



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -CONCYT-
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -SENACYT-
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA -FONACYT-
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD**

INFORME FINAL

**“CARACTERIZACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS CONTAMINANTES,
PRESENTES EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA RELACIONADOS CON EL
CONSUMO Y USO HUMANO.”**

FODECYT No. 042-2011

**Licda. Leticia Castillo Signor
Investigadora Principal**

Guatemala, Julio 2016



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología –FONACYT-, otorgado por la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología –CONCYT-

**Agradecimientos al personal del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social,
que hizo posible esta investigación:**

**EQUIPO DE TRABAJO DEL LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
GUATEMALA:**

Licda. Leticia Castillo

Licda. Yolanda Mencos

Lic. Sergio Meneses

Licda. María Del Carmen Castillo

Lic. Renato Torres

**Personal que contribuyó a la realización del presente proyecto: Tesis de pregrado
para optar el título de Químico Biólogo**

Lic. Andrés Herrera

Lic. Luis Salguero

Licda. Suheiri Rodrigues

**EQUIPO DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE VIRUS
CONTAMINANTES DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE
BARCELONA**

Dr. Byron Calgua

Dr. Jesús Rodríguez

Dr. Ayalkybet Hundesa

Dra. Laura Guerrero

Dra. Marta Rusiñol

Dra. Silvia Bofill

Dra. Rosina Girones

RESUMEN

El vertido de las aguas residuales de origen doméstico e industrial es la principal fuente de contaminación fecal para el medio ambiente. Esto representa un serio problema de salud pública especialmente en países pobres y en vías de desarrollo. Dentro de estos contaminantes se encuentran grandes concentraciones de microorganismos patógenos, como bacterias, protozoos y virus entéricos. Los virus entéricos pueden causar infecciones severas en el ser humano cuando este entra en contacto con agua o alimentos contaminados, como por ejemplo, actividades relacionadas con el uso de agua con fines recreativos (lagos, ríos, aguas costeras), alimentos lavados o regados con aguas contaminadas y/o aguas subterráneas contaminadas, etc. Para que los funcionarios responsables en salud pública puedan tomar las medidas sanitarias adecuadas, se deben generar datos e información válida de la presencia de estos patógenos en el medio ambiente.

Estudios realizados en el oriente y occidente de Guatemala por el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, menciona que cerca del 95 % del medio ambiente acuático de estas zonas está contaminado. En 2005 un balance realizado por las autoridades sanitarias mostraron que la cantidad agua nacional contaminada, era mayor que el agua para el consumo humano. En 31 años, desde 1970 al 2001, se triplicó el caudal de aguas residuales. En 2006 un estudio de SEGEPLAN menciona que cerca 1,660 millones de metros cúbicos de agua se contaminaba anualmente y que la proyección para el 2025 bajo las actuales circunstancias sería de 3,660 millones de metros cúbicos. En Guatemala, un 39 por ciento de hogares no dedican tratamiento alguno al agua, especialmente en las zonas rurales.

Los objetivos del presente proyecto abarcan el establecimiento de protocolos para la detección de virus entéricos presentes en agua residual, ríos, lagos y agua de mar que frecuentemente se utiliza con fines recreativos por la población. Estos protocolos incluyeron una metodología completa, desde la toma de la muestra, la concentración, detección y cuantificación de los virus a través de ensayos de biología molecular. Entre los resultados también se encuentra el primer análisis filogenético de los adenovirus humanos presente en agua fecalmente contaminada en Guatemala. Las metodologías empleadas fueron validadas en ensayos inter- e intra- laboratorio, conjuntamente con el laboratorio de la contraparte de Barcelona, así como también los análisis filogenéticos.

SUMMARY

The discharges of wastewater from urban areas and the industry represent the principal source of fecal contamination for the environment. Between these contaminants are high concentrations of bacteria, protozoa and enteric viruses. Enteric viruses may cause important infections in humans by the contact or consumption of fecal contaminated water and food, respectively. In order to improve the sanitary conditions of fecal contaminate water, it is necessary to provide to public health officers with real information about the presence of enteric viruses.

According to studies of the Guatemalan Ministry of Environment and Natural Resources, 95 % of water from eastern and western of Guatemala is contaminated. National studies reported that from 1970 to 2001 the flow of wastewater was triplicated. The estimation of SEGEPLAN under the current conditions is that 3,660 million cubic meters of water will be contaminated in 2025 (in 2006 1,660 million cubic meters were contaminated). In Guatemala, 39 percent of households do not spend any water treatment, especially in rural areas.

The objectives of the project included the implementation of protocols for the detection of viruses in wastewater and recreational water. These protocols describe the sampling process, as well as the concentration, detection and quantitation of the viruses using state of the art molecular biology. Furthermore here reported the first phylogenetic data of human adenoviruses present in fecal contaminated water in Guatemala. The analysis of results and the validation of methodologies in inter- and intra laboratory assays were performed together to partners in Barcelona.

