción de ADN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (0.6 g de agarosa + 60 mL de solución TAE 1X+ 3 µL de bromuro de etidio) y se corrieron 5 µL del DNA extraído a 80 volts por 30 minutos. Para realizar la lectura de las bandas, se empleó un transiluminador 3UV (UVP®).

7.8 Extracción de ARN genómico

Se realizó la extracción de ARN total de las muestras de agua concentradas mediante el kit QIAmp® RNA Mini Kit (Qiagen®), empleando para este trabajo el doble del volumen por muestra y reactivos en relación a lo indicado en las instrucciones del fabricante. El método se describe a continuación:

Previamente, se limpió el área, equipos y materiales con alcohol, cloro y RNaseZap™ (Sigma-Aldrich®). En un tubo Falcon de 15 mL, agregaron 1,120 µL de Buffer AVL y 11.2 µL de Buffer AVE. Posteriormente, se agregaron 280 µL de muestra de agua concentrada y se agitó con un vortex durante 15 seg para homogeneizar. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min y después se centrifugó brevemente para remover gotas en la tapa y paredes del tubo. A la mezcla se adicionaron 1,120 µL de etanol al 96-100 %. De la solución obtenida en el paso anterior, se agregaron 630 µL a una mini columna la cual fue centrifugada a 8,000 rpm por 1 min. El tubo de colecta junto con el filtrado fue desechado y la mini columna se cambió a un nuevo tubo colector. Posteriormente, se agregaron 500 µL de Buffer AW1 a la mini columna y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. La mini columna se cambió a un tubo colector nuevo y se descartó el anterior con el filtrado. A la mini columna se le agregaron 500 µL de Buffer AW2 y se centrifugó a 13,000 rpm por 4 min. Nuevamente, la mini columna fue cambiada a un tubo de colecta nuevo y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. El tubo con el filtrado fue descartado y la mini columna se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se le agregaron 30 µL de Buffer AVE. Se dejó incubar 4 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó el tubo con la mini columna a 8,000 rpm durante 1 min y se repetir la operación, añadiendo 20 µL de Buffer AVE, incubando 4 min. para posteriormente centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, se descartó la mini columna mientras que el tubo con el ARN total se almaceno a -80°C.

Para verificar el resultado de la extracción de ARN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (0.6 g de agarosa + 60 mL de solución TAE 1X+ 3 µL de bromuro de etidio) y se corrió a 80 volts por 30 minutos. Para realizar la lectura de las bandas, se empleó un transiluminador 3UV (UVP®).

7.9 Obtención de cDNA

A partir del ARN total extraído de cada muestra de agua, se obtuvo el ADNc usando el iScript™ Advance cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR de Bio-Rad, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y utilizando los volúmenes de los reactivos detallados en la siguiente (Tabla 8).

Tabla 6. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de ADNc.

Reactivos:	Volumen:
5x iScript Adv Reaction Mix	4 µL
iScript Adv Reverse Transcriptase	1 µL
Agua libre de nucleasas	10 µL
Muestra de RNA	5 µL
Volumen final	20 µL

Por otra parte, las muestras se introdujeron en un termociclador The SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific® Inc.). Las reacciones se llevaron a cabo en dos ciclos: 1 ciclo para la transcripción reversa de 20 min. a 46°C seguida de 1 ciclo para la inactivación de la transcriptasa reversa (RT) de 1 min. a 95°C. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C en el ultracongelador (Thermo Scientific®) para su posterior cuantificación.

7.10 Cuantificación de las partículas virales mediante qPCR (PCR cuantitativa)

7.10.1 Curva estándar

Para construir la curva estándar para el PMMoV y el HAdV fue necesario cuantificar la concentración del producto clonado con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = \frac{ADN \left(\frac{ng}{\mu L} \right) \times 1(g) \times 10^9 \times 1(mol)}{PM \left(\frac{g}{mol} \right) \times NA (mol)} = \left(\frac{N^\circ \text{ de partículas}}{\mu L} \right)$$

Donde el **ADN** corresponde al valor obtenido con un espectrofotómetro, **PM** es el peso molecular del plásmido con el inserto y **NA** es el número de Avogadro que corresponde a 6.023x10²³. Una vez calculada la concentración, se prepararon diluciones seriales del

plásmido control, en concentraciones que oscilaron en 10^0 hasta 10^5 . Se utilizaron plásmidos controles construidos y almacenados en el laboratorio y previamente secuenciados.

7.10.2 Cálculo de la concentración viral

Para calcular la concentración de PMMoV y HAdV de cada muestra se utilizó la ecuación de la recta $y = mx + b$ y así obtener el valor de C_q (quantification cycle):

$$C_q = \frac{C_T - b}{m}$$

donde C_T (Cycle threshold) es el valor promedio de los ciclos donde la amplificación rebasó el umbral (generado automáticamente por el equipo), b es la ordenada al origen y m es la pendiente de la recta. El límite de cuantificación se determinó con base en la amplificación de las dos réplicas del estándar menos concentrado, que fue de 10^0 CG/L. Con base en lo anterior, el límite de detección fue determinado con base en la amplificación de las dos réplicas del estándar con menor concentración.

Una vez obtenido el valor de C_q del PMMoV en cada muestra, las concentraciones finales de las muestras de agua concentradas con los tres métodos, se calcularon con la siguiente ecuación (Borchardt *et al.*, 2012):

Paso 1: Número de copias genómicas medidas en el qPCR

Paso 2: $\div \frac{\text{Volumen de ARN agregado a la reacción qPCR } (\mu\text{L})}{\text{Volumen de la reacción de ADNc } (\mu\text{L})}$

Paso 3: $\div \frac{\text{Volumen de ARN agregado a la reacción de ADNc } (\mu\text{L})}{\text{Volumen de la extracción de ARN } (\mu\text{L})}$

Paso 4: $\div \frac{\text{Volumen de la muestra de agua concentrada agregada para la extracción de ARN } (\mu\text{L})}{\text{Volumen final de la muestra de agua concentrada (mL)}}$

Paso 5: \div Volumen de la muestra de agua filtrada en Litros (mL)

Paso 6: \div Número de copias de PMMoV/Litro (CG/L)

Para estimar la concentración del HAdV de las muestras de agua concentradas mediante los tres métodos, se calcularon con la siguiente ecuación (Borchardt *et al.*, 2012):

Paso 1: Número de copias genómicas medidas en el qPCR

Paso 2: $\div \frac{\text{Volumen de ADN agregado a la reacción qPCR } (\mu\text{L})}{\text{Volumen de la extracción de ADN } (\mu\text{L})}$

Paso 3: $\div \frac{\text{Volumen de la muestra de agua concentrada agregada para la extracción de ADN } (\mu\text{L})}{\text{Volumen final de la muestra de agua concentrada (mL)}}$

Paso 4: \div Volumen de la muestra de agua filtrada (mL)

Paso 5: \div Número de copias de HAdV/Litro (CG/L)

7.10.3 Cuantificación del PMMoV

7.10.3.1 Cuantificación mediante sonda TaqMan

Para la cuantificación del PMMoV se utilizaron los cebadores descritos por Zhang *et al.*, (2006), los cuales amplifican un fragmento del gen que codifica un segmento de la región central de la proteína replicasa (RdRp). A continuación, se describen los reactivos, cebadores y programas que se utilizaron para la cuantificación de este virus de RNA respectivamente (Tabla 9, 10 y 11). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Tabla 7. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-TaqMan.

Reactivos:	Volumen:
Agua	14.9 μL
Buffer (10x)	2.5 μL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μL
dNTPs (10 mM)	0.5 μL
Sonda/Cebadores (20x)	1.25 μL
Platinum Taq DNA Polimerasa (5U/ μL)	0.1 μL
cDNA	5 μL
Volumen final	25 μL

Tabla 8. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de PMMoV (Zhang et al., 2006).

Gen target:	Primers:	Secuencia (5´-3´):	Tamaño del fragmento amplificado:
Proteína RdRp	PMMV-FP1-rev	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA	68 pb
	PMMV-RP1	TTGTCGGTTGCAATGCAAGT	
	PMMV-Probe1	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-BHQ1	

Tabla 9. Condiciones para los ciclos de qPCR para sonda TaqMan.

Número de Ciclos:	Condiciones para la amplificación:
1 ciclo	95 °C por 2 minutos
	95 °C por 30 segundos
40 ciclos	60 °C por 1 minuto
	72 °C por 30 segundos

7.10.3.2 Cuantificación mediante SYBR Green

Para la cuantificación del PMMoV mediante SYBR Green se utilizaron los cebadores como lo menciona Hamza *et al.*, (2011), los cuales amplifican un fragmento del gen que codifica un segmento de la región central de la proteína replicasa (RdRp). A continuación, se describen los reactivos, cebadores y programas que se utilizaron para la cuantificación de este virus de RNA respectivamente (Tabla 12, 13 y 14). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el mix SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de Bio-Rad y se amplificaron en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Tabla 10. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-SYBR Green.

Reactivos:	Volumen:
Agua	5.5 µL
Cebador Fw (20 µM)	1 µL
Cebador Rv (20 µM)	1 µL
Supermix (10x)	12.5 µL
DNA (>5 ng/µL)	5 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 11. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de PMMoV (Hamza et al., 2011).

Gen target:	Primers:	Secuencia en dirección (5´-3´):	Tamaño del fragmento amplificado:
Proteína RdRp	Ha-PMMV1 Ha-PMMV2	GTGGCAGCAAAGGTAATGGT ATTTGCTTCGGTAGGCCTCT	80 pb

Tabla 12. Condiciones para los ciclos de qPCR para SYBR Green.

Número de Ciclos:	Condiciones para la amplificación:
1 ciclo	95 °C por 15 minutos
45 ciclos	95 °C por 20 segundos 58 °C por 45 segundos
1 ciclo	Curva Melt

Para la cuantificación con SYBR Green se realizaron al final de la amplificación una curva de disociación para identificar si hubo formación de dímeros o especificidad de los cebadores durante la reacción.

7.10.4 Cuantificación del HAdV

7.10.4.1 Cuantificación mediante sonda TaqMan

Para la cuantificación del HAdV se utilizaron los cebadores descritos por Heim *et al.*, (2003), los cuales amplifican un fragmento del gen que codifica un segmento parcial del hexón de HAdV. A continuación, se describen los reactivos, cebadores y programas que se utilizaron para la cuantificación de este virus de ADN, respectivamente (Tabla 15, 16

y 17). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Tabla 13. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-TaqMan.

Reactivos:	Volumen:
Agua	17.4 µL
Buffer (10x)	2.5 mL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 µL
Sonda/Cebadores (20x)	1.25 µL
Platinum Taq DNA Polimerasa (5U/µL)	0.1 µL
ADN (<5 ng/µl)	2.5 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 14. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de HAdV (Heim et al., 2003).

Gen target:	Primers:	Secuencia (5´-3´):	Tamaño del fragmento amplificado:
Hexón HAdV	AQ1	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	132 pb
	AQ2	TTGTTCGGTTGCAATGCAAGT	
	AP	FAM-	
	Probe	TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA	

Tabla 15. Condiciones para los ciclos de qPCR para sonda TaqMan.

Número de Ciclos:	Condiciones para la amplificación:
1 ciclo	95 °C por 2 minutos
	95 °C por 30 segundos
40 ciclos	55 °C por 30 segundos
	72 °C por 30 segundos

7.10.4.2 Cuantificación mediante SYBR Green

En cuanto a la cuantificación de HAdV mediante SYBR Green se utilizaron los cebadores reportados por Heim *et al.*, (2011). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el mix SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de Bio-Rad y se amplificaron en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1. Los reactivos, cebadores y programas que se utilizarán para la cuantificación de este virus de ADN, se describen a continuación (Tabla 18, 19 y 20).

Tabla 16. Componentes y volúmenes necesario para una reacción de qPCR-SYBR Green.

Reactivos:	Volumen:
Agua	9.5 µL
Primer Rv (AQ1) (20 µM)	1 µL
Primer Fw (AQ2) (20 µM)	1 µL
Supermix (10x)	12.5 µL
ADN (<5 ng/µL)	5 µL
Volumen final	25 µL

Tabla 17. Oligonucleótidos y sonda usados para la detección de HAdV (Heim *et al.*, 2003).

Gen target:	Primers:	Secuencia (5´-3´):	Tamaño del fragmento amplificado:
Hexón parcial	AQ1	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	132 pb
	AQ2	TTGTCGGTTGCAATGCAAGT	

Tabla 18. Condiciones para los ciclos de qPCR para SYBR Green.

Número de Ciclos:	Condiciones para la amplificación:
1 ciclo	98°C por 3 minutos
40 ciclos	98°C por 15 segundos
	55°C por 30 segundos
1 ciclo	Curva Melt

Para la cuantificación con SYBR Green se realizaron al final de la amplificación una curva de disociación para identificar si hubo formación de dímeros o especificidad de los cebadores durante cada reacción.

7.11 Evaluación del método óptimo para la detección de PMMoV y HAdV en muestras de agua

Para establecer cuál es el método más simple, rápido y eficiente para determinar la presencia de PMMoV y HAdV en las muestras de agua concentradas por diferentes métodos de concentración viral, se consideraron características tales como el volumen filtrado promedio, el número y porcentaje de muestras cuantificadas, las concentraciones promedio por cada método de cuantificación, el tiempo empleado para el procesamiento de las muestras desde su colecta hasta su cuantificación, así como también el costo por muestra considerando los costos de los reactivos requeridos para la concentración de las muestras de agua y posteriormente para la cuantificación de los virus PMMoV y HAdV. Una vez obtenidos estos valores, estos se compararon si fueron menores o mayores de acuerdo a las características estimadas y se determinó que método es el óptimo basado en aquel que obtenga más valores positivos.

8 Resultados

8.1 Colecta de muestras y parámetros físico-químicos

Se colectaron un total de 35 muestras en 7 sitios incluyendo cenotes, pozos, efluentes y agua salobre, durante los meses de septiembre del 2018 y enero del 2019. Los valores promedio obtenidos de los parámetros físico-químicos de las muestras se presentan en la Tabla 21.

La temperatura más baja se registró en el sitio 2 (pozo de extracción) con 24.97 °C, mientras que la más alta fue de 27.94 °C en el sitio 7 (efluente de planta de tratamiento). La conductividad con el valor más alto fue de 21.11 mS/cm en el sitio 5 (Descarga de agua subterránea) y el valor más bajo fue de 0.44 mS/cm en el sitio 4 (cenote rural). La salinidad registrada tuvo un valor máximo de 11.88 mg/L en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) y un mínimo de 0.20 mg/L en el sitio 4 (cenote rural). Con respecto al oxígeno disuelto, en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) se encontró el valor más bajo con 1.82 mg/L, mientras que en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) se reportó

el valor más alto con 32.70 mg/L. Finalmente el pH varió entre los sitios desde 6.75 en el sitio 7 (efluente de planta de tratamiento) hasta 7.46 en el sitio 4 (cenote rural). Los valores obtenidos de pH indican la prevalencia de condiciones ligeramente alcalinas para los sitios 1 al 6.

Cabe resaltar, que en los sitios 4 y 5 se obtuvieron los valores más bajos y altos, respectivamente, para los parámetros de conductividad, sólidos disueltos totales y salinidad.

Tabla 19.- Promedio de los parámetros físico-químicos obtenidos en los diferentes sitios de estudio.

Parámetros	Tipo de muestra y número de sitio						
	Agua dulce			Agua salobre			Agua residual
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	26.3	24.97	26.8	27.94	27.90	27.71	28.42
Conductividad eléctrica (mS/cm)	1.04	1.25	0.72	0.44	21.11	19.58	0.66
SDT (g/L)	0.66	0.81	0.45	0.27	13	12.10	0.40
Salinidad (mg/L)	0.50	0.62	0.34	0.20	11.88	10.99	0.30
Oxígeno Disuelto (mg/L)	5.24	4.93	2.61	3.66	1.82	6.19	5.47
pH	7.20	7.02	7.40	7.46	7.13	7.28	6.75

8.2 Concentración de las muestras de agua colectadas

8.2.1 Concentración de las muestras de agua por el método 1 (UFT)

Se colectaron volúmenes de muestra de 10, 20 y 50 L de cada sitio. En general, al utilizar el método de ultrafiltración tangencial como primera concentración, se logró filtrar todo el volumen de muestra colectado con la excepción de la muestra de 50 L colectada en el sitio 7, la cual no pudo filtrarse en su totalidad ya que esta contenía una gran cantidad de sólidos suspendidos, lo que contribuyó a la obstrucción del filtro en un lapso de tiempo corto. Se obtuvieron concentrados de 350 mL a partir de las muestras con volumen inicial de 50 L y de 250 mL a partir de las muestras de volumen inicial de 20 y 10 L. Al utilizar PEG/NaCl para realizar una segunda concentración de las muestras ultrafiltradas, se

obtuvieron volúmenes finales entre 2.90 a 8.45 mL para las muestras de volumen inicial de 50 L, donde el sitio con menor volumen concentrado correspondió al sitio 4 (cenote rural) y el sitio con mayor volumen concentrado obtenido correspondió al sitio 5 (descarga de agua subterránea). Las muestras colectadas con un volumen inicial de 20 L fueron concentradas a un volumen final de un rango de 2.50 hasta 8.99 mL. El sitio con menor volumen concentrado obtenido fue el sitio 4 (cenote rural) y el sitio con mayor volumen concentrado fue obtenido en el sitio 1 (pozo casa-habitación). Finalmente, para las muestras colectadas de volumen inicial de 10 L se obtuvieron volúmenes concentrados de entre 3.90 y 9.94 mL. El sitio con menor volumen concentrado obtenido fue del sitio 3 (cenote urbano) y el sitio con mayor volumen concentrado obtenido correspondió para el sitio 1 (pozo casa-habitación) (Tabla 20).

Tabla 20.- Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 1.

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado					
		10 L		20 L		50 L	
		Volumen inicial (L)	Volumen concentrado (mL)	Volumen inicial (L)	Volumen concentrado (mL)	Volumen inicial (L)	Volumen concentrado (mL)
Agua dulce	1		9.94		8.99		7.51
	2	10	4.53	20	5.15	50	5.19
	3		3.90		3.55		3.48
	4		5.13		2.50		2.90
Agua salobre	5	10	4.55	20	2.60	50	8.45
	6		4.49		5.02		4.55
Agua residual	7	10	4.80	20	5,20		NA

NA: No se procesó la muestra

Las muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 10 L mostraron un valor mínimo de reducción de 1,000 en el sitio 1 y un valor máximo de reducción de 2,600 en el sitio 3, mientras que las muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 20 L se redujeron un menor número de veces en el sitio 1 y mayor número de veces en el sitio 4 con un rango entre 2,200 a 8,000 veces, respectivamente (Tabla 21). Las muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 50 L mostraron un valor mínimo de

reducción de 5,900 en el sitio 6 y un valor máximo de reducción de 17,200 en el sitio 4. En los sitios 5, 6 y 7 donde se observó la presencia de partículas de materia orgánica en el agua y se registraron valores altos de sólidos disueltos totales. No se observaron valores menores de concentración (2,000 y 11,000 veces), es decir, no se observó un patrón entre las concentraciones y los volúmenes (10, 20 y 50 L) o los tipos de agua (Tabla 21). Las muestras con volúmenes menores (10 L) se concentraron un menor número de veces en comparación con las muestras con volúmenes de 20 y 50 L.