INDICE

PORTADA	
AGRADECIMIENTOS AL CONCYT	
RESUMEN	i
SUMARY	ii
PARTE I	
I.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 MARCO TEORICO	3
I.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.3.1 Antecedentes en Guatemala	16
1.3.2 Justificación del trabajo de investigación	19
I.4 OBJETIVOS	
I.4.1 General	20
I.4.2 Específicos	20
I.5 MATERIALES Y MÉTODOS	21
I.5.1 Localización	21
I.5.2 Reclutamiento	21
I.5.3 Recolección de Muestra	22
I.5.4 Número de muestras	22
I.5.5 Análisis de laboratorio	23
I.5.6 Ficha Recolección de Datos	23
I.5.7 Metodología	23
PARTE II	
II.1 RESULTADOS	46
II.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	74
PARTE III	
III.1 CONCLUSIONES	77
III.2 RECOMENDACIONES	78
III.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
III.4 ANEXOS	91
PARTE IV	
IV.1 INFORME FINANCIERO	95

PARTE I

I.1 INTRODUCCION:

La calidad del agua y por lo tanto la salud humana pueden verse afectadas por la presencia de microorganismos entéricos patógenos, producto del vertido de aguas residuales al medio ambiente. Este tipo de contaminación causa importantes problemas en la salud pública y en el medio ambiente especialmente en países pobres y en vías de desarrollo. Los conocimientos del papel del agua en la ecología y la transmisión de estos agentes patógenos en el medio ambiente varía; el papel de los virus entéricos es menos conocida que otros microorganismos como las bacterias y los protozoos, sin embargo en los últimos años se han venido realizando diversos estudios para entender el comportamiento de los virus en el medio ambiente. (Calgua B et al-2011).

Las aguas negras es la fuente más importante de patógenos que entran en el medio ambiente, especialmente los virus que muestran una alta estabilidad en las condiciones ambientales. Aunque las aguas residuales de las zonas urbanas, hospitales y mataderos es usualmente tratada antes de ser liberado en el medio ambiente, varios estudios han documentado la presencia de virus patógenos en el agua tratada (Gantzer et al., 1998; Pusch et al, 2005; van den Berg et al., 2005; Bofill-Mas et al., 2006; Fumian et al., 2010).

Los grupos de virus entéricos comúnmente estudiados pertenecen a las familias, *Picornaviridae* (enterovirus, coxsakievirus, echovirus, virus de la hepatitis A, etc.), *Adenoviridae* (adenovirus), *Calciviridae* (norovirus), *Astroviridae* (astrovirus), *Reoviridae* (rotavirus). Dentro de los virus entéricos también hay un grupo considerado como virus emergentes, que debido a sus características estructurales y celulares éstos pueden ser altamente estables a los actuales tratamientos relacionados al saneamiento de las aguas. Entre estos virus se encuentran los circovirus (torque tenovirus; virus no envueltos con ADN circular de simple cadena y resistentes a inactivación por calor), *Picobirnaviridae* (virus no envueltos pequeños con ARN bisegmentado de doble cadena, son altamente resistentes a la inactivación por ultravioleta), parvovirus (los virus entéricos más pequeños, tienen ARN de simple cadena y son resistentes a la inactivación por calor) y *Poliomaviridae* (JC y BK, son virus no envueltos de ADN de doble cadena y altamente estables a las condiciones del medio ambiente, recientemente se han descrito nuevos poliomavirus en humanos KI WU y Merkel cell que también se han detectado en muestras del medio ambiente.(Tesis Doctoral Byron Calgua)

Aunque las infecciones por virus entéricos están asociadas con cuadros de diarrea y gastroenteritis, estos también pueden causar infecciones respiratorias, conjuntivitis, hepatitis, y enfermedades con altos niveles de mortalidad, por ejemplo meningitis,

encefalitis y parálisis en individuos inmunocomprometidos. Además, algunos virus entéricos están asociados con enfermedades crónicas como miocarditis.

Los virus entéricos pueden ser transmitidos por comida, agua, fómites y contacto humano. Además de causar enfermedades agudas, estos virus son de gran preocupación para las autoridades de salud pública, debido a que con una baja dosis es suficiente para producir infecciones. Los virus entéricos son reconocidos como los principales agentes responsables de los casos de gastroenteritis no bacterianas. Los virus entéricos han sido aislados y asociados a brotes de gastroenteritis en aguas contaminadas, aguas recreacionales, ríos urbanos, y frutos del mar cultivados en aguas contaminadas. (Rodríguez-Manzano J et al 2012)

Los análisis para detectar la presencia de virus entéricos en muestras de agua, usualmente son proceso de dos etapas. Debido a que los virus se encuentran en bajas concentraciones para ser detectados directamente, la muestra debe ser procesada para concentrar éstos en un volumen mucho menor, usualmente menos de 10 mL. A partir de este volumen existen una variedad de métodos para detectar la presencia de los virus ya sea por métodos moleculares como la PCR o la PCR cuantitativa, o por métodos basado en técnicas de cultivo celular.(Calgua B, et al 2013)

Entre los objetivos de este proyecto se encontraba el establecimiento de protocolos para la concentración y detección de virus patógenos en agua de uso y consumo humano, en lagos, ríos y mar, por lo tanto se describe una metodología previamente descrita para concentrar virus presentes en 10 litros de agua de mar, río y lago. La metodología implementada, fue validada en un ensayo inter- e intralaboratorio, con el Laboratorio de agua y Alimentos de la Universidad de Barcelona, el presente proyecto, aporta secuencias de Adenovirus Humanos en Guatemala.