Tabla 21.- Factor de reducción en que se concentraron las muestras por cada proceso de concentración de partículas virales mediante el método 1.

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado		
		10 L	20 L	50 L
		Factor de reducción*		
	1	1,000	2,200	6,700
Agua dulce	2	2,200	3,900	9,600
	3	2,600	5,600	14,400
	4	1,900	8,000	17,200
Agua salobre	5	2,200	4,000	11,000
	6	2,200	7,700	5,900
Agua residual	7	2,000	3,800	NA

NA: No aplica; *Ver materiales y métodos sección 7.6

8.2.2 Concentración de las muestras de agua por el método 2 (FAE)

Se colectaron muestras de un volumen de 5 L en cada sitio. No obstante, los volúmenes de las muestras colectadas por cada sitio no se pudieron filtrar completamente, debido a la alta turbiedad que presentaban algunas muestras de los sitios 3-7. Sin embargo, debido a la saturación de los filtros se obtuvieron volúmenes que variaron entre 0.2 hasta 5 L, donde el sitio con menor volumen concentrado fue obtenido en la muestra del sitio 4 (cenote rural) y los sitios con mayor volumen filtrado correspondieron a los obtenidos en los sitios 1 y 2 (pozo casa-habitación y pozo de extracción). El volumen obtenido después del filtrado fue de 10 mL para todas las muestras (Tabla 22). Sin embargo, el factor de

reducción fue diferente ya que el volumen inicial antes de la filtración fue distinto para cada muestra.

Tabla 22.- Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 2.

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado (5 L)		
		Volumen inicial (L)	Volumen concentrado (mL)	Factor de reducción*
Agua dulce	1	5	10	500
	2	5		500
	3	1.50		150
	4	1.85		185
Agua salobre	5	2.20	10	220
	6	1.50		150
Agua residual	7	0.20	10	20

*Ver materiales y métodos sección 7.6

Las muestras fueron concentradas en promedio 240 veces. En cuanto a la muestra de efluente de agua residual (sitio 7), en ésta se obtuvo el valor más bajo de reducción del volumen de las muestras (20 veces), debido a que la muestra presentaba mayor turbidez en comparación con los demás sitios, saturando así el filtro en menor tiempo. Las muestras de agua de pozo (sitio 1 y 2) mostraron los valores más altos en cuanto a la reducción del volumen de las muestras (500 veces) (Tabla 22).

8.2.3 Concentración de las muestras de agua por el método 3 (FAE/UF)

En este método, se colectaron 5 L de agua de cada sitio. Sin embargo, el volumen de muestra colectado no pudo ser filtrado completamente, ya que durante el procesamiento de las muestras los filtros se obstruyeron debido a la turbiedad que presentaban las muestras. Sin embargo, debido a la saturación de los filtros el volumen filtrado para cada muestra varió entre 0.3 hasta 5 L, el sitio con menor volumen filtrado obtenido fue el sitio 7 (efluente de aguas residuales) y el sitio con mayor volumen filtrado correspondió al sitio 1 (pozo casa-habitación). Se obtuvieron volúmenes finales de las muestras concentradas entre 1.98 hasta 3.60 mL (Tabla 23).

Tabla 23. Volúmenes filtrados y concentrados de las muestras de agua después del proceso de concentración de partículas virales mediante el método 3.

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado (5 L)		
		Volumen inicial (L)	Volumen concentrado (mL)	Factor de reducción*
Agua dulce	1	5	2.87	1,700
	2	4.96	2.73	1,800
	3	1.10	2.32	470
	4	1.85	1.98	930
Agua salobre	5	2	2.49	800
	6	1.50	2.25	670
Agua residual	7	0.30	3.60	80

*Ver materiales y métodos sección 7.6

Con respecto a las veces que se concentraron las muestras, estas fueron concentradas en promedio 927 veces. La muestra del efluente de agua residual (sitio 7) mostró la concentración más baja (80 veces) con respecto a los otros sitios, ya que la muestra presentaba una alta turbidez provocando que la membrana se saturara (Tabla 23). La muestra de agua de pozo (sitio 1) mostró los valores más altos en cuanto a la reducción del volumen de la muestra (1,740 veces).

8.3 Cuantificación del PMMoV mediante qPCR

A partir del cDNA obtenido se realizó la cuantificación del PMMoV empleando el método de RT-qPCR utilizando los reporteros fluorescentes de: 1) sonda TaqMan y 2) SYBR Green. Se obtuvieron valores de C_i para cada sitio a los cuales se aplicó el factor de corrección volumétrica (ver Materiales y Métodos), dando como resultado valores en unidades de concentración de Copias de Genoma/Litro (CG/L).

8.3.1 Cuantificación del PMMoV mediante sonda TaqMan

8.3.1.1 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 1 (UFT)

El PMMoV fue detectado en el 67% (14/20) del total de las muestras. En las muestras obtenidas a partir de la concentración del volumen inicial de 10 L se cuantificó en el 71%

(5/7) de los sitios; para las muestras concentradas a partir de volúmenes de 20 L el virus se detectó en el 71% (5/7) y en el 57% (4/7) para las muestras colectadas a partir del volumen inicial de 50 L.

Con respecto a la concentración del PMMoV en las muestras, el valor mínimo fue detectado en las muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 20 L obtenido del sitio 4 (cenote rural), con un valor de 4.09×10^1 CG/L y el máximo número de copias se registró en el concentrado obtenido a partir del volumen inicial de 10 L en el sitio 5 (descarga de agua subterránea), con 1.91×10^4 CG/L.

Para los concentrados a partir de volúmenes iniciales de 10 L de agua colectada, la concentración menor del PMMoV se registró en el sitio 7 (efluente de agua residual) con 2.86×10^2 CG/L y la concentración mayor en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) con 1.91×10^4 CG/L. En los concentrados a partir de volúmenes iniciales de 20 L de agua colectada, se detectó un orden de magnitud menor en comparación al concentrado a partir de 10 L de agua colectada, con valores entre 4.09×10^1 y 3.70×10^3 CG/L, en los sitios 4 y 5 (cenote rural y descarga de agua subterránea), respectivamente. Asimismo, en los concentrados a partir de volúmenes iniciales de 50 L de agua colectada, se detectaron concentraciones del PMMoV con un rango de magnitud menor con respecto a los volúmenes obtenidos a partir de 10 L de agua colectada, con la menor concentración del PMMoV en el sitio 2 (pozo de extracción) de 7.36×10^1 CG/L y la mayor concentración en el sitio 1 (pozo casa-habitación) de 1.05×10^3 CG/L (Tabla 24).

Tabla 24. Concentración del PMMoV obtenida utilizando a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT) (qPCR/sonda TaqMan)

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado					
		10 L		20 L		50 L	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,000	1.83x10 ³	2,200	5.58x10 ²	6,700	7.36x10 ¹
	2	2,200	*	3,900	*	9,600	1.05x10³
	3	2,600	*	5,600	ND	14,400	ND
Agua salobre	4	1,900	1.05x10 ³	8,000	4.09x10 ¹	17,200	*
	5	2,200	1.24x10 ³	4,000	2.28x10 ²	11,000	3.29x10 ²
	6	2,200	1.91x10⁴	7,700	3.70x10³	5,900	8.74x10 ²
Agua residual	7	2,000	2.86x10 ²	3,800	2.02x10 ³		NA

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L; *: Fuera del límite de cuantificación; **ND**: No detectado; **NA**: No aplica

En general, este método de concentración permitió obtener concentraciones del PMMoV que van de un rango de 4.09x10¹ CG/L hasta 1.91x10⁴ CG/L. Es importante resaltar que las mayores concentraciones virales fueron detectadas en muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 10L.

8.3.1.2 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 2 (FAE)

El PMMoV fue cuantificado en el 57% (4/7) de las muestras, en concentraciones entre 2.72x10³ y 1.31x10⁵ CG/L. La menor concentración fue detectada en el sitio 1 (pozo casa-habitación), mientras que la mayor concentración del PMMoV fue detectada en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración de PMMoV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE) (qPCR/sonda TaqMan).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	500	2.72×10^3
	2	500	*
	3	150	*
	4	185	1.12×10^4
Agua salobre	5	220	4.28×10^3
	6	150	1.31×10^5
Agua residual	7	20	*

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; *Fuera del límite de cuantificación; ** Ver volumen inicial en la tabla 22.

Cabe destacar que la máxima concentración del PMMoV se detectó en agua salobre en la muestra concentrada con un volumen inicial de 1.5 L.

8.3.1.3 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF)

Por medio de este método, la presencia del virus se cuantificó en el 100% (7/7) del total de las muestras, en un rango de 1.08×10^3 a 2.20×10^5 CG/L. La menor concentración fue detectada en el sitio 2 (pozo extracción), mientras que la mayor concentración del PMMoV fue detectada en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) (Tabla 26).

Tabla 26. Concentración de PMMoV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF) (qPCR/sonda TaqMan).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,700	3.60x10 ³
	2	1,800	1.08x10 ³
	3	470	6.40x10 ⁴
	4	930	3.66x10 ³
Agua salobre	5	800	2.60x10 ³
	6	670	2.20x10⁵
Agua residual	7	80	4.21x10 ³

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L, **Ver volumen inicial en la tabla 23.

Es importante resaltar que la mayor concentración del PMMoV se detectó en agua salobre en la muestra concentrada a partir de un volumen inicial de 1.5 L.

8.3.2 Cuantificación del PMMoV mediante SYBR Green

8.3.2.1 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 1 (UFT)

Mediante este método, el PMMoV fue cuantificado en el 40% (8/20) del total de las muestras. En las muestras obtenidas a partir de la concentración de volúmenes iniciales de 10 L y 20 L se cuantificó al PMMoV en el 43% (3/7) de los sitios; para las muestras concentradas a partir de volúmenes de 50 L el virus se detectó en el 29% (2/7).

Con respecto a la concentración del PMMoV el valor mínimo se encontró en el concentrado a partir de un volumen inicial de 50 L en el sitio 2 (pozo de extracción), con una concentración de 4.32x10⁰ CG/L y la máxima concentración se registró en las muestras de agua en las que concentradas a partir de un volumen inicial de 10 L en el sitio 4 (cenote rural) con 6.66x10² CG/L.

Para los concentrados obtenidos a partir de volúmenes iniciales de 10 L, la menor concentración del PMMoV se registró en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) con 4.81x10¹ CG/L y la mayor concentración en el sitio 4 (cenote rural) con 6.66x10² CG/L.

Los concentrados obtenidos a partir de volúmenes iniciales de 20 L registraron un orden de magnitud menor en comparación con los valores obtenidos a partir del concentrado de volúmenes iniciales de 10 L, con valores entre 1.29×10^1 y 3.02×10^1 CG/L, en los sitios 6 y 7 (descarga de agua subterránea y agua residual tratada), respectivamente. De la misma forma, los concentrados de 50 L presentaron concentraciones con un rango de magnitud menor con respecto a los valores obtenidos a partir del concentrado de volúmenes iniciales de 10 y 20 L, con un mínimo en el sitio 2 (pozo de extracción) de 4.32×10^0 CG/L y un máximo en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) de 1.09×10^1 CG/L (Tabla 27).

Tabla 27. Concentración del PMMoV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado					
		10 L		20 L		50 L	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,000	ND	2,200	ND	6,700	ND
	2	2,200	ND	3,900	ND	9,600	4.32×10^0
	3	2,600	*	5,600	ND	14,400	ND
	4	1,900	6.66×10^2	8,000	*	17,200	*
Agua salobre	5	2,200	4.81×10^1	4,000	1.53×10^1	11,000	1.09×10^1
	6	2,200	*	7,700	1.29×10^1	5,900	*
Agua residual	7	2,000	6.69×10^1	3,800	3.02×10^1		NA

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; * Fuera del límite de cuantificación; **ND**: No detectado y **NA**: No aplica.

En general, este método de concentración permitió obtener concentraciones del PMMoV que van de un rango de 4.32×10^0 CG/L hasta 6.66×10^2 CG/L. Es importante resaltar que las mayores concentraciones virales fueron detectadas en muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 10L.

8.3.2.2 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 2 (FAE)

A través de este método, este virus fue detectado y cuantificado únicamente en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) con una concentración de 3.12×10^2 CG/L en un volumen inicial de 1.5 L (Tabla 28).

Tabla 28. Concentración del PMMoV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de concentración	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	500	ND
	2	500	ND
	3	150	ND
	4	185	ND
Agua salobre	5	220	ND
	6	150	3.12x10 ²
Agua residual	7	20	ND

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L; **ND**: No detectado; **Ver volumen inicial en la tabla 22.

8.3.2.3 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF)

Por medio de este método, la presencia del virus PMMoV se cuantificó nuevamente en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) con una concentración de 9.33x10¹ CG/L a partir de un volumen inicial de 1.5 L (Tabla 29).

Tabla 29. Concentración del PMMoV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,700	ND
	2	1,800	ND
	3	470	ND
	4	930	ND
Agua salobre	5	800	ND
	6	670	9.33x10 ¹
Agua residual	7	80	ND

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L; **ND**: No detectado; ** Ver volumen inicial en la tabla 23.

8.4 Cuantificación del HAdV mediante qPCR

A partir del ADN obtenido se realizó la cuantificación de HAdVs utilizando la técnica de qPCR y los reporteros fluorescentes TaqMan y SYBR Green. Se obtuvieron los valores de C_t para cada sitio a los cuales se les aplicó el factor de corrección volumétrica (ver materiales y métodos), dando como resultado valores en unidades de concentración Copias de Genoma/Litro (CG/L).

8.4.1 Cuantificación del HAdV mediante sonda TaqMan

8.4.1.1 Cuantificación de las muestras concentradas por el método 1 (UFT)

Este método permitió la detección y cuantificación de HAdVs en el 5% (1/20) del total de las muestras. Este virus fue cuantificado únicamente en el sitio 1 (pozo casa-habitación) con una concentración de 3.48×10^1 CG/L en la muestra concentrada a partir de un volumen de 50 L (Tabla 30).

Tabla 30. Concentración de HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT) (qPCR/sonda TaqMan).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado					
		10 L		20 L		50 L	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,000	ND	2,200	ND	6,700	3.48×10^1
	2	2,200	ND	3,900	ND	9,600	ND
	3	2,600	ND	5,600	ND	14,400	ND
	4	1,900	ND	8,000	ND	17,200	ND
Agua salobre	5	2,200	ND	4,000	ND	11,000	ND
	6	2,200	ND	7,700	ND	5,900	ND
Agua residual	7	2,000	ND	3,800	ND		NA

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; **ND**: No detectado y **NA**: No aplica.

8.4.1.2 Cuantificación del HAdV en las muestras concentradas por el método 2 (FAE)

El HAdV fue detectado y cuantificado en el 43% (3/7) de las muestras. Como valor mínimo se obtuvo una concentración de 3.17×10^3 CG/L en el sitio 3 (cenote urbano) y como valor máximo en el sitio 2 (pozo de extracción) con una concentración de 8.53×10^4 CG/L (Tabla 31).

Tabla 31. Concentración del HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE) (qPCR/sonda TaqMan).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	500	5.33×10^4
	2	500	8.53×10^4
	3	150	3.17×10^3
	4	185	ND
Agua salobre	5	220	ND
	6	150	ND
Agua residual	7	20	ND

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; **ND**: No detectado; **Ver volumen inicial en la tabla 22.

Es importante resaltar que los HAdVs se detectaron solamente en agua dulce y que la mayor concentración se detectó en la muestra concentrada con un volumen inicial de 5 L.

8.4.1.3 Cuantificación del HAdV en las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF)

Por medio de este método, la presencia del virus se detectó y se cuantificó al virus en el 29% (2/7) del total de las muestras. La menor concentración de HAdV fue de 1.23×10^3 CG/L, la cual fue detectada en el sitio 3 (cenote urbano) y la concentración máxima del HAdV fue de 1.29×10^4 CG/L y se obtuvo a partir del sitio 2 (pozo de extracción) (Tabla 32).

Tabla 32. Concentración de HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF) (qPCR/sonda TaqMan).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,700	*
	2	1,800	1.29x10⁴
	3	470	1.23x10 ³
	4	930	ND
Agua salobre	5	800	ND
	6	670	ND
Agua residual	7	80	ND

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L; * Fuera del límite de cuantificación; **ND**: No detectado;

**Ver volumen inicial en la tabla 23.

Cabe destacar que los HAdV se detectaron únicamente en agua dulce y que la mayor concentración se detectó en la muestra concentrada a partir con un volumen inicial de 4.96 L.

8.4.2 Cuantificación del HAdV mediante SYBR Green

8.4.2.1 Cuantificación del HAdV en las muestras concentradas por el método 1 (UFT)

A través de este método, el HAdV fue detectado y cuantificado en el 80% (16/20) del total de las muestras. En las muestras obtenidas a partir de la concentración de un volumen inicial de 10 L y de 20 L, se cuantificaron a los HAdV en el 86% (6/7) de los sitios. En las muestras concentradas a partir de un volumen de 50 L, el virus se detectó en el 57% (4/7) del total.

En relación a la concentración del HAdV en las muestras, el valor más alto se detectó en el concentrado obtenido a partir de un volumen inicial de 10 L en el sitio 2 (pozo de extracción), con un valor de 1.25x10⁵ CG/L y la menor concentración se registró en el concentrado a partir de un volumen inicial de 20 L en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) con 4.32x10¹ CG/L. Para los concentrados de 10 L el valor mínimo se

registró en el sitio 5 (descarga de agua subterránea), con 1.32×10^2 CG/L y el máximo en el sitio 2 (pozo de extracción) con 1.25×10^5 CG/L. Para los concentrados obtenidos a partir de un volumen inicial de 20 L, se registró un valor mínimo en el sitio 5 (descarga de agua subterránea) con 4.32×10^1 CG/L y el máximo en el sitio 2 (pozo de extracción) con 6.74×10^4 CG/L. En cuanto a los concentrados de 50 L, estos presentaron la concentración con un mínimo en el sitio 6 (descarga de agua subterránea) de 5.14×10^1 CG/L y la concentración máxima en el sitio 2 (pozo de extracción) de 1.61×10^4 CG/L (Tabla 33).

Tabla 33. Concentración de HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 1 (UFT) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado					
		10 L		20 L		50 L	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)	Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,000	2.68×10^4	2,200	8.19×10^3	6,700	2.09×10^2
	2	2,200	1.25×10^5	3,900	6.74×10^4	9,600	1.61×10^4
	3	2,600	2.52×10^2	5,600	3.30×10^2	14,400	*
	4	1,900	ND	8,000	ND	17,200	ND
Agua salobre	5	2,200	1.32×10^2	4,000	4.32×10^1	11,000	1.59×10^2
	6	2,200	9.09×10^2	7,700	4.39×10^3	5,900	5.14×10^1
Agua residual	7	2,000	1.82×10^2	3,800	1.75×10^3		NA

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; **ND**: No detectado y **NA**: No aplica.

En general, este método de concentración permitió obtener concentraciones del PMMoV que van de un rango de 4.32×10^1 CG/L hasta 1.25×10^5 CG/L. Es importante resaltar que las mayores concentraciones virales fueron detectadas en muestras concentradas a partir de un volumen inicial de 10L.

8.4.2.2 Cuantificación del HAdV de las muestras concentradas por el método 2 (FAE)

Por medio de este método, el HAdV fue cuantificado en el 100% (7/7) de las muestras analizadas y se detectaron concentraciones entre 5.39×10^3 hasta 4.52×10^5 CG/L. El valor mínimo se obtuvo en el sitio 6 (descarga de agua subterránea), mientras que la concentración máxima se detectó en el sitio 1 (pozo casa-habitación) (Tabla 34).

Tabla 34. Concentración de HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 2 (FAE) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	500	4.52x10⁵
	2	500	3.99x10 ⁵
	3	150	1.20x10 ⁴
	4	185	8.23x10 ³
Agua salobre	5	220	7.16x10 ³
	6	150	5.39x10 ³
Agua residual	7	20	7.45x10 ⁴

El límite de cuantificación fue de 10⁰ CG/L; **Ver volumen inicial en la tabla 22.

Cabe destacar que la máxima concentración del HAdV se detectó en agua dulce en la muestra concentrada con un volumen inicial de 5 L.

8.4.2.3 Cuantificación del HAdV en las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF)

Se detectó la presencia del virus HAdV a través de este método en el 100% de las muestras (7/7). El valor mínimo se detectó nuevamente en el sitio 6 (descarga de agua subterránea), con una concentración de 5.63x10² CG/L. El valor máximo se reportó en el sitio 2 (pozo de extracción), con una concentración de 1.58x10⁵ CG/L (Tabla 35).

Tabla 35. Concentración de HAdV obtenida a partir de las muestras concentradas por el método 3 (FAE/UF) (qPCR/SYBR Green).

Tipo de agua	Sitios	Volumen de muestra colectado**	
		Factor de Reducción	Concentración (CG/L)
Agua dulce	1	1,700	4.52x10 ⁴
	2	1,800	1.58x10⁵
	3	470	7.40x10 ³
	4	930	1.67x10 ³
Agua salobre	5	800	2.27x10 ³
	6	670	5.63x10 ²
Agua residual	7	80	2.43x10 ⁴

El límite de cuantificación fue de 10^0 CG/L; **Ver volumen inicial en la tabla 23.

Es importante resaltar que la mayor concentración del HAdV se detectó en agua dulce en la muestra concentrada con un volumen inicial de 4.96 L.

8.5 Comparación del rendimiento de los métodos para la recuperación y cuantificación para los virus PMMoV y HAdV en las muestras de agua.

8.5.1 Ensayo qPCR-sonda TaqMan: PMMoV

El virus PMMoV fue cuantificado en el 74% (25/34) del total de las muestras al utilizar la sonda TaqMan para el ensayo de qPCR. Con el método 1, las muestras en las que se partió de un volumen de 10 L se encontraron las mayores concentraciones de este virus, en comparación con las muestras en las que se partió de un volumen de 20 y 50 L.

En promedio las concentraciones más bajas para el PMMoV obtenidas en el 60% (3/5) de las muestras correspondieron a muestras de agua residual, mientras que en el agua salobre se obtuvieron en promedio las concentraciones más altas en el 100% (10/10) de las muestras (Figura 17). Finalmente, las muestras concentradas por el Método 1 (a partir de un volumen inicial de 50 L) registraron en promedio las concentraciones más bajas para el PMMoV en el 57% (4/7) de las muestras y por el Método 3 se registraron en promedio las concentraciones más altas en el 100% (7/7) de las muestras (Figura 18).

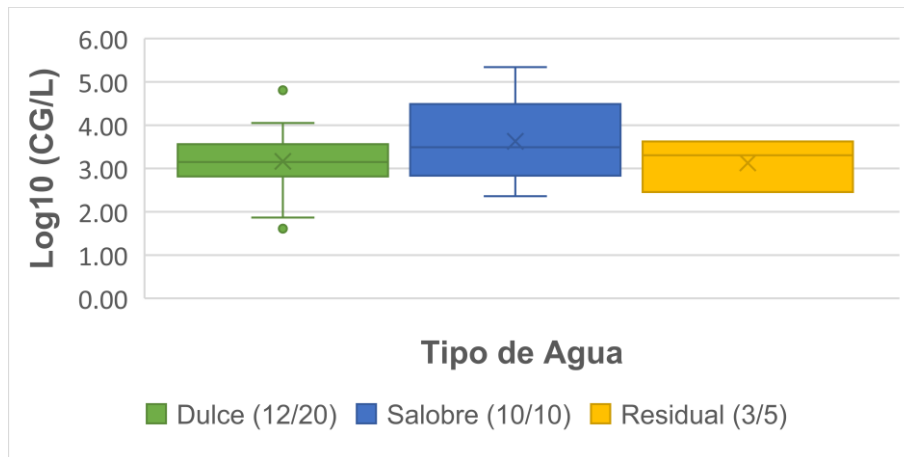


Figura 17. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante sonda TaqMan de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

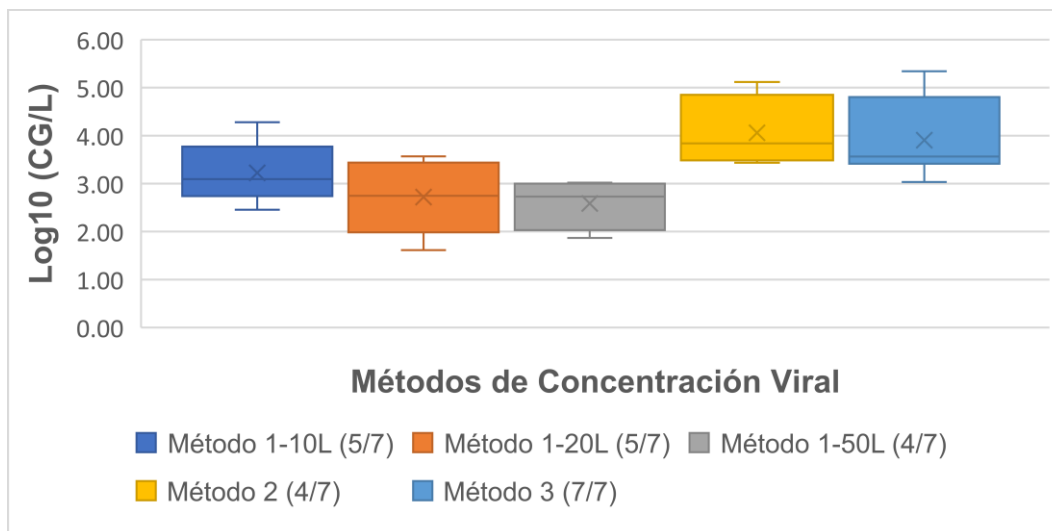


Figura 18. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante sonda TaqMan y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

8.5.2 Ensayo de qPCR-SYBR Green: PMMoV

El PMMoV fue cuantificado en el 26% (9/34) del total de las muestras cuando éstas fueron cuantificadas con SYBR Green en el ensayo de qPCR. Con el método 1, las muestras obtenidas a partir de 10 L se encontraron las mayores concentraciones de este virus en comparación con las muestras obtenidas a partir de 20 y 50 L.

En promedio las concentraciones más bajas para el PMMoV se obtuvieron en el 60% (6/10) de las muestras de agua salobre, mientras que en el agua dulce se consiguieron en promedio las concentraciones más altas del virus en el 5% (1/20) de las muestras (Figura 19). Finalmente, las muestras concentradas por el Método 1 (a partir de volumen inicial de 50 L) registraron en promedio las concentraciones más bajas para el PMMoV en el 14% (1/7) de las muestras y por el Método 2 se registraron en promedio las concentraciones más altas en el 14% (1/7) de las muestras (Figura 20).

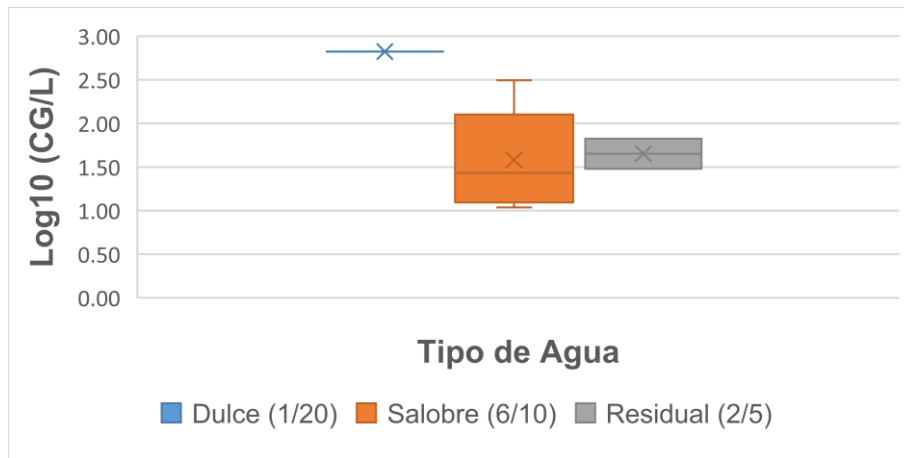


Figura 19. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante SYBR Green de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

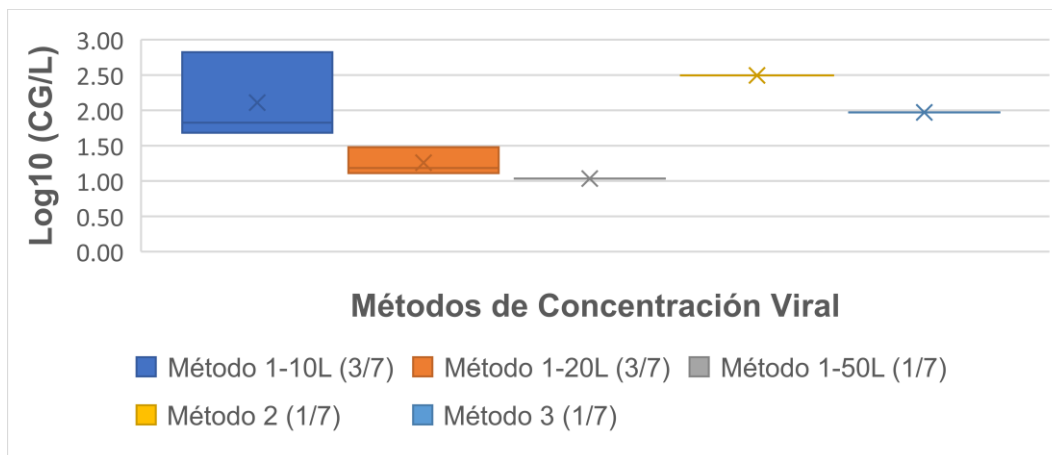


Figura 20. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del PMMoV cuantificadas mediante SYBR Green y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

En general, al cuantificar al PMMoV mediante SYBR Green en el ensayo de qPCR se detectó un menor porcentaje de muestras positivas y una menor concentración viral en el 26% (9/34) de las muestras, mientras que cuando se cuantificó al virus con sonda TaqMan se detectó un mayor porcentaje de muestras positivas y una mayor concentración viral con el 71% (24/34) de las muestras (Figura 21).

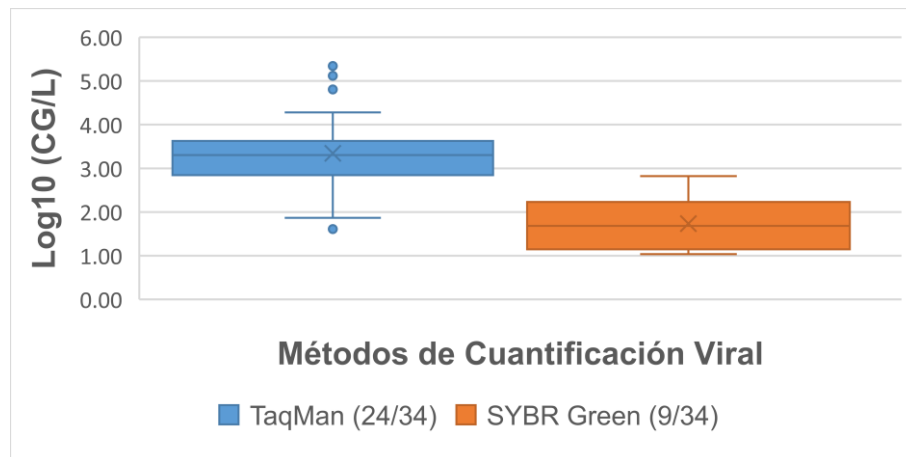


Figura 21. Gráfica comparativa de cajas y bigotes de los métodos de cuantificación utilizados para el PMMoV. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

8.5.3 Ensayo qPCR-sonda TaqMan: HAdV

Los HAdVs fueron cuantificados en el 18% (6/34) del total de las muestras concentradas utilizando la sonda TaqMan para el ensayo por qPCR. Con el método 1 únicamente se pudo cuantificar al HAdV en las muestras obtenidas a partir de concentrados obtenidos en volúmenes iniciales de colecta de 50 L.

No se pudo realizar una evaluación comparativa entre la concentración de HAdVs y el tipo de agua bajo estudio ya que utilizando este método los HAdVs solamente fueron amplificados a partir de muestras concentradas de agua dulce (Figura 22). Finalmente, las muestras concentradas por el Método 1 (a partir de un volumen de 50 L) registraron en promedio las concentraciones más bajas para HAdVs en el 14% (1/7) de las muestras y por el Método 2 se registraron en promedio las concentraciones más altas en el 43% (3/7) de las muestras (Figura 23).

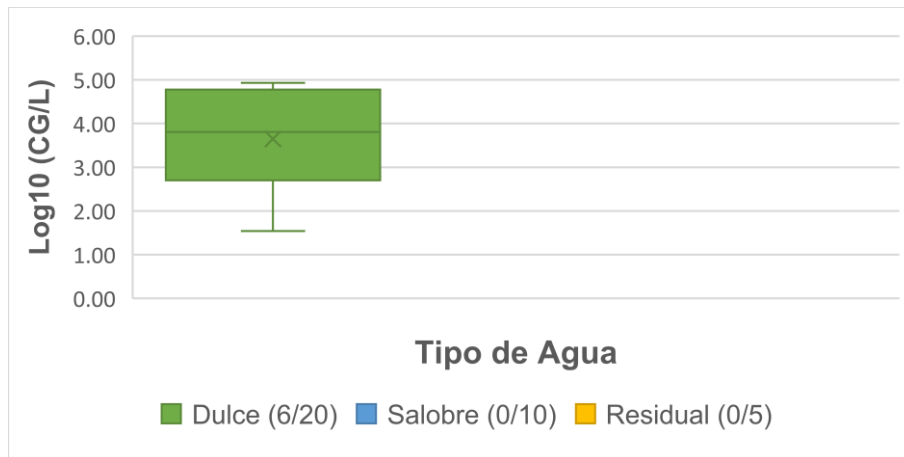


Figura 22. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante sonda TaqMan de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

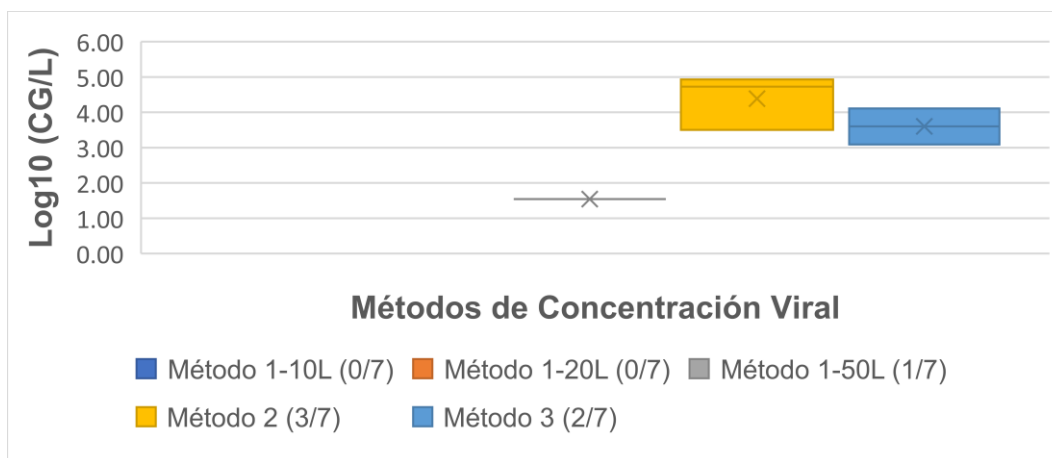


Figura 23. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante sonda TaqMan y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

8.5.4 Ensayo qPCR-sonda SYBR Green: HAdV

Mediante este método se obtuvo la cuantificación de HAdVs en el 88% (30/34) del total de las muestras concentradas. Con el método 1, las mayores concentraciones de este virus se encontraron en las muestras obtenidas a partir volúmenes iniciales de 10 L, en comparación con las muestras obtenidas a partir de 20 y 50 L.

En el agua salobre se obtuvieron en promedio las concentraciones más bajas para el PMMoV en el 100% (10/10) de las muestras, mientras que en el agua dulce se

consiguieron en promedio las concentraciones más altas en el 80% (16/20) de las muestras (Figura 24). Finalmente, las muestras concentradas por el Método 1 (a partir de un volumen inicial de 50 L) registraron en promedio las concentraciones más bajas para HAdV en el 57% (4/7) de las muestras y por el Método 2 se registraron en promedio las concentraciones más altas en el 100% (7/7) de las muestras (Figura 25).