1.1.1 Palabras Claves:

- Virus entéricos
- Medio acuático
- Agua residual
- Métodos de concentración
- Agua de uso y consumo humano

I.2 MARCO TEORICO

LOS VIRUS, CONTAMINANTES AMBIENTALES

Las aguas residuales son la principal fuente de microorganismos patógenos que se transmiten a través del ambiente y que llegan a la población especialmente a través de la contaminación del agua usada para beber, agua utilizada en cultivos de vegetales o en cultivos de moluscos bivalvos, en la preparación de comida, en el baño o en los diversos usos recreativos. El tratamiento actualmente aplicado a las aguas residuales procesadas por métodos biológicos y físico-químicos ha reducido significativamente la incidencia de enfermedades entre la población, especialmente las de etiología bacteriana, sin embargo los protozoos y los virus son más resistentes que las bacterias a muchos de estos tratamientos.

Los virus han demostrado además presentar una mayor estabilidad en el ambiente que los indicadores bacterianos comúnmente utilizados para evaluar la contaminación fecal. La contaminación del medio ambiente a partir de aguas residuales se confirma al analizar la presencia de virus en aguas superficiales de ríos y lagos (actualmente la contaminación fecal solo se confirma por indicadores bacterianos) eso hay que modificarlo, en lo que detectamos altos porcentajes de muestras positivas al analizar de 1-4 litros de muestra, y en los frecuentes casos de infecciones virales asociados al consumo de moluscos bivalvos que se observan cada año en países industrializados. Los virus entéricos en agua pueden permanecer estables durante meses o incluso más tiempo si están asociados a sólidos y pueden acumularse en sedimentos donde persistirán durante más tiempo y desde donde pueden resuspenderse en la columna de agua por diversos procesos naturales como lluvias fuertes, o por procesos artificiales, facilitando la diseminación viral.

Se ha observado en algunos casos que los estándares de calidad microbiológica actuales (*E. coli* y enterococos fecales) no garantizan la ausencia de virus. En diferentes estudios se han aislado virus en agua de bebida, aguas superficiales, agua de mar o moluscos bivalvos que cumplen los estándares actuales de índices bacterianos. En la actual normativa y desde 2008 aproximadamente no hay virus. En estudios en agua recreacionales se ha observado que la presencia de enterovirus no se relaciona con la presencia de otros virus patógenos y se ha sugerido la utilización de adenovirus humanos como indicador de contaminación viral de origen humano. Entre los virus transmitidos por agua contaminada se encuentran principalmente los virus entéricos (Tabla 1) Entre los más relevantes y frecuentemente reportados en agua contaminada se encuentran los miembros de las familias, *Adenoviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae* y *Reoviridae* (Hamza et al, 2011; Rodríguez-Lázaro et al, 2012; Wong et al, 2012). Las enfermedades gastrointestinales son el principal padecimiento negativo para la salud, producida por estos virus, aunque ellos también son responsables de infecciones respiratorias, conjuntivitis,

hepatitis, enfermedades del sistema nervioso central e infecciones crónicas (Byron Calgua, Nuevas metodologías para el estudio de virus humanos contaminantes del medio ambiente, tesis doctoral)

Tabla 1

Virus humanos transmitidos potencialmente por agua contaminada. Modificado a partir de Hamza et al., 2011

Familia	Genero	Principales enfermedades
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus (human adenovirus 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>Polyomaviridae</i>	Polyomavirus (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>Picobimaviridae</i>	Picobimavirus (Picobimavirus humano)	Gastroenteritis
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Gastroenteritis y enfermedades respiratorias
<i>Papillomaviridae</i>	Papillomavirus	Las verrugas genitales y cutáneas, cáncer cervical, otros tipos de cáncer menos comunes

En los últimos años, se han reportado nuevos virus humanos patógenos, en agua contaminada. Bofill-mas et al, 2010 describió la presencia de los polyomavirus como parte del viroma de la piel (Wieland et. Al 2009; Schowalter et al, 2010; Moens et al, 2011; Foulongne et al, 2012; Spurgeon y Lambert, 2013) sugiriendo que la principal vía de transmisión es a través del contacto con la piel y el agua contaminada. El nuevo picornavirus salivirus/klassevirus asociado a gastroenteritis también se ha descrito en agua residual (Holtz et a., 2009; haramoto et al, 2013). Entre los virus recientemente descritos existe un asfavirus-like asociado a pacientes con enfermedades febriles que también se ha detectado en agua residual (Loh et al, 2009). Este virus sería el primer miembro de la familia Asfaviridae potencialmente asociado a humano. Además se han reportado cepas y variantes emergentes de virus conocidos como los rotavirus, norovirus y adenovirus (Vega y Vinjé, 2011; Komoto et al, 2013, Robinson et al, 2013).

Adenovirus humanos

Los adenovirus constituyen la familia *Adenoviridae*. Los miembros de esta familia son virus no envueltos, con una estructura icosaédrica y un genoma DNA lineal no segmentado de doble cadena. Los adenovirus tienen un diámetro de entre 60-90 nm y un genoma de 30-38 kb que teóricamente codifica a 13 polipéptidos estructurales y 35 proteínas no estructurales. El genoma presenta una proteína de 55 kDa unida covalentemente al extremo 5' de cada una de las cadenas y también secuencias repetidas e invertidas de 100-140 pb en los extremos terminales.