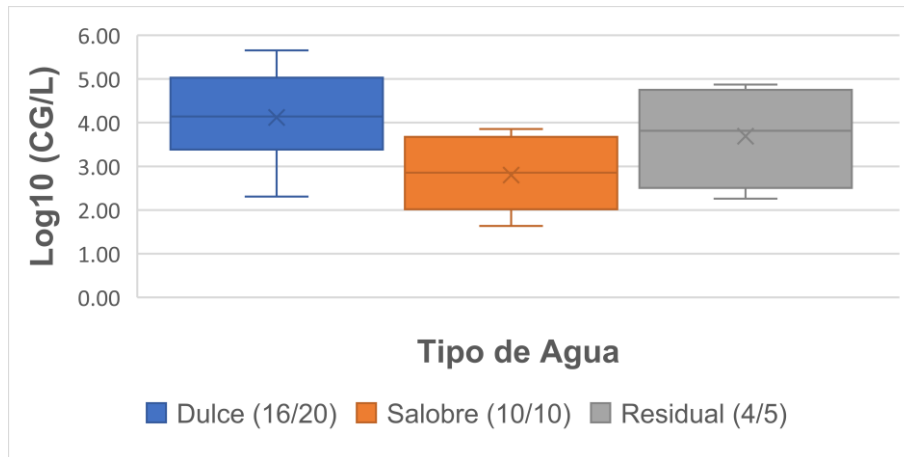


Figura 24. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante SYBR Green de los diferentes tipos de agua procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

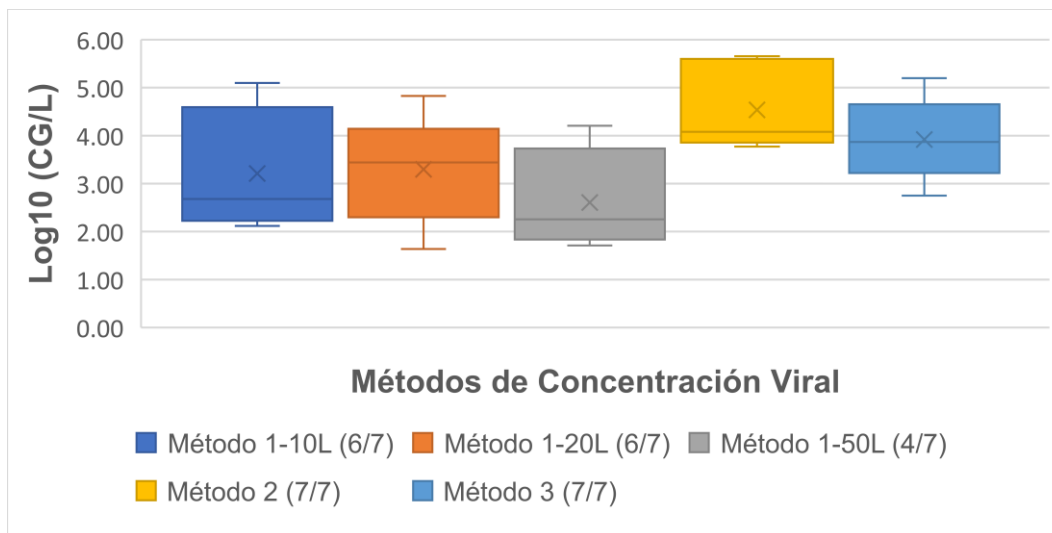


Figura 25. Gráfica de cajas y bigotes de las concentraciones del HAdV cuantificadas mediante SYBR Green y procesadas mediante tres métodos de recuperación viral diferentes. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

Por lo tanto, cuando se cuantificó al HAdV utilizando la sonda TaqMan en el ensayo de qPCR se consiguió detectar un menor número de muestras positivas y una menor concentración viral en el 18% (6/34) de las muestras, en cambio con el ensayo de qPCR utilizando SYBR Green se detectó un mayor número de muestras positivas y una mayor concentración viral con el 88% (30/34) de las muestras (Figura 26).

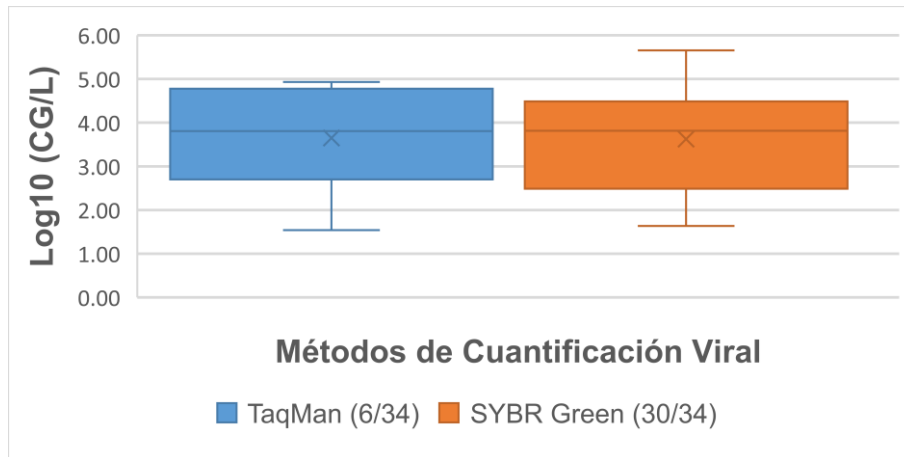


Figura 26. Gráfica de cajas y bigotes de los métodos de cuantificación utilizados para el HAdV. Valores de concentración expresados en Log10 (CG/L).

8.6 Determinación del método óptimo para la cuantificación del PMMoV y del HAdV en muestras de agua

8.6.1 Comparación entre métodos para la detección del virus PMMoV

El método que permitió obtener el menor porcentaje de muestras positivas por qPCR fueron los métodos 1 y 2 a partir de un volumen promedio filtrado de 50 y 5 L respectivamente, mientras que el método por el cual se obtuvo el mayor número de muestras positivas por qPCR fue el método 3 al utilizar un volumen promedio filtrado de 2.4 L.

Con respecto al ensayo de qPCR utilizando sondas TaqMan, la menor concentración del PMMoV fue detectada al utilizar el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 50 L y, la mayor concentración se detectó con el método 3 a partir de un volumen promedio filtrado de 2.4 L.

El método más rápido con respecto al tiempo de procesamiento de la muestra se reportó en el método 2 a partir de un volumen filtrado promedio de 2.5 L, sin embargo, el siguiente método fue el método 3 a partir de un volumen filtrado promedio de 2.4 L. Por lo que ambos métodos pueden considerarse los más rápidos.

El método más económico con respecto al costo de procesamiento por muestra se detectó en el método 2 y seguido del método 3, por lo que ambos métodos se pueden considerar los más económicos con un costo total por muestra de entre \$918 a \$1216 pesos.

Tabla 36. Valores obtenidos del PMMoV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con sonda TaqMan.

Método de concentración	Volumen promedio filtrado	Porcentaje de muestras positivas por qPCR	Concentraciones promedio (CG/L)	Tiempo de procesamiento (hrs)	Costo por el procesamiento por muestra (MX)*
Método 1 (UFT)	10 L	71% (5/7)	3.36×10^3	17.5 ± 0.5	\$1,557.00
	20 L	71% (5/7)	9.35×10^2	18.5 ± 0.75	\$1,638.64
	50 L	57% (4/7)	3.32×10^2	20.5 ± 1.5	\$1,643.73
Método 2 (FAE)	2.5 L	57% (4/7)	2.16×10^4	6.3 ± 1.5	\$918.30
Método 3 (FAE/UF)	2.4 L	100% (7/7)	4.25×10^4	6.7 ± 1.5	\$1,215.51

*Ver anexo 12.2

El método por el cual se obtuvo el número más bajo de muestras positivas por qPCR fueron los métodos 2 y 3 a partir de un volumen promedio filtrado de 2.5 y 2.4 L respectivamente, mientras que el método que permitió obtener el número más alto de muestras positivas por qPCR fue el método 1 al utilizar un volumen promedio filtrado de 10 y 20 L.

En relación al ensayo de qPCR usando SYBR Green, la mínima concentración del PMMoV fue detectada al emplear el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 50 L y, la máxima concentración fue detectada al emplear el método 2 a partir de un volumen promedio filtrado de 2.5 L.

El método más rápido con respecto al tiempo de procesamiento de la muestra se reportó en el método 2 a partir de un volumen promedio de 2.5 L, sin embargo, el siguiente método fue el método 3 a partir de un volumen promedio de 2.4 L. Por lo que ambos métodos pueden considerarse los más rápidos.

El método más económico para el procesamiento por muestra fue el método 2 seguido del método 3, por lo que ambos se pueden considerar los más económicos con un costo total por muestra de entre \$881 a \$1,177 pesos.

Tabla 37. Valores obtenidos del PMMoV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con SYBR Green.

Método de concentración	Volumen promedio filtrado	Porcentaje de muestras positivas por qPCR	Concentraciones promedio (CG/L)	Tiempo de procesamiento (hrs)	Costo por el procesamiento por muestra (MX)*
Método 1 (UFT)	10 L	43% (3/7)	2.60×10^2	18.0 ± 0.5	\$1,520.00
	20 L	43% (3/7)	1.95×10^1	18.8 ± 0.75	\$1,600.95
	50 L	29% (2/7)	7.61×10^0	20.7 ± 1.5	\$1,606.04
Método 2 (FAE)	2.5 L	14% (1/7)	3.12×10^2	6.5 ± 1.5	\$880.71
Método 3 (FAE/UF)	2.4 L	14% (1/7)	9.33×10^1	7.0 ± 1.5	\$1,177.44

*Ver anexo 12.2

De forma general, los análisis anteriores indican que el método más eficiente para realizar la detección y cuantificación del PMMoV utilizando el ensayo por qPCR mediante sondas TaqMan, es el método 3, el cual cumple de manera satisfactoria con tres de los criterios descritos en la tabla 36.

8.6.2 Comparación entre métodos para la detección del virus HAdV

El método que permitió obtener el menor porcentaje de muestras positivas por qPCR fue el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 10 y 20 L, mientras que el método por el cual se obtuvo el mayor número de muestras positivas por qPCR fue el método 2 al utilizar un volumen promedio filtrado de 2.5 L.

Con respecto al ensayo de qPCR utilizando sondas TaqMan, la menor concentración del PMMoV fue detectada al utilizar el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 10 y 20 L y la mayor concentración se detectó con el método 2 a partir de un volumen promedio filtrado de 2.5 L.

El método más rápido con respecto al tiempo de procesamiento de la muestra se reportó en el método 2 a partir de un volumen filtrado promedio de 2.5 L, sin embargo, el siguiente método fue el método 3 a partir de un volumen filtrado promedio de 2.4 L. Por lo que ambos métodos pueden considerarse los más rápidos.

El método más económico con respecto al costo de procesamiento por muestra se detectó en el método 2 y seguido del método 3, por lo que ambos métodos se pueden considerar los más económicos con un costo total por muestra de entre \$712 a \$1,009 pesos.

Tabla 38. Valores obtenidos del HAdV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con sonda TaqMan.

Método de concentración	Volumen promedio filtrado	Porcentaje de muestras positivas por qPCR	Concentraciones promedio (CG/L)	Tiempo de procesamiento (hrs)	Costo por el procesamiento por muestra (MX)*
Método 1 (UFT)	10 L	0% (0/7)	-	17 ± 0.5	\$1,351.41
	20 L	0% (0/7)	-	18 ± 0.75	\$1,432.44
	50 L	14% (1/7)	3.48x10 ¹	20 ± 1.5	\$1,437.54
Método 2 (FAE)	2.5 L	43% (3/7)	4.73x10 ⁴	5.5 ± 1.5	\$712.10
Método 3 (FAE/UF)	2.4 L	29% (2/7)	7.07x10 ³	6.2 ± 1.5	\$1,009.32

*Ver anexo 12.3

El método por el cual se obtuvo el número más bajo de muestras positivas por qPCR fue el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 50 L, mientras que el método que permitió obtener el número más alto de muestras positivas por qPCR fueron los métodos 2 y 3 al utilizar un volumen promedio filtrado de 2.5 y 2.4 L respectivamente.

En relación al ensayo de qPCR usando SYBR Green, la mínima concentración del PMMoV fue detectada al emplear el método 1 a partir de un volumen promedio filtrado de 50 L y, la máxima concentración fue detectada al emplear el método 2 a partir de un volumen promedio filtrado de 2.5 L.

El método más rápido con respecto al tiempo de procesamiento de la muestra se reportó en el método 2 a partir de un volumen promedio de 2.5 L, sin embargo, el siguiente método fue el método 3 a partir de un volumen promedio de 2.4 L. Por lo que ambos métodos pueden considerarse los más rápidos.

El método más económico para el procesamiento por muestra fue el método 2 seguido del método 3, por lo que ambos se pueden considerar los más económicos con un costo total por muestra de entre \$673 a \$970 pesos.

Tabla 39. Valores obtenidos del HAdV de la ocurrencia, concentración viral, tiempo y el costo por el procesamiento de las muestras concentradas mediante tres métodos y cuantificadas con SYBR Green.

Método de concentración	Volumen promedio filtrado	Porcentaje de muestras positivas por qPCR	Concentraciones promedio (CG/L)	Tiempo de procesamiento (hrs)	Costo por el procesamiento por muestra (MX)*
Método 1 (UFT)	10 L	86% (6/7)	2.19×10^4	17.5 ± 0.5	\$1,311.93
	20 L	86% (6/7)	1.17×10^4	18.5 ± 0.75	\$1,392.95
	50 L	57% (4/7)	2.36×10^2	20.5 ± 1.5	\$1,398.06
Método 2 (FAE)	2.5 L	100% (7/7)	1.73×10^5	6.2 ± 1.5	\$672.62
Método 3 (FAE/UF)	2.4 L	100% (7/7)	9.23×10^4	6.7 ± 1.5	\$969.83

*Ver anexo 12.3

Con base en lo anterior, los análisis mostraron que el método más eficiente para realizar la detección y cuantificación del HAdV es el ensayo por qPCR mediante SYBR Green, a partir de la concentración de la muestra de agua por el método 2, el cual cumple de manera satisfactoria con todos los criterios descritos en la tabla 39.

9 Discusión

La elección del método de concentración de virus está determinada por las características del agua, así como por el volumen de agua que debe analizarse y los efectos de las propiedades del virus (Shi, Pasco y Tarabara, 2017). Además, los métodos para detectar virus son muy diversos y a través del tiempo estos han ido desarrollándose aún más con la principal finalidad de ser más eficientes y sencillos (Saavedra, Tovar and Betancourt, 2012). En el presente trabajo, los rangos de las concentración obtenidos del PMMoV y los HAdVs fueron mayores con respecto reportes previos para agua subterránea y agua salobre, esto probablemente se debió a las diferencias en los métodos de concentración o detección empleados (Jiang, 2006; Dong, Kim y Lewis, 2010; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018). Con base a la literatura disponible, entre los métodos de concentración más utilizados para la concentración del PMMoV y los HAdV en muestras de aguas residuales se encuentran los métodos basados en filtración por adsorción-elución (FAE), mientras que para concentrar muestras con mayor volumen como aguas superficiales o aguas subterráneas la ultrafiltración tangencial (UFT) es el método con mayor aplicación (Jiang, 2006; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi and Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018). En el ámbito local, uno de los métodos más empleados para la recuperación de los virus PMMoV y del HAdV a partir de muestras de agua subterránea y salobre del acuífero de la PY, ha sido el método por UFT y se han obtenido entre estos trabajos diferentes rendimientos para ambos virus (Rosiles-González *et al.*, 2017, 2019; Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019). Sin embargo, en estos trabajos se utilizaron volúmenes de muestras altos (50 y 100 L) así como también solamente un método de concentración y detección viral. Por lo que el presente trabajo se propuso comparar diferentes herramientas para el diagnóstico de los virus PMMoV y los HAdV en muestras de agua de la PY, en el cual se optimizaron variables como: volúmenes de agua, tipos de agua, materiales para filtración y herramientas moleculares para la detección de ambos virus.

Las altas concentraciones del PMMoV reportadas en aguas residuales ha llevado a muchos investigadores a buscar este virus en aguas ambientales (Symonds, Rosario y

Breitbart, 2019). Por ejemplo, se ha detectado al PMMoV en efluentes de aguas residuales en concentraciones que oscilan en 10^5 hasta 10^9 CG/L (Rosario *et al.*, 2009; Betancourt *et al.*, 2014; Kitajima *et al.*, 2014; Symonds *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015; Hughes *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017), en aguas salobres en concentraciones de 10^1 a 10^3 CG/L (Rosiles-González *et al.*, 2017; Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019), mientras que en aguas subterráneas en concentraciones que varían en 10^0 hasta 10^6 CG/L (Hruby *et al.*, 2015; Rosiles-González *et al.*, 2017; Shrestha *et al.*, 2018). En el presente trabajo, los rangos de concentraciones obtenidas para el PMMoV se encuentran entre los rangos previamente reportados para agua subterránea. Además, las concentraciones máximas se detectaron en el agua salobre se encuentran por arriba a los rangos de concentraciones reportados para el PMMoV en muestras de agua salobre en condiciones kársticas similares (Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019). No obstante, en el presente estudio se utilizó en promedio un menor volumen de muestra inicial e incluso el mismo ensayo de qPCR (TaqMan) pero consiguiendo mayores tasas de concentración para el PMMoV.

Estudios realizados en todo el mundo han demostrado la ocurrencia de los HAdV en efluentes de aguas residuales en concentraciones que van de 10^4 a 10^6 CG/L (Haramoto *et al.*, 2007; Dong, Kim y Lewis, 2010), en aguas salobres se han encontrado en concentraciones de 10^1 hasta 10^4 CG/L (Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019; Rosiles-González *et al.*, 2019) y en aguas subterráneas se ha reportado en concentraciones de 10^0 a 10^4 CG/L (Lambertini *et al.*, 2008; Ogorzaly *et al.*, 2010; Betancourt *et al.*, 2014; Staggemeier *et al.*, 2015; Rosiles-González *et al.*, 2019). En el presente estudio, los rangos de concentraciones obtenidas de los HAdV se encuentran entre los rangos previamente reportados para aguas subterráneas y aguas salobres (Muñoz-Cortes, 2018; Negrete-Alcalde, 2019; Rosiles-González *et al.*, 2019), aún cuando se empleó el mismo ensayo de qPCR (SYBR Green) pero se empleó en promedio un mayor volumen de muestra inicial. No obstante, las concentraciones más altas se detectaron en el agua subterránea se encuentran dentro de los rangos de concentraciones previamente reportados para el HAdV en muestras de agua residual

tratada, en donde se utilizaron en promedio volúmenes de muestra inicial similares a los usados en este estudio (Haramoto *et al.*, 2018; Allard y Vantarakis, 2019).

El estado de Quintana Roo, además de estar sujeto a un rápido desarrollo urbano y al aumento en la densidad poblacional, es considerado una de las principales regiones turísticas en México (Secretaría de Turismo del estado de Quintana Roo, 2017). En esta zona, la mayoría de las actividades recreativas se basan en el empleo de aguas ambientales (nado, buceo, snorkel, entre otras), también algunos habitantes recurren a diversas prácticas para conseguir el agua de estos ambientes para su uso como fuente de agua potable (Jiménez, 2011; CAPA, 2016). Es de gran importancia contar con métodos de diagnóstico que permitan monitorear la presencia de virus como indicadores de contaminación fecal en el agua, con el fin de tener un mejor panorama que permita predecir o minimizar los riesgos para la salud en estos tipos de ambientes acuáticos (Bosch, 1998; Wyn-Jones y Sellwood, 2001). Con base en lo anterior, en el presente trabajo se compararon métodos de concentración y de cuantificación utilizados para los virus PMMoV y los HAdV en diferentes muestras de agua. Además, el uso de ambos virus podría implementarse para determinar contaminación fecal en el acuífero de la PY. Por tal motivo, el desarrollo de pruebas simples y asequibles para la detección rápida de los virus PMMoV y los HAdV serían esencial para garantizar mejoras en la calidad del agua en los ambientes kársticos de la PY.

9.1 Comparación por métodos de concentración viral

Los métodos de concentración viral elegidos en el presente trabajo se han utilizado en trabajos que han reportado estas técnicas con buenos resultados para ambos virus, así como otros virus entéricos presentes en aguas residuales y en ambientes acuáticos (Jiang, 2006; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018). Una de las ventajas del método de UFT es que se ha utilizado para recuperar diversos patógenos como bacterias y virus a partir de volúmenes de agua relativamente grandes (Hill *et al.*, 2007; Hernandez-Morga *et al.*, 2009). Mientras que los métodos basados en FAE tienen la ventaja de que el costo del procesamiento de las muestras es relativamente

bajo y ha sido probado con una gran variedad de virus entéricos (Cashdollar y Wymer, 2013; Shi, Pasco y Tarabara, 2017). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el método basado en UFT fue más eficiente al cuantificar a los virus PMMoV y a los HAdV a partir de un volumen inicial (10 L), en tanto que los métodos basados en FAE fue más eficiente al cuantificar al PMMoV cuando se utilizó un menor volumen inicial (1.5 L) y a los HAdV cuando se utilizó un mayor volumen inicial (5 L). Sin embargo, las concentraciones más altas de ambos virus en los diferentes tipos de agua se detectaron a través de los métodos basados en FAE.

En un análisis realizado por Cashdollar y Wymer (2013), observaron que los volúmenes de muestra colectada entre 10 a 99 L tuvieron en promedio la recuperación viral más alta en comparación con muestras con volúmenes de <10 L y ≥ 100 L (Cashdollar y Wymer, 2013). Estos datos son comparables con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que en trabajos realizados para la detección del PMMoV y HAdV en muestras ambientales con volúmenes entre 30 a 200 L, las concentraciones del PMMoV y los HAdV fueron menores o estuvieron dentro de lo reportado en el presente trabajo, ya que las muestras se redujeron en promedio 15 veces menos (10 L) y, además, se observó que las tasas de detección y concentración de ambos virus aumentaron cuando se procesó un menor volumen de muestra. De igual forma Olszewski, Winona y Oshima (2005) obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo, en el cual compararon dos sistemas de UFT para la concentración de múltiples virus sembrados en aguas ambientales, consiguiendo recuperaciones comparables de los virus cuando se procesaron volúmenes de muestra de 2 y 100 L (Olszewski, Winona y Oshima, 2005). Por lo cual, las metodologías de concentración viral como en el caso de la UFT pueden concentrar inhibidores que afectan los análisis posteriores (métodos moleculares y/o ensayos de cultivo celular), ya que cuanto mayor sea el volumen de la muestra filtrada, la posibilidad de que se concentren más inhibidores sea más alta y, por lo tanto, es más probable que la detección viral se vea afectada (Cashdollar y Wymer, 2013).

En una investigación realizada por Hjelmsø *et al.* (2017), se obtuvo una eficiencia más alta cuando las muestras se concentraban con el método de PEG/NaCl en comparación

con el método de floculación con leche desnatada, ya que este último método inhibía la detección de los virus MNV y HAdV enriquecidos en aguas residuales sin tratar. También se demostró que la elección de un método para la extracción del material genético en muestras con altos niveles de materia orgánica afectaba la detección del HAdV, excepto cuando las muestras se concentraban con PEG/NaCl que tenía el volumen inicial más bajo y un paso de filtración adicional (Hjelmsø *et al.*, 2017). Este también fue el caso en nuestro trabajo, donde las concentraciones más altas de ambos virus analizados se obtuvieron cuando las muestras se concentraron a partir de un menor volumen inicial, de 10 L. Estos resultados podrían deberse a que cuanto menor sea el volumen de la muestra filtrada la posibilidad de que se reconcentren inhibidores sea menor, por lo que se obtendrían una mayor detección de los virus a analizar (Falman *et al.*, 2019).

Uno de los métodos más utilizados en la concentración primaria de virus en muestras de agua ha sido la FAE (Lukasik *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2006; Ruhanya, Kabego y Otwoma Gichana, 2016; Shi *et al.*, 2016; Farkas *et al.*, 2018). Se ha demostrado que este método es adecuado para concentrar virus entéricos en muestras ambientales y su uso puede estar limitado a muestras de baja turbidez debido a la obstrucción del medio filtrante (Fongaro *et al.*, 2013; Ruhanya, Kabego y Otwoma Gichana, 2016; Farkas *et al.*, 2018; Matrajt *et al.*, 2018). En este estudio, se observó mayor presencia y concentración del PMMoV en el agua salobre, mientras que para el HAdV se encontró mayor presencia y concentración en el agua dulce. Esto sugiere que la interacción de estos virus con la composición de la membrana es diferente cuando el virus se adsorbe del agua dulce en lugar del agua salobre. Lo anterior puede deberse a que en esta técnica las recuperaciones virales de varios tipos de agua no siempre fueron similares, debido al hecho de que las membranas cargadas pueden verse influenciada principalmente por las características del virus, como el punto isoeléctrico (pI), ya que los virus presentan diferentes pI (4.5 para HAdV y 3.2–3.8 para PMMoV) y esto pudo afectar su comportamiento de adsorción-elución (Gerba, 1984; Haramoto *et al.*, 2018; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018). También podría verse afectada por las características de la muestras de agua, como la salinidad, pH, niveles de materia orgánica disuelta y el

volumen filtrado (Lukasik *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 2009; Rigotto *et al.*, 2009).

Lukasik *et al.*, (2000) demostraron que una membrana con carga negativa combinado con AlCl_3 era más eficiente para la recuperación viral en aguas ambientales en comparación al uso de otras tipo de sales (NaCl o MgCl_2) (Lukasik *et al.*, 2000). En otros trabajos observaron que el MgCl_2 era más sensible para la captura de viriones en comparación con AlCl_3 . Los resultados sugieren que se debe agregar una concentración específica de MgCl_2 a cada tipo de muestra ambiental de agua y virus entérico para obtener la mejor recuperación viral, ya que las sales naturales dentro de la muestra no son suficientes para adsorber los virus en la membrana (Katayama, Shimasaki y Ohgaki, 2002; Haramoto *et al.*, 2007; Victoria *et al.*, 2009). Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente trabajo, en el que se usó una concentración definida de MgCl_2 en todos los tipos de muestras de agua y se filtraron con membranas electronegativas HA, por lo cual, se obtuvieron tasas de detección y de concentración más altas en comparación con las muestras que se filtraron mediante UFT. Esto podría deberse a las altas concentraciones de sales (MgCl_2) y un pH por debajo del pl de los virus y, además, los filtros electronegativos pueden establecer más interacciones hidrofóbicas que las interacciones electrostáticas con los virus y funcionan mejor en muestras con altas concentraciones de sal (Gibbons *et al.*, 2010).

En estudios previos, los concentradores centrífugos como el Centriprep, Amicon y Centricon han proporcionado diversas tasas de concentración de los virus PMMoV y HAdV presentes en aguas residuales así como ambientales (Haramoto *et al.*, 2007, 2013; Rosario *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2010; Fongaro *et al.*, 2013; Kitajima *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015; Adefisoye *et al.*, 2016; Sangsanont *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2018). Haramoto *et al.* (2005) sugiere que al utilizar este método de concentración secundaria se podría esperar que muchos tipos de virus entéricos se concentren con altas eficiencias de recuperación (Haramoto *et al.*, 2005; Gibbons *et al.*, 2010), ya que también pueden eliminar inhibidores presentes en los concentrados primarios (Ikner, Gerba y Bright, 2012). Lo anterior pudo haber ocurrido en el presente estudio, ya que las concentraciones

obtenidas del PMMoV fueron bajas mediante el método 2 de las distintas muestras de agua, por lo tanto, al reconcentrarlas a través de filtros Centriprep (método 3) se logró reducir más los volúmenes de las muestras lo cual resultó en el aumento de casi al doble las tasas de detección de este virus. Mientras que los resultados obtenidos de la cuantificación de HAdV en el presente trabajo, mostraron que una segunda etapa de concentración mediante filtros Centriprep (método 3) se consiguieron menores concentraciones en comparación cuando solamente las muestras se concentraron con el método 2. Estos hallazgos pueden indicar que un paso de reconcentración con estos dispositivos pueden provocar la pérdida de partículas virales en las muestras (Ahmed *et al.*, 2015), ya que los HAdV se han asociado con el atrapamiento físico en diversos filtros debido a las grandes fibras que sobre salen en estos virus, lo que da como resultado recuperaciones deficientes (Rames *et al.*, 2016).

Los métodos utilizados en el presente trabajo permitieron la concentración de los virus PMMoV y del HAdV, aunque cada uno presenta algunas limitaciones técnicas, como la necesidad de un paso de centrifugación, la necesidad de preacondicionar la muestra de agua, una sensibilidad deficiente con aguas turbias o la necesidad de grandes volúmenes de muestra. Previamente se ha reportado que dependiendo del virus bajo estudio y el tipo de agua se deben adaptar los métodos (Matrajt *et al.*, 2018). Las características y el volumen del agua son factores importantes, ya que pueden mejorar la sensibilidad y aumenta las posibilidades de detectar a virus en el ambiente (Francy *et al.*, 2013; Hjelmsø *et al.*, 2017). Sin embargo, en el presente trabajo no encontramos una relación positiva entre los métodos con altos volúmenes de muestreo y una mayor sensibilidad de detección para ambos virus. Esto podría deberse a un aumento en los inhibidores u otros aspectos de los métodos de concentración empleados (Cashdollar y Wymer, 2013; Haramoto *et al.*, 2018).

Con base en los resultados obtenidos, será más probable detectar a estos virus al utilizar un método de concentración primaria (método 2 y 3), que cuando se concentrarían por UFT (método 1) en muestras con concentraciones iguales de ambos virus. La diferencia en las recuperaciones observadas entre los virus PMMoV y HAdV puede deberse a

procedimientos de concentración secundaria e incluso con ensayos de detección aguas abajo, lo cual pueden llegar a opacar los resultados de la concentración primaria (Cashdollar y Wymer, 2013; Falman *et al.*, 2019). Dichos procedimientos de concentración viral deben validarse por separado para determinar la variabilidad de recuperación en estos pasos. Por esta razón, el uso de controles de proceso o ensayos de inhibición son necesarios para los análisis posteriores para así comprender e interpretar los datos obtenidos (Haramoto *et al.*, 2018).

9.2 Comparación de los métodos de cuantificación viral

Mediante el método 1 (UFT) se detectó al PMMoV en concentraciones que fueron similares con las reportadas en EUA, México así como en Singapur, en donde encontraron al PMMoV en concentraciones de 10^1 hasta 10^4 CG/L en arroyos, con volumen de colecta de 200 L (McGinnis *et al.*, 2018), en agua subterránea y salobre donde se colectaron muestras de 50 y 100 L (Rosiles-González *et al.*, 2017; Muñoz-Cortes, 2018), así como en embalses y cuencas, con volumen de colecta de 30 L (Gu *et al.*, 2018). Sin embargo, en este trabajo se detectaron concentraciones más altas del PMMoV utilizando un menor volumen de agua (10 L), en comparación a los otros trabajos que emplearon la UFT, así como un paso adicional con filtros centrífugos. Esto puede representar una ventaja sobre todo cuando las concentraciones del PMMoV son bajas en una muestra ambiental.

Los rangos de concentraciones del HAdV en este trabajo fueron comparables a los trabajos realizados por grupos de investigación en Nueva Zelanda, que oscilaron entre 10^4 hasta 10^6 CG/L en aguas residuales tratadas con volúmenes de 20 L (Dong, Kim y Lewis, 2010). En cambio, en México a partir de muestras de agua salobre de 50 L, se detectó al HAdV en concentraciones cuyos rangos fueron de 10^2 a 10^4 CG/L (Negrete-Alcalde, 2019), las cuales son parecidas con las que se encontraron en el presente trabajo, donde se empleó un menor volumen de muestra. De igual forma, Carducci y Verani, (2013) emplearon el método de concentración por ultrafiltración tangencial (UFT) pero con algunas modificaciones, con el cual detectaron a este virus entérico en promedio

en 10^8 CG/L en muestras de agua residuales crudas y en aguas residuales tratadas en 10^6 CG/L con volúmenes de colecta de 1 y 10 L, respectivamente. Estos valores de cuantificación fueron superiores a los reportados en el presente trabajo.

En relación al método 2 (FAE), en un trabajo realizado en EUA se utilizó la filtración por adsorción-elución (FAE) para concentrar muestras de hasta 10 L de aguas residuales tratadas, de ríos, así como en agua subterránea, en las cuales se detectó al PMMoV en concentraciones que fueron de 10^1 a 10^6 CG/L (Betancourt *et al.*, 2014), que son similares a las que se encontraron en el presente trabajo y en el que en promedio se empleó un menor volumen de muestra (<2.5 L). Por el contrario, se ha detectado a este virus en Nepal, en concentraciones que oscilaron de 10^4 hasta 10^8 CG/L en muestras de 50 mL provenientes de ríos, estanques, canales y de aguas residuales (tratadas/sin tratar), así como también en aguas subterráneas en muestras de 1 L, cuyas concentraciones estuvieron en un rango de 10^5 a 10^7 CG/L (Shrestha *et al.*, 2018). Estas tasas de concentración fueron más altas en comparación con las obtenidas en el presente trabajo, aún cuando en promedio se utilizó un mayor volumen (>2 L) de muestra filtrada.

Por lo que se refiere al virus HAdV, en un investigación realizada en Brasil detectaron a este virus entérico en efluentes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de hospitales, en concentraciones que estuvieron entre 10^2 hasta 10^4 CG/L, cuando se partía de un volumen inicial de 2 L (Prado *et al.*, 2011). De igual manera, se ha detectado al HAdV en este mismo tipo de muestras en Ghana, en concentraciones que fueron de 10^2 a 10^4 CG/L, a partir de muestras concentradas en un rango de 15 a 150 mL (Silverman *et al.*, 2013). En comparación con los trabajos anteriores que emplearon la FAE y diferentes tipos de agua, pero con un menor volumen filtrado, los rangos de concentración estuvieron dentro de los reportados en este estudio (Prado *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2013). No obstante, en el presente trabajo se hallaron las concentraciones más altas para los HAdV, pero presentes en un mayor volumen (>2 L) de muestra filtrada.

Acerca del método 3 (FAE/UF), se obtuvieron tasas de concentración que fueron menores en comparación con trabajos realizados en EUA y Vietnam que utilizaron este mismo método, así como un menor volumen de muestra, donde encontraron a este

patógeno de plantas en concentraciones que fluctuaron de 10^5 hasta 10^9 CG/L en afluentes de aguas residuales, en volúmenes de colecta que oscilaron de 50-100 mL (Kitajima *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015; Schmitz *et al.*, 2016). Este virus ha sido detectado en muestras ambientales en ríos en concentraciones que fueron en 10^4 a 10^8 CG/L en muestras de 50 mL a 2 L (Kuroda *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2018; Sassi *et al.*, 2018; Tandukar *et al.*, 2018), así como en estanques y humedales en concentraciones que estuvieron en 10^4 a 10^6 CG/L en muestras de 50 mL a 2 L (Kuroda *et al.*, 2015; Rachmadi *et al.*, 2016). Estos resultados presentan rangos de concentración mayores a los encontrados en el presente trabajo, donde se obtuvieron concentraciones más bajas y se procesó en promedio un mayor volumen de muestra (>2 L).

En relación al HAdV, se ha usado este mismo método de concentración en Brasil donde encontraron a este virus en promedio en 10^3 y 10^5 CG/L en muestras de aguas superficiales y 10^4 CG/L en muestras de un suministro de agua pública. En ambos tipos de muestras se filtraron 2 L (Fongaro *et al.*, 2013). Las concentraciones anteriores estuvieron dentro de lo reportado en el presente estudio, incluso cuando se empleó un menor volumen filtrado. De igual manera en Sudáfrica, han utilizado este método con algunas modificaciones en muestras de 1 L de efluentes de aguas residuales, en las cuales se detectó al HAdV en concentraciones que oscilaron en 10^1 hasta 10^5 CG/L (Adefisoye *et al.*, 2016). Estos valores de concentración viral estuvieron dentro del rango de los obtenidos en este trabajo, aunque las muestras fueron prefiltradas y se procesó un menor volumen (<2 L).

En general, la recuperación de los virus PMMoV y los HAdV se han visto limitada no por el método de detección, sino por la capacidad de extraer los virus de las muestras de agua (Dong, Kim y Lewis, 2010; Francy *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2015; Hjelmsø *et al.*, 2017). Varios autores han propuesto que la eficiencia de los métodos basado en UFT y FAE está determinada también por las propiedades físicoquímicas de los virus PMMoV y de los HAdV (Jiang, 2006; Dong, Kim y Lewis, 2010; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018). En el presente trabajo se emplearon dos virus con características diferentes en cuanto al tamaño, la carga superficial, el punto isoeléctrico

(pl), la energía superficial y la morfología. Por ejemplo, la morfología de los virus PMMoV (helicoidal) y de los HAdV (icosaédrica) es un factor que pudo afectar en la recuperación de los métodos basados en UFT y FAE, ya que se ha observado en trabajos previos que la superficie de la cápside de ambos virus puede facilitar la adsorción a la superficie de los filtros, haciendo que sea difícil de eluirlos de la matriz de los filtros (Gibbons *et al.*, 2010; Ikner, Gerba y Bright, 2012; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018). Por lo tanto, en el presente trabajo se emplearon los métodos UFT y FAE que se basan en principios diferentes para la recuperación de virus, la misma propiedad de los virus PMMoV y de los HAdV pudieron tener un efecto opuesto en la recuperación mediante estos dos métodos, produciendo así diferentes resultados para ambos virus.