La entrada de los adenovirus a la célula es a través de un proceso de endocitosis activado en dos etapas; interacciones entre la proteína fibra con varios receptores celulares, entre ellos el receptor coxsackievirus-adenovirus (CAR), y la internalización a través de vías de endocitosis mediada por interacciones entre receptores celulares (integrinas) y proteínas víricas (pentonas). El endosoma posteriormente es roto debido a cambios en el pH interno y en la carga neta de la cápside vírica, esto permite que el virión sea liberado al citoplasma y transportado para que el core del virión entre al núcleo celular. La transcripción, replicación y maduración de los adenovirus ocurre en el núcleo celular. El ciclo lítico de los genes víricos es un proceso organizado en tres fases nombradas según el momento en que estas son expresadas (Figura 2). En la fase temprana, cinco unidades de transcripción codifican para las proteínas E1A, E1B, E2, E3 y E4, durante la fase intermedia se codifican las proteínas IVa2 y pIX y en la fase tardía se codifican las proteínas L1, L2, L3, L4 y L5. La principal función de las proteínas de la fase temprana es forzar a la célula a entrar a la fase S con el objetivo de promover las condiciones óptimas para la replicación del DNA vírico y suprimir la respuesta antiviral del huésped. Las proteínas de la fase intermedia intervienen en la estabilización de la estructura de la cápside. Mientras que las proteínas de la fase tardía son las proteínas estructurales de las nuevas partículas víricas.

La familia Adenoviridae actualmente agrupa a 5 géneros diferentes que infectan a los humanos y a un amplio número de especies animales: Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus y Siadenovirus (International Committee on Taxonomy of Viruses, Versión vigente 2012). Los adenovirus humanos (HAdV) pertenecen al género Mastadenovirus. Actualmente hay más de 60 tipos de HAdV, agrupados en 7 especies diferentes (A-G), siendo los HAdV D la especie con más miembros (Robinson et al., 2013).

Las principales enfermedades producidas por HAdV van desde, gastroenteritis (HAdV F), infecciones respiratorias (principalmente HAdV B y C) y conjuntivitis (HAdV B y D). Sin embargo estos virus también pueden causar otras enfermedades como, cistitis, encefalitis y meningitis. Los HAdV también se han relacionado con algunas transmisiones de primates a humanos (Wevers et al, 2011) y también se ha especulado como posible causa de obesidad (Esposito et al. 2012).

Las infecciones por HAdV están extendidas en toda la población en general. Aproximadamente el 60% de las infecciones por HAdV se produce en niños menores de 4 años. El 47-55% de las infecciones pueden ser asintomáticas. Se cree que los HAdV son responsables del 5-10% de las infecciones respiratorias en niños. Después de infecciones agudas por los HAdV, estos se pueden secretar a través de las

heces durante meses e incluso años, siendo este hecho probablemente el principal responsable de la diseminación endémica de HAdV a través de la ruta fecal – oral y respiratoria (Carter, 2005). Además algunas infecciones pueden persistir en algunos tejidos en fase latente, como ejemplo adenoides, tracto intestinal urinario (Carter, 2005).

Los HAdV son detectados frecuentemente en agua fecalmente contaminada y también han sido identificados en moluscos bivalvos (Pina et al. 1998; Formiga-Cruz et al., 2002; Carter, 2005). Los HAdV se han reportado consistentemente en casi el 100% de muestras de agua residual de diferentes zonas geográficas analizadas (Bofill-Mas et al., 2000; Fumian et, 2013) También se han detectado HAdV en agua de río, lago y mar (Puig et al., 1994; Pina et al. 1998; Albinana-Gimenez et al, 2009; Wyn-Jones et al., 2011; Vieira et al., 2012). La elevada prevalencia y estabilidad de los HAdV, así como su origen humano, sugieren que estos virus pueden ser utilizados como indicadores de la presencia de virus entéricos en el medio ambiente (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2000; McQuaig et al., 2006; Miagostovich et al., 2008; Wyn Jones et al., 2011; Vieira et al., 2012).

Polyomavirus JC

Los polyomavirus son el único género de la familia Polyomaviridae, sin embargo, recientemente el Grupo de Estudio de los Polyomavirus en el comité Internacional para la Taxonomía de Virus (Johne et al, 2011), ha propuesto tres géneros más que incluyan a los polyomavirus de mamíferos (Orthopolyomavirus y Wukipolyomavirus) y otro de aves (Avipolyomavirus). Los miembros de esta familia son virus no envueltos de un diámetro de 40-45 nm, con una estructura icosaédrica y un genoma ADN circular de doble cadena de aproximadamente 5,000 pb que se encuentra súper enrollado a 4 histonas de origen celular (H2A, H2B, H3 y H4).

Los polyomavirus incluyen diferentes especies que pueden infectar una gran variedad de vertebrados; aves, roedores, vacunos, simios y humanos. A pesar de que los polyomavirus tienen una estructura y organización genética muy conservada, estos virus tienen una estrecha especificidad de huésped y celular, lo cual está determinado a nivel extracelular, por la ausencia/presencia de receptores específicos y a nivel intracelular, por la presencia/ausencia de factores celulares que permiten coordinar la expresión de los genes víricos y la viabilidad del ciclo de infección vírico (Dalianis y Hirsch, 2013).