En los últimos años, se han desarrollado varios ensayos de qPCR para la cuantificación del PMMoV y HAdV, que se ha dirigido a los genes que codifican para proteínas asociadas a la replicación (RdRp), así como a los genes que codifican para las proteínas del hexón, respectivamente. Aunque la gran mayoría de los trabajos sobre la detección de estos virus en ambientes acuáticos se han llevado a cabo principalmente mediante ensayos con sondas de hidrólisis como es el caso de la TaqMan, estos ensayos han sido modificados en los últimos años para reducir el límite de cuantificación de los virus, así como la precisión de la técnica (Jiang, 2006; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018).

El empleo de técnicas moleculares como los métodos basados en qPCR, se usan comúnmente para detectar e identificar la contaminación viral en el agua, particularmente aquellos virus que no se multiplican fácilmente en el cultivo celular, como sería el caso del PMMoV (Girones *et al.*, 2010). En el análisis cuantitativo de la contaminación viral en muestras ambientales, existen dos métodos que son los más utilizados, los cuales son TaqMan y SYBR Green. SYBR Green es más económico y más fácil que TaqMan, pero en muchos casos los científicos prefieren el método TaqMan, ya que cuenta con mayor precisión y sensibilidad (Tajadini, Panjehpour y Javanmard, 2014). Los métodos de cuantificación viral seleccionados para el presente trabajo han sido reportados

previamente por diversos grupos de investigación para cuantificar a los virus PMMoV y el HAdV en aguas residuales y en ambientes acuáticos, con excelentes resultados, en comparación con otras técnicas de detección como cultivo celular o inmunoensayos (Jiang, 2006; Rames *et al.*, 2016; Kitajima, Sassi y Torrey, 2018; Symonds *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, se registraron mayores tasas de cuantificación del PMMoV utilizando un ensayo con TaqMan que con SYBR Green; en cambio mediante un ensayo con SYBR Green para detectar al HAdV hubo mayores rendimientos que en comparación con TaqMan. Los resultados obtenidos pudieron haber ocurrido ya que se siguieron las mismas metodologías de qPCR descritas por Hamza *et al.* (2011a) y Heim *et al.* (2003) sin modificación alguna, por lo cual la sensibilidad de los ensayos de qPCR pudieron verse afectada por problemas de inhibición presentes en las diferentes muestras cuantificadas (Girones *et al.*, 2010; Hamza y Bibby, 2019). Las diferencias en las concentraciones del PMMoV y los HAdV detectados en este trabajo pudieron depender en gran medida a diferencias inherentes en la eficiencia de extracción del material genético de los virus. Algunos trabajos han demostrado que la presencia de estos inhibidores depende del método utilizado para la extracción de ADN o ARN, ya que los kits disponibles comercialmente emplean diferentes tecnologías para la eliminación o reducción de inhibidores (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Iker *et al.*, 2013; Hjelmsø *et al.*, 2017). Una forma para solventar el problema de inhibición en los ensayos de qPCR es la dilución de las muestras, ya que los inhibidores también se diluyen, de modo que la amplificación de los virus ya no se vería afectada negativamente (Jiang, 2006; Rames *et al.*, 2016). Lo anterior pudo haber sucedido en el presente trabajo, ya que durante los ensayos de qPCR no se realizó alguna dilución a las muestras para ambos virus, lo cual pudo haber afectado en la precisión y la sensibilidad de los ensayos de la qPCR tanto para TaqMan como para SYBR Green. Por lo tanto, al optimizar estas variables para la cuantificación del PMMoV y del HAdV en las diferentes muestras de agua, se podrían obtener rendimientos comparables o similares entre cada ensayos de qPCR (Tajadini, Panjehpour y Javanmard, 2014).

Para obtener resultados precisos durante el análisis de los virus de interés deben realizarse con niveles aceptables de eficiencia. A fin de evaluar dicha eficiencia, se deben utilizar controles de proceso molecular, los cuales son cantidades conocidas del virus de interés o uno similar que se agregan antes de las extracciones de ácidos nucleicos o antes de los procesos de qPCR, que nos ayudará a demostrar que los protocolos de extracción y detección funcionaron correctamente para cada ensayo (Girones *et al.*, 2010; Haramoto *et al.*, 2018). En el presente trabajo no se emplearon controles de proceso molecular durante todo el análisis de los virus, lo que pudo haber originado falsos negativos como consecuencia de la inhibición de diversas sustancias, como los ácidos húmicos y los metales pesados presentes en las muestras de agua (Farkas *et al.*, 2017), lo cual dificulta la comparación de los resultados en este trabajo, ya que las técnicas utilizadas pueden ser muy diferentes de un estudio a otro con rendimiento variables (Haramoto *et al.*, 2018).

10 Conclusión

Hasta donde sabemos, el presente trabajo es la primera evaluación integral para la cuantificación de los virus PMMoV y HAdV en aguas residuales y ambientales de Quintana Roo, en el que además, se incluyó una valoración de diferentes métodos de concentración y cuantificación viral. En este estudio, se detectó la presencia de estos virus en el 100% de los sitios colectados utilizando al menos alguno de los tres métodos de concentración viral. Además, se demostró que un protocolo basado en adsorción/elución con membranas cargadas negativamente (Método 2) fue un método primario efectivo para concentrar al PMMoV, así como al HAdV en muestras de agua dulce, salobre y residual tratada. No obstante, las recuperaciones del PMMoV mediante este método y al combinarlo con un método secundario utilizando filtros centrífugos (Método 3), se obtuvieron mayores valores de cuantificación. En cuanto las muestras de 10 L procesadas por el método 1, presentaron mayores valores de cuantificación de estos virus en comparación con los concentrados de 20 y 50 L. Se demostró que un ensayo con SYBR Green proporcionó rendimientos mayores para detectar al HAdV; en cambio, al determinar la presencia del PMMoV se registraron mayores tasas de detección a través

de un ensayo con sonda TaqMan. Por lo tanto, los métodos 2 y 3 para la concentración de estos virus permitieron el procesamiento de volúmenes más pequeños, con mínima probabilidad de problemas de inhibición, así como simplifica la recolección y el procesamiento de las muestras en comparación con el método 1.

11 Referencias

- Abbaszadegan, M., Stewart, P. and LeChevallier, M. (1999) 'A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 65(2), pp. 444–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925566> (Accessed: 12 July 2019).
- Adefisoye, M. A. *et al.* (2016) 'Quantitative PCR Detection and Characterisation of Human Adenovirus, Rotavirus and Hepatitis A Virus in Discharged Effluents of Two Wastewater Treatment Facilities in the Eastern Cape, South Africa', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 8(4), pp. 262–274. doi: 10.1007/s12560-016-9246-4.
- Ahmed, W. *et al.* (2015) 'Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 81(6), pp. 2042–2049. doi: 10.1128/AEM.03851-14.
- Ahmed, W. *et al.* (2018) 'Quantitative microbial risk assessment of microbial source tracking markers in recreational water contaminated with fresh untreated and secondary treated sewage', *Environment International*. Elsevier Ltd, 117, pp. 243–249. doi: 10.1016/j.envint.2018.05.012.
- Albinana-Gimenez, N. *et al.* (2009) 'Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR', *Journal of Virological Methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.02.004.
- Allard, A. and Vantarakis, A. (2019) 'Adenoviruses', in Meschke, J. S. and Girones, R. (eds) *Global Water Pathogen Project*. Michigan State University. doi: 10.14321/waterpathogens.11.
- Amdiouni, H. *et al.* (2012) 'Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco', *Letters in Applied Microbiology*. doi:

10.1111/j.1472-765X.2012.03220.x.

- Ávila-Torres, G. (2017) 'Detección y cuantificación de coliformes, colífagos y adenovirus en el sistema acuífero del norte del estado de Quintana Roo', *Centro de Investigación Científica de Yucatán*.
- Bachoon, D. S. *et al.* (2010) 'Assessment of non-point sources of fecal pollution in coastal waters of Puerto Rico and Trinidad', *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon, 60(7), pp. 1117–1121. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2010.04.020.
- Battistini, R. *et al.* (2013) 'Ciliate-adenovirus interactions in experimental co-cultures of *Euplotes octocarinatus* and in wastewater environment', *European Journal of Protistology*, 49(3), pp. 381–388. doi: 10.1016/j.ejop.2012.11.003.
- Bauer-Gottwein, P. *et al.* (2011) 'Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico', *Hydrogeology Journal*. Springer, pp. 507–524. doi: 10.1007/s10040-010-0699-5.
- Bautista, F. (2011) 'Vulnerabilidad y riesgo de contaminación de las aguas subterráneas en la península de yucatán', *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(2), pp. VII–VIII. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93917767002> (Accessed: 15 May 2020).
- Beddows, P. *et al.* (2005) 'Potential for inland dispersal of injection well effluent in coastal carbonate aquifers: Evidence from Caribbean Yucatan coast', *Proceedings of the National Cave and Karst Management Symposium*, pp. 5–11.
- Betancourt, W. Q. *et al.* (2014) 'Assessment of virus removal by managed aquifer recharge at three full-scale operations', *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. Taylor and Francis Inc., 49(14), pp. 1685–1692. doi: 10.1080/10934529.2014.951233.
- Boehm, A. B. *et al.* (2009) 'A sea change ahead for recreational water quality criteria', *Journal of Water and Health*. IWA Publishing, pp. 9–20. doi: 10.2166/wh.2009.122.
- Bofill-Mas, S. *et al.* (2005) 'Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos', *Revista Espanola de Salud Publica*,

79(2), pp. 253–269. doi: 10.1590/s1135-57272005000200012.

Bofill-Mas, S. *et al.* (2006) 'Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), pp. 7894–7896. doi: 10.1128/AEM.00965-06.

Borchardt, M. A. *et al.* (2012) 'Viruses in Nondisinfected Drinking Water from Municipal Wells and Community Incidence of Acute Gastrointestinal Illness', *Environmental Health Perspectives*. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services, 120(9), pp. 1272–1279. doi: 10.1289/ehp.1104499.

Bosch, A. (1998) 'Human enteric viruses in the water environment: a minireview.', *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(3), pp. 191–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943359> (Accessed: 12 July 2019).

Bosch, A. *et al.* (2008) 'New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, 19(3), pp. 295–301. doi: 10.1016/J.COPBIO.2008.04.006.

Brinkman, N. E. *et al.* (2013) 'Evaluation of methods using celite to concentrate norovirus, adenovirus and enterovirus from wastewater', *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 193(1), pp. 140–146. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.05.014.

Brooks, G. F. *et al.* (2014) *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed.*, *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg - 26.ed.*

Cabelli, V. J. (1983) 'Microbial indicator systems for assessing water quality', *Antonie van Leeuwenhoek*. Kluwer Academic Publishers, 48(6), pp. 613–618. doi: 10.1007/BF00399546.

Calgua, B. *et al.* (2008) 'Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples', *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 153(2), pp. 79–83. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.003.

Calgua de León, B. T. (2013) *Nuevas metodologías para el estudio de virus humanos*

contaminantes del medio ambiente. Universitat de Barcelona. Available at: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/49089> (Accessed: 31 October 2019).

Campos, M. C. (1999) *Indicadores de contaminacion fecal en la reutilizacion de agua residual regenerada en suelos*. Universitat de Barcelona.

CAPA, C. de A. P. y A. de Q. R. (2016) *Programa institucional de infraestructura hidraulica y saneamiento de Quintana Roo*. Available at: <http://www.capa.gob.mx/capa/infraestructuraHidraulica.pdf> (Accessed: 15 May 2020).

Carducci, A. *et al.* (2009) 'Viral removal by wastewater treatment: Monitoring of indicators and pathogens', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 1(2), pp. 85–91. doi: 10.1007/s12560-009-9013-x.

Carducci, A. and Verani, M. (2013) 'Effects of Bacterial, Chemical, Physical and Meteorological Variables on Virus Removal by a Wastewater Treatment Plant', *Food and Environmental Virology*, 5(1), pp. 69–76. doi: 10.1007/s12560-013-9105-5.

Carter, M. J. (2005) 'Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 98(6), pp. 1354–1380. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x.

Cashdollar, J. L. and Wymer, L. (2013) 'Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 115(1), pp. 1–11. doi: 10.1111/jam.12143.

Chamorro, C. *et al.* (2006) 'Concentración del virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante ultrafiltración de flujo tangencial combinado con filtración de exclusión', *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(1), pp. 77–82. doi: 10.4067/s0301-732x2006000100011.

Colson, P. *et al.* (2010) 'Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans', *PLoS ONE*.

Edited by E. Mylonakis. Public Library of Science, 5(4), p. e10041. doi: 10.1371/journal.pone.0010041.

Cornejo, R., Serrato, D. and Rendón, A. (2014) *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT, INECC, UAM-I.

Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. and Palmer, C. J. (2002) 'Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 68(3), pp. 1165–1172. doi: 10.1128/AEM.68.3.1165-1172.2002.

Dong, Y., Kim, J. and Lewis, G. D. (2010) 'Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters', *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), pp. 800–809. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x.

Enriquez, C. E., Hurst, C. J. and Gerba, C. P. (1995) 'Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water', *Water Research*. doi: 10.1016/0043-1354(95)00070-2.

Espinosa-García, A. *et al.* (2004) 'Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública', *Hidrobiológica*, 14(2), pp. 166–178. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972004000200011&script=sci_arttext (Accessed: 12 April 2020).

Falman, J. C. *et al.* (2019) 'Evaluation of Secondary Concentration Methods for Poliovirus Detection in Wastewater', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 11(1), pp. 20–31. doi: 10.1007/s12560-018-09364-y.

Farkas, K. *et al.* (2017) 'Evaluation of Molecular Methods for the Detection and Quantification of Pathogen-Derived Nucleic Acids in Sediment', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 8(JAN), p. 53. doi: 10.3389/fmicb.2017.00053.

Farkas, K. *et al.* (2018) 'Two-Step Concentration of Complex Water Samples for the Detection of Viruses', *Methods and Protocols*. MDPI AG, 1(3), p. 35. doi: 10.3390/mps1030035.

- Fernández, A. *et al.* (2001) 'Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A', *Higiene y Sanidad Ambiental*, 1, pp. 8–24.
- Fleming, L. E. *et al.* (2004) 'A Pilot Study of Microbial Contamination of Subtropical Recreational Waters', *Florida journal of environmental health*. NIH Public Access, 184, p. 29.
- FONATUR (2014) *Programa de Desarrollo Urbano del Centro de Población Cancún, Municipio Benito Juárez, Quintana Roo (2014-2030)*. Available at: <http://www.fonatur.gob.mx/gobmx/transparencia/Focalizada/tajamar/03.html> (Accessed: 15 May 2020).
- Fong, T.-T. and Lipp, E. K. (2005) 'Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools.', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 69(2), pp. 357–71. doi: 10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.
- Fong, T. T. *et al.* (2010) 'Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river', *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.01316-09.
- Fongaro, G. *et al.* (2013) 'Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: Viral integrity and viability assays', *Virology Journal*. BioMed Central, 10(1), p. 166. doi: 10.1186/1743-422X-10-166.
- Foster, S. *et al.* (2002) *Protección de la calidad del agua subterránea, guías para empresas de agua, autoridades municipales y agencias ambientales*. Edited by W. B. Mundial. Washington: Banco Mundial. Available at: www.mundiprensa.com (Accessed: 15 May 2020).
- Foy, C. A. and Parkes, H. C. (2001) 'Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory', *Clinical Chemistry*, pp. 990–1000. doi: 10.1093/clinchem/47.6.990.
- Francy, D. S. *et al.* (2013) 'Comparison of filters for concentrating microbial indicators and pathogens in lake water samples', *Applied and Environmental Microbiology*.

American Society for Microbiology (ASM), 79(4), pp. 1342–1352. doi: 10.1128/AEM.03117-12.

Futch, J. C., Griffin, D. W. and Lipp, E. K. (2010) 'Human enteric viruses in groundwater indicate offshore transport of human sewage to coral reefs of the Upper Florida Keys', *Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 12(4), pp. 964–974. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02141.x.

Garcia, L. A. T. *et al.* (2012) 'Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil', *Journal of Water and Health*. doi: 10.2166/wh.2012.190.

Gerba, C. P. (1984) 'Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces', *Advances in Applied Microbiology*, 30(C), pp. 133–168. doi: 10.1016/S0065-2164(08)70054-6.

Ghebremedhin, B. (2014) 'Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance', *European Journal of Microbiology and Immunology*. Akademiai Kiado Zrt., 4(1), pp. 26–33. doi: 10.1556/eujmi.4.2014.1.2.

Gibbons, C. D. *et al.* (2010) 'Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 109(2), pp. 635–641. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04691.x.

De Giglio, O. *et al.* (2017) 'Enteric viruses and fecal bacteria indicators to assess groundwater quality and suitability for irrigation', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG, 14(6). doi: 10.3390/ijerph14060558.

Girones, R. *et al.* (2010) 'Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques', *Water Research*, 44, pp. 4325–4339. doi: 10.1016/j.watres.2010.06.030.

Girones, R. and Bofill-Mas, S. (2013) 'Virus indicators for food and water', in *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Elsevier Ltd., pp. 483–509. doi:

10.1533/9780857098870.4.483.

- Glassmeyer, S. T. *et al.* (2005) 'Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination'. American Chemical Society. doi: 10.1021/ES048120K.
- González, A. M., Paranhos, R. and Lutterbach, M. S. (2010) 'Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil', *Environmental Monitoring and Assessment*. Springer, 164(1–4), pp. 207–219. doi: 10.1007/s10661-009-0886-9.
- Grabow, W. O., Taylor, M. B. and 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), pp. 1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11464736> (Accessed: 12 July 2019).
- Granel, E. and Hita, L. (2002) 'Deterioro de la calidad de agua subterránea por el desarrollo poblacional: Cancún, Q. Roo', *Ingengería*, 6(3), pp. 41–53.
- Grøndahl-Rosado, R. C. *et al.* (2014) 'A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway', *Food and Environmental Virology*, 6(4), pp. 232–245. doi: 10.1007/s12560-014-9161-5.
- Gu, X. *et al.* (2018) 'Geospatial distribution of viromes in tropical freshwater ecosystems', *Water Research*. Elsevier Ltd, 137, pp. 220–232. doi: 10.1016/j.watres.2018.03.017.
- Hamza, I. A. *et al.* (2009) 'Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses', *Water Research*. Elsevier Ltd, 43(10), pp. 2657–2668. doi: 10.1016/j.watres.2009.03.020.
- Hamza, I. A. *et al.* (2011a) 'Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water', *Water Research*, 45(3), pp. 1358–1368. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.021.