La familia Polyomaviridae actualmente agrupa a 11 especies de polyomavirus humanos (Tabla 2), de los cuales 6 han sido descubiertos en los últimos 6 años (DeCaprio y Garcea, 2013). En 1971 los polyomavirus BK y JC fueron los primeros polyomavirus humanos descritos. BK fue aislado a partir de la orina de una paciente trasplantado de riñón, mientras que JC fue identificado como el agente causal de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), una enfermedad extraña de desmielinización asociada con afecciones en el sistema inmune. Se considera que los polyomavirus después de una infección primaria, pueden producir infecciones persistentes o latentes asintomáticas con niveles bajos de replicación y de forma permanente. La infección por el polyomavirus JC (JCV), puede reactivarse de su fase latente y manifestar síntomas de PML. Este es un proceso complejo y requiere: (1) de una disminución o cambios en el sistema inmune, (ii) un reordenamiento de la región

reguladora de JCPyV para incrementar la replicación vírica, (iii) una movilización de JCP yV producido a partir de la activación de infecciones latentes en el riñón y la medula osea, hacia las células gliales en el cerebro, y (iv) el incremento de activadores transcripcionales y procesos de regulación para la replicación de JCPyV (Major, 2010; Ferenczy, et. Al, 2012). Todos estos procesos pueden ocurrir en algunos casos de inmunosupresión o en terapias que modulan el sistema inmune, por ejemplo en los casos inducidos de este estado en pacientes trasplantados o con tratamientos para la esclerosis múltiple (Major, 2010; Ferenczy, et. Al, 2012; Feltkamp et al, 2013).

Tabla 2
Polyomavirus humanos. Modificado a partir de DeCaprio y Garcea, (2013)

Nombre	Abreviación	Año de descubrimiento	Fuente del aislamiento
BK polyomavirus	BKPyV	1971	Orina
JC polyomavirus	JCPyV	1971	Orina, Cerebro
Karolinska Institute polyomavirus	KIPyV	2007	Nasofaringe
Washington University polyomavirus	WUPyV	2007	Nasofaringe
Merkel cell polyomavirus	MCPyV	2008	Lesión en piel
Human polyomavirus 6	HPyV 6	2010	Piel
Human polyomavirus 7	HPyV 7	2010	Piel
Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV	2010	Lesión en piel
Human polyomavirus 9	HPyV 9	2011	Piel, Sangre, Orina
Malawi polyomavirus	MWPyV	2012	Heces, Verruga
St Louis polyomavirus	STLPyV	2012	Heces

Virus nuevos recientemente descritos

Polyomavirus KI, WU y de Merkel cell

Desde al año 2005 un total de 9 nuevos polyomavirus humanos se han descrito (Tabla 2). Entre estos se encuentran los polyomavirus KI (KIPyV) y WU (WUPyV), aislados a partir de muestras de la nasofaringe en el 2007 por investigadores del Karolinska Institute y Washington University, respectivamente (Allander et al. 2007; Gaynor et al, 2007). La seroprevalencia de estos virus varía entre 55 a 90% para KI y entre 64 a 97.5% para WU. El tejido específico de KI y WU no se ha establecido aun, no obstante el ADN vírico se ha detectado en sangre, cerebro, sistema nervioso central, pulmón y amígdalas (Van Ghelue et al., 2012; Dalianis y Hirsch, 2013; DeCaprio y Garcea, 2013; Feltkamp et al., 2013). A la fecha KIP yV y Wupyv no se han asociado con una enfermedad específica o síntoma, aunque secuencias de ambos virus se han detectado en cánceres de pulmón y linfomas (Van Ghelue et al., 2012; Dalianis y Hirsch, 2013; DeCaprio y Garcea, 2013). Ambos virus se detectan regularmente en muestras del tracto respiratorio, pero no hay una correlación clara entre KI y WU y una infección respiratoria, por lo general estos virus se han detectado junto a otros virus conocidos.

En el año 2008 Feng y colaboradores describieron la presencia de secuencias víricas en cuatro carcinomas de las células de Merkel (MCC). Los análisis posteriores de estas secuencias víricas mostraron que estas codificaban para un polyomavirus que posteriormente se le nombre como polyomavirus de las células de Merkel (MCPyV). El MCC es un extraño tumor de piel neuroendocrino observado principalmente en personas mayores o pacientes inmunosuprimidos. La prevalencia de MCPyV en MCC es del 40 al 100%. En varias muestras de MCC positivas para MCPyV, el ADN vírico estaba integrado en el genoma de las células del tumor con un patrón idéntico, sugiriendo que la infección por MCPyV y la integración del genoma precedieron a la expansión de la metástasis del cáncer. (Spurgeon y Lambert, 2013). Partículas víricas y ADN de MCPyV han sido ampliamente detectados en muestras de piel. Lo que refuerza la idea de que este virus sea parte de la microflora normal de la piel. De hecho los eventos iniciales de la replicación de MCPyV se ha visto que ocurren en keratinocitos primarios, los cuales son un tipo de células prominentes de la piel y otros epitelios estratificados (Schowalter et al., 2011, Spurgeon y Lambert, 2013). Se ha reportado que un 80% de la población adulta contiene anticuerpos contra MCPyV, por otro lado no se han detectado anticuerpos en muestras prenatales, pero sí en infantes durante la primera década de vida, aumentando la seroprevalencia con la edad (Spurgeon y Lambert, 2013). No obstante en estas muestras las concentraciones son notablemente bajas cuando se comparan con las cantidades detectadas en la piel (Spurgeon y Lambert, 2013).

No se ha establecido una ruta de transmisión para los polyomavirus KI, WU y MC, pero los datos disponibles proponen varias posibilidades. La presencia de estos virus en el tracto gastrointestinal y en agua residual sugieren que una ruta puede ser fecal oral (Bofill-Mas et al., 2010; Loyo et al., 2010; Campello et al., 2011), mientras que la presencia en el tracto aereodigestivo supone una vía respiratoria (Spurgeon y Lambert, 2013). En el caso de MCPyV se ha sugerido que se excreta crónicamente a través de la piel en grandes concentraciones y que puede persistir en varias superficies, además los resultados que indican que la diferenciación celular de la piel está relacionada con el ciclo del virus, hacen considerar una ruta de transmisión cutánea (Spurgeon y Lambert, 2013).

Salivirus / Klassevirus

Salivirus (*por stool Aichi-like*) es un nuevo miembro de la familia *Picornaviridae* descrito en el año 2009 en Nigeria en heces de infantes con parálisis flácida negativa para Poliovirus (Li et al., 2009). Paralelamente en el 2009, klassevirus (por koku-like viruses associated with stool and sewage), otro picornavirus es descrito en heces de infantes con gastroenteritis en dos estudios diferentes con muestras de los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) y Australia y en agua residual de Barcelona (Greninger et al., 2009; Holtz et al 2009). Genéticamente, salivirus y klassevirus son virus idénticos y de acuerdo con el Grupo Internacional de Estudio de los Picornavirus del Comité Internacional para la Taxonomía de los virus, a partir de febrero del 2013 ambos virus están clasificados dentro del nuevo género *Salivirus*.

Los salivirus como miembros de la familia *Picornaviridae*, son virus no envueltos icosaédricos de 30nm, con un genoma RNA de simple cadena de polaridad positiva de 7-9 kb. El genoma contiene en ambos extremos una región no traducible (UTR), siendo ésta mucho mayor en el 5', el extremo 3' además contiene una región poliadenilada. El extremo 5' está unido covalentemente a una proteína vírica (VPg). El

genoma da lugar a una poliproteína que es proteolíticamente procesada en diferentes proteínas víricas estructurales (1A-1D o VP1-VP4) y no estructurales (2A-2C y 3A-3D).

Los salivirus / klassevirus se han asociado a gastroenteritis víricas, detectándose en muestras de heces de diferentes regiones; Australia, China, EEUU (California, Minnesota y San Louis), Corea del Sur, Nigeria, Nepal y Dinamarca (Greninger et al., 2009, Holtz et al., 2009); Li et al., 2009; Shan et al., 2010; Han et al., 2012; Nielsen et al., 2013). También se han detectado en Túnez y Nigeria en heces de pacientes con parálisis flácida negativas para Poliovirus, (Li et al., 2009). La seroprevalencia de estos virus fue del 6.8% de 353 pacientes analizados (Greninger et al., 2010).

En muestras ambientales salivirus / Klassevirus se detectó por primera vez en muestras de agua residual de Barcelona a través de ensayos de PCR convencional (Holtz et al., 2009). También se han detectado por secuenciación en masa usando la plataforma 454 Titanium en muestras de agua residual de Nepal (Ng et al., 2012). Interesantemente en otro estudio empleando también secuenciación en masa pero con la plataforma Illumina HiSeq 2000, se reportó salivirus / Klassevirus como el virus RNA más abundante en muestras de agua residual de diferentes zonas de EEUU (Bibby y Peccia, 2013). Recientemente Haramoto et al. (2013) describieron un ensayo de RT-qPCR para estos virus, reportando 93% (13 muestras) y 16% (9 muestras) de muestras de agua residual y río positivas en Japón y en concentraciones máximas de 9.7×10 copias de genomas por mL de muestras

Calidad Microbiológica de ríos, lagos y agua costera.

Los ríos, lagos y agua costera pueden emplearse con fines recreativos por la población humana, por esta razón estos tipos de agua pueden clasificarse como agua de baño. En la actualidad, en algunos países o regiones existen legislaciones que regulan la calidad microbiológica del agua de baño (WHO, 2003; USEPA, 2004; 2006/160/EC). La actual directiva de la comisión europea, describe el uso de indicadores bacterianos para la evaluación microbiológica del agua, concretamente las bacterias E.coli (EC) y los enterococos intestinales (EI). Indiscutiblemente, el cambio en lo referente a los análisis bacterianos, refleja los avances científicos que se han logrado en años recientes, obteniendo una base y resultados científicos más firmes (Kay et al., 1994 y Kay et al., 2004; Wiedenmann et al., 2006). La directiva vigente no incluye el análisis para la detección de un indicador vírico de contaminación fecal humana. Existen varios datos que confirman que muestras de agua recreacional consideradas aptas para baño según los valores establecidos para los indicadores bacterianos, contenían valores altos de virus entéricos humanos y que por lo tanto estos indicadores estándar suelen fallar en la predicción del riesgo de patógenos transmitidos por el agua, incluyendo los virus entéricos (Gerba et. Al., 1979 y Lipp et al., 2001). Además, se ha reportado que los niveles de indicadores bacterianos no se correlacionan con los virus, especialmente cuando los indicadores estándar se encuentran en concentraciones bajas (Contreras-coll et al., 2002). También se han obtenido resultados que indican que los virus, en comparación con las bacterias, son notablemente más resistentes a las condiciones del medio ambiente (Thurston-Enriquez et al., 2003, Rzezutka y Cook, 2004 y de Roda husman et al., 2009). Los virus entéricos han sido frecuentemente asociados a gastroenteritis adquiridas con el uso de agua recreacional (Sinclair et al., 2009). Varios estudios en Europa y EE.UU

sugieren que estas infecciones se pueden adquirir como resultado de actividades como el canotaje, nado u otro uso recreacional del agua (Medema et al., 1995 y Gray et al., 1997). Varios brotes de enfermedades asociadas con virus entéricos, como los norovirus y astrovirus, en aguas recreacionales han sido ampliamente descritas, sin embargo estos tipos de brotes fácilmente pasan desapercibidos por las autoridades sanitarias, principalmente porque no se logra definir el origen ni el agente causal.