- Hamza, I. A. *et al.* (2011b) 'Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.07.014.
- Hamza, I. A. and Bibby, K. (2019) 'Critical issues in application of molecular methods to environmental virology', *Journal of Virological Methods*. Elsevier B.V., pp. 11–24. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.01.008.
- Haramoto, E. *et al.* (2005) 'Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 71(5), pp. 2403–2411. doi: 10.1128/AEM.71.5.2403-2411.2005.
- Haramoto, E. *et al.* (2007) 'Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments', *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), pp. 2153–2159. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x.
- Haramoto, E. *et al.* (2013) 'Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 79(23), pp. 7413–8. doi: 10.1128/AEM.02354-13.
- Haramoto, E. *et al.* (2018) 'A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water', *Water Research*. Elsevier Ltd, pp. 168–186. doi: 10.1016/j.watres.2018.02.004.
- Haramoto, E., Katayama, H. and Ohgaki, S. (2004) 'Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 70(4), pp. 2154–2160. doi: 10.1128/AEM.70.4.2154-2160.2004.
- Hata, A. *et al.* (2014) 'Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 468–469, pp. 757–763. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.093.
- Hernández-Flores, C. I. (2018) *Ocurrencia de Norovirus, virus de Hepatitis A y Reovirus en cuerpos de agua del norte de Quintana Roo: predicciones de riesgos para la*

salud. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Available at: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1175/1/PCA_M_Tesis_2018_Hernandez_Cesar.pdf (Accessed: 26 May 2020).

Hernandez-Morga, J. *et al.* (2009) 'Detection and characterization of hepatitis a virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration - RT-PCR integrated methods', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 106(5), pp. 1579–1590. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04125.x.

Hernández-Terrones, L. *et al.* (2011) 'Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems', *Water, Air, and Soil Pollution*. Kluwer Academic Publishers, 218(1–4), pp. 517–528. doi: 10.1007/s11270-010-0664-x.

Hewitt, J. *et al.* (2013) 'Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment', *Water Research*. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.001.

Hill, V. R. *et al.* (2007) 'Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 73(13), pp. 4218–4225. doi: 10.1128/AEM.02713-06.

Hjelmsø, M. H. *et al.* (2017) 'Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing', *PLOS ONE*. Edited by P. Tang. Public Library of Science, 12(1), p. e0170199. doi: 10.1371/journal.pone.0170199.

Hokajärvi, A. M. *et al.* (2013) 'Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents', *Journal of Water and Health*, 11(1), pp. 120–134. doi: 10.2166/wh.2012.192.

Hruby, C. E. *et al.* (2015) '2013 Survey of Iowa groundwater and evaluation of public well vulnerability classifications for contaminants of emerging concern', *Iowa Geological and Water Survey Technical Information Series*.

- Hryniszyn, A., Skonieczna, M. and Wiszniowski, J. (2013) 'Methods for Detection of Viruses in Water and Wastewater', *Advances in Microbiology*, 3, pp. 442–449. doi: 10.4236/aim.2013.35060.
- Hsu, B. M. *et al.* (2007) 'Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures', *Chemosphere*, 66(5), pp. 964–969. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.054.
- Hughes, B. *et al.* (2017) 'Cross-comparison of human wastewater-associated molecular markers in relation to fecal indicator bacteria and enteric viruses in recreational beach waters', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 83(8). doi: 10.1128/AEM.00028-17.
- ICTV (2011) *Virus taxonomy : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. Available at: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123846846/virus-taxonomy> (Accessed: 29 May 2019).
- ICTV (2020) *Genus: Tobamovirus - Virgaviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus (Accessed: 4 April 2020).
- Ikner, L. A., Gerba, C. P. and Bright, K. R. (2012) 'Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review', *Food and Environmental Virology*. Springer, pp. 41–67. doi: 10.1007/s12560-012-9080-2.
- Islam, M. M. M., Hofstra, N. and Islam, M. A. (2017) 'The Impact of Environmental Variables on Faecal Indicator Bacteria in the Betna River Basin, Bangladesh', *Environmental Processes*. Springer Basel, 4(2), pp. 319–332. doi: 10.1007/s40710-017-0239-6.
- Jiang, S. C. (2006) 'Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review †', *Environmental Science & Technology*, 40(23), pp. 7132–7140. doi: 10.1021/es060892o.

- Jiménez, P. (2011) 'Turismo, población y territorio en Quintana Roo: relación y proyecciones'.
- Katayama, H., Shimasaki, A. and Ohgaki, S. (2002) 'Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 68(3), pp. 1033–1039. doi: 10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002.
- Kato, R. *et al.* (2018) 'Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan', *Water Research*. Elsevier Ltd, 132, pp. 61–70. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.068.
- Kitajima, M. *et al.* (2014) 'Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential viral indicators', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.087.
- Kitajima, M., Sassi, H. P. and Torrey, J. R. (2018) 'Pepper mild mottle virus as a water quality indicator', *npj Clean Water*. doi: 10.1038/s41545-018-0019-5.
- Kokkinos, P. A. *et al.* (2011) 'Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece', *Virology Journal*. doi: 10.1186/1743-422X-8-195.
- Kubista, M. *et al.* (2006) 'The real-time polymerase chain reaction', *Molecular Aspects of Medicine*, pp. 95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Kundu, A., McBride, G. and Wuertz, S. (2013) 'Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment', *Water Research*. Elsevier Ltd, 47(16), pp. 6309–6325. doi: 10.1016/j.watres.2013.08.002.
- Kuroda, K. *et al.* (2015) 'Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.11.021.

- Lambertini, E. *et al.* (2008) 'Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), pp. 2990–2996. doi: 10.1128/AEM.02246-07.
- Larrea-Murrell, J. A. *et al.* (2013) 'Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura', *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Editorial Universitaria de la Republica de Cuba, 44(3), pp. 24–35.
- Leal-Bautista, R. M. *et al.* (2013) 'Assessing Fecal Contamination in Groundwater from the Tulum Region, Quintana Roo, Mexico', *Journal of Environmental Protection. Scientific Research Publishing, Inc*, 04(11), pp. 1272–1279. doi: 10.4236/jep.2013.411148.
- Lee, S. *et al.* (2017) 'Evaluation of Virus Reduction by Ultrafiltration with Coagulation–Sedimentation in Water Reclamation', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 9(4), pp. 453–463. doi: 10.1007/s12560-017-9301-9.
- Lin, J. and Ganesh, A. (2013) 'Water quality indicators: Bacteria, coliphages, enteric viruses', *International Journal of Environmental Health Research*. Taylor & Francis, pp. 484–506. doi: 10.1080/09603123.2013.769201.
- Livak, K. J., Flood, S. J. and Marmaro, J. (1995) 'Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.', *Methods Appl.*, 4, pp. 357–362. Available at: <http://genome.cshlp.org/content/4/6/357.refs.html><http://genome.cshlp.org/subscriptions> (Accessed: 24 April 2020).
- Lorenzo-Morales, J. *et al.* (2007) 'Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of Acanthamoeba in the Canary Islands, Spain', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), pp. 753–756. doi: 10.4269/ajtmh.2007.77.753.
- Love, D. C. *et al.* (2014) 'Human viruses and viral indicators in marine water at two recreational beaches in Southern California, USA', *Journal of Water and Health*. IWA

Publishing, 12(1), pp. 136–150. doi: 10.2166/wh.2013.078.

Lucena, F. *et al.* (1991) *Extraction et concentration des virus des milieux hydriques, Virologie des milieux hydriques*. Available at: <https://art.torvergata.it/handle/2108/67425> (Accessed: 23 April 2020).

Lukasik, J. *et al.* (2000) 'Influence of salts on virus adsorption to microporous filters.', *Applied and environmental microbiology*, 66(7), pp. 2914–20. doi: 10.1128/aem.66.7.2914-2920.2000.

Lutfalla, G. and Uze, G. (2006) 'Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments', *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 386–400. doi: 10.1016/S0076-6879(06)10019-1.

Marín, L. E. *et al.* (2000) 'Hydrogeology of a contaminated sole-source karst aquifer, Mérida, Yucatán, Mexico', *Geofísica Internacional*, 39(4), pp. 359–365.

Marin, L. E. and Perry, E. C. (1994) 'The hydrogeology and contamination potential of northwestern Yucatan, Mexico', *Geofísica Internacional*, 33(4), pp. 619–623.

Matrajt, G. *et al.* (2018) 'A Review of the Most Commonly Used Methods for Sample Collection in Environmental Surveillance of Poliovirus', *Clinical Infectious Diseases S90 • CID*, 2018(1), pp. 90–97. doi: 10.1093/cid/ciy638.

McGinnis, S. *et al.* (2018) 'Human Bacteroides and total coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban creeks', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 630, pp. 967–976. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.108.

Melgarejo, N. P. *et al.* (2010) *Patógenos de plantas descritos en España*. 2a Edición. Sociedad Española de Fitopatología. Available at: <http://aesave.agripa.org/post/patogenos-de-plantas-descritos-en-espana-166653> (Accessed: 4 April 2020).

Mena, K. D. and Gerba, C. P. (2009) 'Waterborne adenovirus', *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. doi: 10.1007/978-0-387-09647-6_4.

Metcalfe, C. D. *et al.* (2011) 'Contaminants in the coastal karst aquifer system along the

Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico', *Environmental Pollution. Environ Pollut*, 159(4), pp. 991–997. doi: 10.1016/j.envpol.2010.11.031.

Morales-Morales, H. A. *et al.* (2003) 'Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 69(7), pp. 4098–4102. doi: 10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003.

Muñoz-Cortes, C. E. (2018) *Detección de colífagos y virus entéricos en descargas de agua subterránea en la zona costera de Akumal*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Available at: <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1177> (Accessed: 9 February 2020).

Nasser, A. M. and Oman, S. D. (1999) 'Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources', *Water Research*. Elsevier Science Ltd, 33(7), pp. 1748–1752. doi: 10.1016/S0043-1354(98)00380-7.

Negrete-Alcalde, L. J. (2019) *Ocurrencia espacio-temporal de colífagos, Pepper mild mottle virus (PMMoV) y Adenovirus humanos (HAdVs) en la caleta de Yal-kú, Quintana Roo*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Available at: <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1619> (Accessed: 9 February 2020).

Novelo, M. *et al.* (2010) 'Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua', *Rev. Int. Contam. Ambient*, 26(4), pp. 327–335.

Ogorzaly, L. *et al.* (2010) 'Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 76(24), pp. 8019–8025. doi: 10.1128/AEM.00917-10.

Okeke, H. C. *et al.* (2014) 'Evaluation of the physico-chemical properties of groundwater from shallow wells in Enugu town, Nigeria', *Environmental Earth Sciences*. Springer Verlag, 73(1), pp. 325–332. doi: 10.1007/s12665-014-3427-y.

- Olszewski, J., Winona, L. and Oshima, K. H. (2005) 'Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters', *Canadian Journal of Microbiology*, 51(4), pp. 295–303. doi: 10.1139/w05-011.
- Pace, N. R. (1997) 'A molecular view of microbial diversity and the biosphere', *Science*. doi: 10.1126/science.276.5313.734.
- Pacheco, J. and Cabrera, A. (1997) 'Groundwater Contamination by Nitrates in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Hydrogeology Journal*. Springer Science and Business Media LLC, 5(2), pp. 47–53. doi: 10.1007/s100400050113.
- Peng, J. *et al.* (2015) 'Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China', *Archives of Virology*. doi: 10.1007/s00705-015-2454-7.
- Pina Pedrero, S. (2001) *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. Universitat de Barcelona. Available at: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42376> (Accessed: 31 October 2019).
- Polaczyk, A. L. *et al.* (2008) 'Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples', *Journal of Microbiological Methods*. doi: 10.1016/j.mimet.2008.02.014.
- Prado, T. *et al.* (2011) 'Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants', *Water Research*. Elsevier Ltd, 45(3), pp. 1287–1297. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.012.
- Prevost, B. *et al.* (2015) 'Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population', *Environment International*. Elsevier Ltd, 79, pp. 42–50. doi: 10.1016/j.envint.2015.03.004.
- Pruss, A. (1998) 'Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water.', *International journal of epidemiology*, 27(1), pp. 1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9563686> (Accessed: 26 April 2020).
- Rachmadi, A. T. *et al.* (2016) 'Enteric and indicator virus removal by surface flow wetlands', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 542, pp. 976–982. doi:

10.1016/j.scitotenv.2015.11.001.

Rames, E. *et al.* (2016) 'Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator', *Water Research*. Elsevier Ltd, pp. 308–326. doi: 10.1016/j.watres.2016.03.042.

Ramírez-Castillo, F. Y. *et al.* (2015) 'Waterborne pathogens: Detection methods and challenges', *Pathogens*. MDPI AG, pp. 307–334. doi: 10.3390/pathogens4020307.

Renault, P. (1986) *La formación de las cavernas*. Orbis.

Rhodes, E. R. *et al.* (2016) 'The evaluation of hollow-fiber ultrafiltration and celite concentration of enteroviruses, adenoviruses and bacteriophage from different water matrices', *Journal of Virological Methods*. Elsevier B.V., 228, pp. 31–38. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.003.

Rigotto, C. *et al.* (2009) 'Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Fundacao Oswaldo Cruz, 104(7), pp. 970–974. doi: 10.1590/S0074-02762009000700005.

Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M. and Gutiérrez-Builes, L. A. (2017) 'Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano', *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. Universidad de Antioquia, 35(2), pp. 236–247. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

Rodríguez Manzano, J. (2012) *Detección y caracterización de virus patógenos emergentes de interés general en seguridad alimentaria*. Universitat de Barcelona. Available at: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42412> (Accessed: 31 October 2019).

Rodríguez, R. A. *et al.* (2013) 'An improved infectivity assay combining cell culture with real-time PCR for rapid quantification of human adenoviruses 41 and semi-quantification of human adenovirus in sewage', *Water Research*. Elsevier Ltd, 47(9), pp. 3183–3191. doi: 10.1016/j.watres.2013.03.022.

- La Rosa, G. *et al.* (2010) 'Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy', *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. doi: 10.4415/ANN-10-03-07.
- Rosario, K. *et al.* (2009) 'Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution', *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/AEM.00410-09.
- Rosiles-González, G. *et al.* (2017) 'Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in Groundwater from a Karst Aquifer System in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 9(4), pp. 487–497. doi: 10.1007/s12560-017-9309-1.
- Rosiles-González, G. *et al.* (2019) 'Norovirus and human adenovirus occurrence and diversity in recreational water in a karst aquifer in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 127(4), pp. 1255–1269. doi: 10.1111/jam.14385.
- Rosiles-González, G. *et al.* (2019) 'Norovirus and human adenovirus occurrence and diversity in recreational water in a karst aquifer in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Journal of Applied Microbiology*, 127(4), pp. 1255–1269. doi: 10.1111/jam.14385.
- Rossen, A. *et al.* (2008) 'Indicadores bacterianos de contaminación fecal en el embalse San Roque (Córdoba, Argentina)', *Higiene y Sanidad Ambiental*, 8, pp. 325–330.
- Rowe, W. P. *et al.* (1953) 'Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. doi: 10.3181/00379727-84-20714.
- Rubio Guerri, C. (2015) *Detección, prevalencia y epidemiología molecular de virus en cetáceos*. Available at: <https://eprints.ucm.es/34293/1/T36680.pdf> (Accessed: 29 October 2019).
- Ruhanya, V., Kabego, L. and Otwoma Gichana, J. (2016) 'Adsorption-Elution Techniques and Molecular Detection of Enteric Viruses from Water', *Journal of Human Virology & Retrovirology*. MedCrave Group, LLC, 3(6). doi: 10.15406/jhvr.2016.03.00112.

- Saavedra, M., Tovar, C. and Betancourt, W. Q. (2012) 'Virus entéricos en Ambientes Acuáticos: Métodos De Concentración y detección', *Interciencia*.
- Sangsanont, J. *et al.* (2016) 'Detection of pepper mild mottle virus as an indicator for drinking water quality in Hanoi, Vietnam, in large volume of water after household treatment', *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. Taylor and Francis Inc., 51(13), pp. 1100–1106. doi: 10.1080/10934529.2016.1199650.
- Sassi, H. P. *et al.* (2018) 'Persistence of Viruses by qPCR Downstream of Three Effluent-Dominated Rivers in the Western United States', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 10(3), pp. 297–304. doi: 10.1007/s12560-018-9343-7.
- Scheid, P. and Schwarzenberger, R. (2012) 'Acanthamoeba spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses', *Parasitology Research*, 111(1), pp. 479–485. doi: 10.1007/s00436-012-2828-7.
- Schlindwein, A. D. *et al.* (2010) 'Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent', *Water Science and Technology*. doi: 10.2166/wst.2010.845.
- Schmitter-Soto, J. J. *et al.* (2002) *Los cenotes de la Península de Yucatán, De la Lanza-Espino, G. y JL García-Calderón (Comps.). Lagos y Presas de México. AGT.* Available at: <https://www.researchgate.net/publication/228984086> (Accessed: 15 May 2020).
- Schmitz, B. W. *et al.* (2016) 'Virus reduction during advanced bardenpho and conventional wastewater treatment processes', *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society, 50(17), pp. 9524–9532. doi: 10.1021/acs.est.6b01384.
- Secretaría de Turismo del estado de Quintana Roo (2017) *REPORTE ANUAL DE TURISMO QUINTANA ROO 2017*, Gobierno del estado de Quintana Roo. Available at: http://sedeturqroo.gob.mx/ARCHIVOS/REPORTE_TURISMO_2017.pdf (Accessed: 25 May 2020).
- Shi, H. *et al.* (2016) 'Elution is a critical step for recovering human adenovirus 40 from tap water and surface water by cross-flow ultrafiltration', *Applied and Environmental*

Microbiology. American Society for Microbiology, 82(16), pp. 4982–4993. doi: 10.1128/AEM.00870-16.

Shi, H., Pasco, E. V. and Tarabara, V. V. (2017) 'Membrane-based methods of virus concentration from water: A review of process parameters and their effects on virus recovery', *Environmental Science: Water Research and Technology*. Royal Society of Chemistry, pp. 778–792. doi: 10.1039/c7ew00016b.

Shrestha, Sadhana *et al.* (2018) 'Virological Quality of Irrigation Water Sources and Pepper Mild Mottle Virus and Tobacco Mosaic Virus as Index of Pathogenic Virus Contamination Level', *Food and Environmental Virology*. Springer New York LLC, 10(1), pp. 107–120. doi: 10.1007/s12560-017-9324-2.