Además de los indicadores bacterianos estándar, una nueva generación de indicadores víricos de contaminación fecal es necesaria. Como virus candidatos de indicadores víricos de contaminación fecal es necesaria. Como virus candidatos de indicadores virales se ha propuesto los adenovirus humanos y los polyomavirus JC (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2000; McQuaig et al., 2006; Miagostovich et al., 2008; Wyn –Jones et al., 2011, Vieira et al., 2012). Estos virus son considerablemente estables en el medio ambiente y excretados por las heces y/u orina específicamente por humanos, los cuales en la mayoría de los casos no presentan síntomas de infección (Enriquez eta l., 1995; Thurston-Enriquez et al., 2003). Además en varios estudios, ambos virus se han detectado en agua fecalmente contaminada.

Los sitios de baño se pueden clasificar como agua de Calidad Excelente, Buena, Suficiente o Insuficiente (Tabla 3)

Tabla 3 Parámetros obligatorios y valores para la clasificación del agua de baño

Agua continental				
Calidad				
	Suficiente**	Buena*	Excelente*	Unidad
Enterocos intestinales	330	400	200	UFC o NMP/ mL
<i>E. coli</i>	900	1000	500	
Agua costera y de transición				
Enterocos intestinales	185	200	100	UFC o NMP/ mL
<i>E. coli</i>	500	500	250	

*Con arreglo a la evaluación del percentil 95. **Con arreglo a la evaluación del percentil 90. Tabla modificada a partir del Real Decreto 1341/2007.

Legislación sobre el agua en Guatemala

Guatemala no posee una administración nacional del agua ni cuenta aún con un marco jurídico que le permita la administración del recurso, su aprovechamiento y conservación. La Ley de aguas, aún no ha sido aprobada y la falta de información o consenso con las comunidades provocan enfrentamientos por regular el agua. A principios de 2005, se aprobó como iniciativa de ley, la Ley General del Agua, la cual establecía la creación de una institución que se encargaría de la administración del recurso hídrico en el país, sin embargo, al no haber existido consenso con diferentes comunidades indígenas del occidente del país, la ley fue rechazada en manifestaciones populares previo a su promulgación que estaba programada para mayo de 2005. En la actualidad se está tratando de lograr el consenso con diferentes sectores, organizaciones no gubernamentales y especialmente con comunidades

indígenas que por siglos han manejado el recurso hídrico localmente y conservado sus fuentes de agua (Oliva Hernández, 2006).

METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA DETECCIÓN DE VIRUS EN AGUA

Los virus humanos presentes en el medio ambiente, frecuentemente se encuentran en bajas concentraciones, especialmente en agua de mar, río y lago. Por esta razón grandes cantidades de esta agua deben ser tratadas para concentrar los virus en un volumen mucho menor. Generalmente para el análisis de virus en agua de baño, los virus presentes en muestras de 10L son concentrados en un volumen final de 10 ml y habitualmente a partir de este concentrado vírico se pueden hacer análisis directos en cultivo celular o extracciones de ADN/ARN vírico para posteriores análisis moleculares. Los protocolos para concentrar estos virus son muy diversos ya través del tiempo estos han ido evolucionando con la principal finalidad de ser más eficientes y sencillos (Tabla 4)

Los virus tienen carga neta y por lo tanto polaridad, debido a esta característica los virus pueden absorberse a diferentes matrices cargadas. Además los virus se pueden considerar partículas proteicas y por lo tanto tienen una masa molecular relativa ($M_r > 10^6$), esto permite concentrarlos por procesos de ultrafiltración o ultracentrifugación.

Basado en estas dos características generales, se han desarrollado una gran variedad de métodos para concentrar virus presentes en agua. De acuerdo con Block y Schwartzbrod, (1989) cualquier método debe cumplir con los siguientes criterios:

- 1) Debe ser técnicamente fácil de realizar y en corto tiempo
- 2) Debe recuperar grandes cantidades de virus
- 3) Debe concentrar varios tipos de virus
- 4) Debe tener un radio de concentración elevado
- 5) No debe ser costoso
- 6) Debe concentrar grandes volúmenes de muestra
- 7) Debe ser repetible (dentro de un laboratorio) y reproducible (entre laboratorios)

Esta metodología, debe permitir concentrar virus infecciosos para poder evaluar si los virus en el medio ambiente realmente permanecen estables y representan un riesgo para la salud humana. Así mismo, dicha metodología debe ser diseñada para evitar concentrar grandes cantidades de compuestos que inhiban o afecte los análisis moleculares o de cultivo celular para la detección de los virus. A pesar de todas estas recomendaciones, actualmente no hay un método que cumpla con todos estos requerimientos. Existen tres principales enfoques para la concentración de virus en Guam estos se han empleado durante varios años y también se han ido modificando o incluso combinándose para mejorar la eficiencia en general (Tabla 4).