Sibanda, T. and Okoh, A. I. (2012) 'Assessment of the incidence of enteric adenovirus species and serotypes in surface waters in the Eastern Cape Province of South Africa: Tyume river as a case study', *The Scientific World Journal*, 2012. doi: 10.1100/2012/949216.

Sidhu, J. P. S., Ahmed, W. and Toze, S. (2013) 'Sensitive detection of human adenovirus from small volume of primary wastewater samples by quantitative PCR', *Journal of Virological Methods*. Elsevier, 187(2), pp. 395–400. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.002.

Silva, H. D., García-Zapata, M. T. A. and Anunciação, C. E. (2011) 'Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker?', *Food and Environmental Virology*. doi: 10.1007/s12560-011-9069-2.

Silverman, A. I. *et al.* (2013) 'Quantification of human norovirus GII, human adenovirus, and fecal indicator organisms in wastewater used for irrigation in Accra, Ghana', *Journal of Water and Health*, 11(3), pp. 473–488. doi: 10.2166/wh.2013.025.

Sobsey, M. D. *et al.* (1998) 'RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater', *Water Science and Technology*. IWA Publishing, 38(12), pp. 91–94. doi: 10.2166/wst.1998.0511.

Staggemeier, R. *et al.* (2015) 'QUANTITATIVE VS. CONVENTIONAL PCR FOR

DETECTION OF HUMAN ADENOVIRUSES IN WATER AND SEDIMENT SAMPLES', *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 57(4), pp. 299–303. doi: 10.1590/S0036-46652015000400005.

Symonds, E. M. *et al.* (2014) 'A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia', *Water Research*. doi: 10.1016/j.watres.2014.07.032.

Symonds, E. M. *et al.* (2016) 'Faecal pollution along the southeastern coast of Florida and insight into the use of pepper mild mottle virus as an indicator', *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 121(5), pp. 1469–1481. doi: 10.1111/jam.13252.

Symonds, E. M. *et al.* (2017) 'Microbial source tracking in shellfish harvesting waters in the Gulf of Nicoya, Costa Rica', *Water Research*. Elsevier Ltd, 111, pp. 177–184. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.004.

Symonds, E. M. *et al.* (2018) 'Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management', *Water Research*. Elsevier Ltd, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.watres.2018.06.066.

Symonds, E. M., Rosario, K. and Breitbart, M. (2019) 'Pepper mild mottle virus: Agricultural menace turned effective tool for microbial water quality monitoring and assessing (waste) water treatment technologies', *PLoS Pathogens*. Public Library of Science, 15(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1007639.

Tajadini, M., Panjehpour, M. and Javanmard, S. (2014) 'Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes', *Advanced Biomedical Research*. Medknow, 3(1), p. 85. doi: 10.4103/2277-9175.127998.

Tandukar, S. *et al.* (2018) 'Presence of human enteric viruses, protozoa, and indicators of pathogens in the Bagmati river, Nepal', *Pathogens*. MDPI AG, 7(2). doi: 10.3390/pathogens7020038.

Tena Fernández, F. (2012) *Patogénesis del virus del moteado suave del pimiento en*

solanáceas. Universidad Autónoma de Madrid. Available at: https://digital.csic.es/bitstream/10261/144369/1/Tesis_Tena_Fatima_UAM_2012.pdf (Accessed: 2 April 2020).

Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J. and Gerba, C. P. (2003) 'Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 69(7), pp. 3979–3985. doi: 10.1128/AEM.69.7.3979-3985.2003.

Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Riley, K., *et al.* (2003) 'Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 69(1), pp. 577–582. doi: 10.1128/AEM.69.1.577-582.2003.

Tostado Álvarez, J. M. (1995) *Estudios de la resistencia y protección mediada por la proteína de la cápsida frente a tobamovirus en plantas de los géneros 'Capsicum' y 'Nicotiana'*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

Vargas, C. *et al.* (1996) *Control y Vigilancia de la Calidad del Agua de Consumo humano, Texto Completos. CEPIS*. Available at: http://65.182.2.246/docum/crid/CD_Agua/pdf/spa/doc14581/doc14581.pdf (Accessed: 14 May 2020).

Vázquez-Borges, E. *et al.* (1997) 'The efficiency of two anaerobic reactor components', *Tecnología del Agua*, 165, pp. 30–36. Available at: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/520992> (Accessed: 24 June 2020).

Verani, M. *et al.* (2016) 'Investigating the role of *Acanthamoeba polyphaga* in protecting Human Adenovirus from water disinfection treatment', *European Journal of Protistology*. Elsevier GmbH, 54, pp. 11–18. doi: 10.1016/j.ejop.2016.02.006.

Victoria, M. *et al.* (2009) 'Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters', *Journal of Virological Methods*, 156(1–2), pp. 73–76. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.11.003.

ViralZone (2020) *Tobamovirus*. Available at:

https://viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species (Accessed: 5 April 2020).

- Wen, X. *et al.* (2019) 'Comparative study of two methods of enteric virus detection and enteric virus relationship with bacterial indicator in poyang lake, Jiangxi, China', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG, 16(18). doi: 10.3390/ijerph16183384.
- Wetter, C. (1984) 'Pepper Mild Mottle Virus, a Tobamovirus Infecting Pepper Cultivars in Sicily', *Phytopathology*. Scientific Societies, 74(4), p. 405. doi: 10.1094/phyto-74-405.
- WHO (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*. Fourth ed. Available at: http://apps.who.int/%0Airis/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf. (Accessed: 20 May 2020).
- Willey, J., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. (2009) 'Microbiología de Prescott, Harley y Klein', *Madrid: McGraw Hill Interamericana de España, SAU*. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/1998_n11/pportadores.htm.
- Wong, M. V. M. *et al.* (2013) 'Detection and characterization of human pathogenic viruses circulating in community wastewater using multi target microarrays and polymerase chain reaction', *Journal of Water and Health*. doi: 10.2166/wh.2013.322.
- Wyn-Jones, A. P. and Sellwood, J. (2001) 'Enteric viruses in the aquatic environment', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 91(6), pp. 945–962. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x.
- Yates, M. V., Gerba, C. P. and Kelley, L. M. (1985) 'Virus persistence in groundwater', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 49(4), pp. 778–781. doi: 10.1128/aem.49.4.778-781.1985.
- Yuan, L. and Saif, L. J. (2002) 'Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: Rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model', in *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier, pp. 147–160. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00046-6.

Zhang, T. *et al.* (2006) 'RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.0040003.

Zipper, H. *et al.* (2004) 'Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications', *Nucleic Acids Res.*, 32(12), p. 102. doi: 10.1093/nar/gnh101.

12 Anexos

12.1 Preparación de medios de cultivo y soluciones

12.1.1 Preparación de células competentes

Medio PSI-Broth:

- 250 mL de agua destilada
- Extracto de levadura 1.5 g
- Triptona 5 g
- 1.25 g de $\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$
- Ajustar el pH a 7.6 con KOH. Añadir 14 g/L de agar.
- Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Medio Luria-Bertani (LB):

- 20.6 g medio LB Broth EZMix™ (Sigma-Aldrich®)
- Agua destilada 1000 mL
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min
- Almacenar a 4°C

TFB-1:

- 200 mL de agua destilada
- 0.588 g de Acetato potásico (30 mM)
- 2.42 g de KCl (100 mM)
- 0.294 g de CaCl_2 (10 mM)
- 2 g de MnCl_2 (50 mM)
- 30 mL de Glicerol (15% v/v)
- Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

TFB-2:

- 100 mL de agua destilada

- 0.21 g de MOPS (10 mM)
- 1.1 g de CaCl₂ (75 mM)
- 0.121 g de RbCl (10 mM)
- 15 mL de Glicerol (15% v/v)
- Ajustar el pH a 6.5 con KOH. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

12.1.2 *Extracción y purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina:*

Solución de lisis alcalina I:

- 50 mM de Glucosa
- 25 mM de Tris-Cl (pH 8.0)
- 10 mM de EDTA (pH 8.0)
- Guardar a 4°C

Solución de lisis alcalina II:

- 0.2 N de NaOH
- 1% (w/v) de SDS
- Almacenar a temperatura ambiente

Solución de lisis alcalina III:

- 60.0 mL de Acetato de Potasio (5 M)
- 11.5 mL de Ácido Acético glacial
- 28.5 mL de agua destilada
- Almacenar a 4°C

12.2 Costos para la cuantificación del PMMoV

Para estimar el costo total requerido para la cuantificación del PMMoV por muestra, se consideraron los costos de los reactivos necesarios para la concentración de las muestras de agua mediante los tres métodos de concentración utilizados, los costos para la extracción del ARN total así como su obtención del ADNc, también se consideraron los costos de los reactivos para la cuantificación viral mediante qPCR–

TaqMan/SYBR Green. Además, los costos de los reactivos que se emplearon correspondieron a los precios vigentes del 2019, los cuales se expresan en pesos mexicanos (MX).

METODO 1 (UFT)											
Pasos Principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad a usar por muestra	10 L		20 L		50 L		
					Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)	Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)	Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)	
Filtración	Filtros Fresenius F80a	5,936	12 pieza	1 pieza	1 pieza	494.66	1 pieza	494.66	1 pieza	494.66	
Acondicionamiento	NaPP	1,464	1000 g	(0.01%)(W/V)	1 g	1.464	2 g	2.928	5 g	7.32	
Solución de bloqueo	NaPP	1,464	1000 g	(0.1%)(1 g*1 L)	500 mL	0.732	500 mL	0.732	500 mL	0.732	
Solución de retrolavado	Tween 80	760	100 mL	(0.01%)(0.1 mL*1 L)	500 mL	0.38	500 mL	0.38	500 mL	0.38	
	Y-30 Emulsión	907	100 mL	(0.001%)(0.01 mL*1 L)		0.4535		0.4535			
	NaPP	1,464	1000 g	(0.01%)(0.01 g*1L)		0.00732		0.00732		0.00732	
Segunda concentración por Pegilación	PEG 8000	3,161	1000 g	(12%)(W/V)	24 g	75.864	42 g	132.762	42 g	132.762	
	NaCl	858	500 g	0.8 M/L	9.3 g	15.959	16 g	27.456	16 g	27.456	
Purificación de lo concentrado	Buffer PBS 1x	2,345	1000 mL	(10 mL*1 L) 10X	5 mL	0.11725	5 mL	0.11725	5 mL	0.11725	
	Butanol	1,251	500 mL	2.5 mL	2.5 mL	6.255	2.5 mL	6.255	2.5 mL	6.255	
	Cloroformo	1,793	1000 mL	2.5 mL	2.5 mL	4.4825	2.5 mL	4.4825	2.5 mL	4.4825	
						Precio total por muestra	600.37	Precio total por muestra	670.23	Precio total por muestra	674.63

Método 2							
Pasos principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)	
Filtración	Filtros HAWP-090-00	3,594	100 piezas	1 pieza	1 pieza	35.94	
Acondicionamiento	MgCl2	1,495	500 g		1.3 g	5.98	
Solución de adsorción	H2SO4	1,074	500 mL	(200 mL*0.5 mm)	0.006 mL	2.15	
	NaOH	1,179	500 g	(10 mL*1mm)	0.0083 g	2.36	
Solución de elución	H2SO4	1,074	500 mL	(10 µL*100mm)	0.006 mL	2.15	
	TE 100x	673	100 mL	1 mL*100 mL	(100 µL*1x)	0.67	
						Precio total por muestra	49.25

Método 3						
Pasos principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Filtración	Filtros HAWP-090-00	3,594	100 piezas	1 pieza	1 pieza	35.94
Acondicionamiento	MgCl2	1,495	500 g	1.3 g	1.3 g	5.98
Solución de adsorción	H2SO4	1,074	500 mL	(200 mL*0.5 mm)	0.006 mL	2.15
Solución de elución	NaOH	1,179	500 g	(10 mL*1mm)	0.0083 g	2.36
	H2SO4	1,074	500 mL	(10 µL*100mm)	0.006 mL	2.15
	TE 100x	673	100 mL	1 mL*100 mL	(100 µL*1x)	0.67
MLtrafiltración/Centrifugación	Filtro Centriprep YM-50	6,149.16	24 piezas	1 pieza	1 pieza	256.22
Precio total por muestra						305.47

Extracción del ARN total				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
QIAmp RNA Kit	5,721	50 Rx	1 Rx	114.42

Obtención de ADNc				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit	11,700	100 Rx*20 µL	1 Rx	117

qPCR - TaqMan				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Sonda TaqMan	2,447	50 Rx	1 Rx	48.94
Buffer	4,100	1.25 mL	2.5 µL	13.67
MgCl2		1000 µL	0.75 µL	13.67
Taq Polimerasa		500 units(5 u/µL)	0.1 µL	13.67
dNTPs	700	1000 µL	0.5 µL	0.7
Agua	959.7	1000 µL	14.9 µL	13.44
Precio total por muestra				104.08

qPCR - SYBR Green				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Super Mix	5,721	100 Rx*20 µL	1 Rx	57.21
Primer Fw	207	1000 µL	1 µL	4.83
Primer Rv	207	1001 µL	1 µL	4.83
Agua	959.7	1000 µL	5.5 µL	4.80
Precio total por muestra				71.67

Métodos de concentración viral	Precio total por muestra (\$)	
	qPCR - SYBR Green	qPCR - TaqMan
Método 1 - 10 L	1,520.00	1,557.00
Método 1 - 20 L	1,600.95	1,638.64
Método 1 - 50 L	1,606.04	1,643.73
Método 2	880.71	918.30
Método 3	1,177.44	1,215.51

12.3 Costos para la cuantificación del HAdV

Para estimar el costo total requerido para la cuantificación del HAdV por muestra, se se tomaron en cuenta los costos de los reactivos necesarios para la concentración de las muestras de agua mediante los tres métodos de concentración utilizados, los costos para la extracción del ADN total así como los costos de los reactivos para la cuantificación viral mediante qPCR–TaqMan/SYBR Green. Además, los costos de los reactivos que se utilizaron correspondieron a los precios vigentes del 2019, los cuales se expresan en pesos mexicanos (MX).

METODO 1 (UFT)										
Pasos Principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad a usar por muestra	10 L		20 L		50 L	
					Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)	Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)	Cantidad por muestra (g)	Precio por muestra (\$)
Filtración	Filtros Fresenius F80a	5,936	12 pieza	1 pieza	1 pieza	494.66	1 pieza	494.66	1 pieza	494.66
Acondicionamiento	NaPP	1,464	1000 g	(0.01%)(W/V)	1 g	1.464	2 g	2.928	5 g	7.32
Solución de bloqueo	NaPP	1,464	1000 g	(0.1%)(1 g*1 L)	500 mL	0.732	500 mL	0.732	500 mL	0.732
Solución de retrolavado	Tween 80	760	100 mL	(0.01%)(0.1 mL*1 L)	500 mL	0.38	500 mL	0.38	500 mL	0.38
	Y-30 Emulsión	907	100 mL	(0.001%)(0.01 mL*1 L)		0.4535		0.4535		0.4535
	NaPP	1,464	1000 g	(0.01%)(0.01 g*1L)		0.00732		0.00732		0.00732
Segunda concentración por Pegilación	PEG 8000	3,161	1000 g	(12%)(W/V)	24 g	75.864	42 g	132.762	42 g	132.762
	NaCl	858	500 g	0.8 M/L	9.3 g	15.959	16 g	27.456	16 g	27.456
Purificación de lo concentrado	Buffer PBS 1x	2,345	1000 mL	(10 mL*1 L) 10X	5 mL	0.11725	5 mL	0.11725	5 mL	0.11725
	Butanol	1,251	500 mL	2.5 mL	2.5 mL	6.255	2.5 mL	6.255	2.5 mL	6.255
	Cloroformo	1,793	1000 mL	2.5 mL	2.5 mL	4.4825	2.5 mL	4.4825	2.5 mL	4.4825
					Precio total por muestra	600.37	Precio total por muestra	670.23	Precio total por muestra	674.63

Método 2						
Pasos principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Filtración	Filtros HAWP-090-00	3,594	100 piezas	1 pieza	1 pieza	35.94
Acondicionamiento	MgCl2	1,495	500 g		1.3 g	5.98
Solución de adsorción	H2SO4	1,074	500 mL	(200 mL*0.5 mm)	0.006 mL	2.15
	NaOH	1,179	500 g	(10 mL*1mm)	0.0083 g	2.36
Solución de elución	H2SO4	1,074	500 mL	(10 µL*100mm)	0.006 mL	2.15
	TE 100x	673	100 mL	1 mL*100 mL	(100 µL*1x)	0.67
Precio total por muestra						49.25

Método 3						
Pasos principales:	Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Filtración	Filtros HAWP-090-00	3,594	100 piezas	1 pieza	1 pieza	35.94
Acondicionamiento	MgCl2	1,495	500 g	1.3 g	1.3 g	5.98
Solución de adsorción	H2SO4	1,074	500 mL	(200 mL*0.5 mm)	0.006 mL	2.15
	NaOH	1,179	500 g	(10 mL*1mm)	0.0083 g	2.36
Solución de elución	H2SO4	1,074	500 mL	(10 µL*100mm)	0.006 mL	2.15
	TE 100x	673	100 mL	1 mL*100 mL	(100 µL*1x)	0.67
MLtrafiltración/Centrifugación	Filtro Centriprep YM-50	6,149.16	24 piezas	1 pieza	1 pieza	256.22
Precio total por muestra						305.47

Extracción del ADN total				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
QIAmp DNA Kit	2,683.00	50 Rx	1 Rx	53.66

qPCR - TaqMan				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Sonda TaqMan	2,447	50 Rx	1 Rx	48.94
Buffer	4,100	1.25 mL	2.5 µL	13.67
MgCl2		1000 UL	0.75 µL	13.67
Taq Polimerasa		500 UNITS (5 U/UL)	0.1 µL	13.67
dNTPs	700	1000 UL	0.5 µL	0.70
Agua	959.7	1000 UL	14.9 UL	13.44
Precio total por muestra				104.08

qPCR - SYBR Green				
Reactivos	Precio total (\$)	Cantidad total	Cantidad por muestra	Precio por muestra (\$)
Super Mix	5,721	100 Rx*20 µL	1 Rx	57.21
Primer Fw	249	1000 µL	1 µL	4.02
Primer Rv	249	1001 µL	1 µL	4.02
Agua	959.7	1000 µL	5.5 µL	4.80
Precio total por muestra				70.04

Métodos de concentración viral	Precio total por muestra (\$)	
	qPCR - SYBR Green	qPCR - TaqMan
Método 1 - 10 L	1,311.93	1351.41
Método 1 - 20 L	1,392.95	1432.44
Método 1 - 50 L	1,398.06	1437.54
Método 2	672.62	712.10
Método 3	969.83	1009.32