El control virológico del medio ambiente es un proceso complejo debido a la dificultad de identificar concentraciones normalmente pequeñas de virus diversos pertenecientes a diferentes familias y que están dispersos en grandes volúmenes de agua, biosólidos o en otro tipo de muestras ambientales. La aplicación de la (RT)-PCR, ha permitido identificar el papel de los norovirus como principales causantes de

gastroenteritis relacionadas con brotes alimentarios, o detectar la gran cantidad de virus de la hepatitis A (VHA) excretados incluso en países que ya no se consideran endémicos para esta enfermedad. Por ejemplo en el agua residual urbana de Barcelona, España, se detecta VHA en un 57.4% de las muestras. Se han identificado también adenovirus y polyomavirus entre los virus más abundantes de los regularmente detectados en aguas residuales y se ha identificado el virus de la hepatitis E como un virus emergente que previamente se consideraba que existía únicamente en otras áreas geográficas consideradas endémicas.

La mayor parte de virus que se transmiten por la vía oral-fecal no tienen envuelta lipídica y son relativamente resistentes al calor, la desinfección y los cambios de pH. En la actualidad no se dispone de métodos estandarizados de detección de virus en agua o alimentos y esta metodología no se aplica de forma rutinaria en los laboratorios de Microbiología. Las técnicas utilizadas para la obtención de los datos descritos por estos autores sobre adenovirus, enterovirus, norovirus, virus de la hepatitis A y E y poliomavirus en el ambiente se han desarrollado a lo largo de diversos trabajos y se basan en la concentración de virus a partir de diversos volúmenes de aguas superficiales, mediante filtros electropositivos (Zeta-plus; CUNO) según el método descrito por Sobsey y Jones. En agua de mar los virus se concentraron usando un método modificado de filtración a través de membranas de nitrato y acetato de celulosa descrito por Sinton et al.

A partir del concentrado o directamente de agua residual, de biosólidos o del homogenizado de moluscos bivalvos, los virus son eluidos de la materia orgánica mediante tampón glicina.

Tabla 4

Principales procedimientos para concentrar virus en agua. Modificado a partir de Wyn-jones y Sellwood, 2011

Técnica	Metodología	Segundo paso de concentración	Volumen (L)
Adsorción/Elución	Membranas electronegativas	Si	1-10
	Membranas electropositivas	Si	1-10
	Cartuchos electropositivos	Si	1-50
	Lana de vidrio	Si	1-1000
Ultrafiltración	Ultrafiltros	Algunas veces	1-10
	Ultrafiltración tangencial	Algunas veces	1-10
Ultracentrifugación	Ultracentrifugación directa	No	<1
	Ultracentrifugación/Centrifugación/Elución	Si	<1

Método para la concentración y cuantificación de virus

Métodos de concentración

Las aguas residuales urbanas contienen la suficiente concentración de virus que permiten la detección directa, o tras una etapa sencilla de concentración. Pero en ocasiones los virus entéricos se encuentran en el medio acuático en cantidades muy pequeñas, lo que hace necesario la concentración de grandes volúmenes de agua. Este paso constituye uno de los problemas principales de la virología ambiental (Calgua, et al., 2008).

La mayor parte de los métodos de recuperación de virus aprovechan las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Además tienen, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo (Calgua, et al., 2008).

Un buen método de concentración debe ser lo más simple, rápido y barato posible, debe proporcionar altas tasas de recuperación y ser aplicable a la recuperación de diferentes virus. El concentrado viral obtenido debe estar libre de posibles sustancias tóxicas o inhibidores presentes en las muestras, para que pueda ser utilizado en los procesos de detección subsiguientes (Calgua, et al., 2008).

Se han propuesto varios métodos de concentración, aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y a todo tipo de virus. La metodología debe escogerse en función de los diferentes factores:

- La concentración viral, variable según el tipo de agua y el virus de interés.
- El tipo de agua, ya que las variaciones en sus características físico-químicas y en la cantidad de materia orgánica afectan a la capacidad de agregación de lo virus, así como a la eficiencia de algunos métodos (Calgua, 2012).

a. Concentración de virus por floculación orgánica

La floculación orgánica aplicada comúnmente como método de concentración secundaria, se basa en la capacidad que tienen las proteínas para formar flóculos a pHs ácidos. Los virus presentes en solución son atrapados entre los flóculos permitiendo así su recuperación. Se utiliza el extracto de carne, la caseína o la leche descremada en polvo pues se ha descubierto que los virus poseen gran afinidad por este tipo de proteínas. Es una técnica sencilla, económica y rápida, aunque los resultados obtenidos dependen del virus (Calgua, et al., 2008; Lucena, et al., 1991).

La técnica de floculación es más efectiva utilizando como sustrato la leche descremada en polvo pues es mayor la afinidad que los virus presentan al tipo de proteínas que posee la leche. Para lograr la adherencia de los virus a la leche es necesario que esta tenga un pH aproximado a 3.5 y una conductividad igual o mayor a 1.5 mS, para que esta flocule y sea más eficiente el procedimiento (Calgua, et al., 2011; Lucena, et al., 1991).

Se conoce que los virus en el ambiente poseen carga negativa y al modificarse su pH haciéndolo más ácido por debajo de su pH isoeléctrico (pHi), las partículas víricas cambian su carga a positiva, facilitando la unión de estas partículas a los flóculos de la leche (Calgua, et al., 2011; Lucena, et al., 1991).

b. Otros métodos de concentración de virus

i. Concentración de virus por filtración-elución

Los métodos de concentración por adsorción-elución sobre diferentes soportes responden a la capacidad de los virus para asociarse a diferentes materiales: membranas o cartuchos filtrantes, polvo de vidrio, lana de vidrio, sales metálicas, polielectrolitos insolubles, carbón activado. En estas uniones representan un papel fundamental la composición química de los soportes, la fuerza iónica y el pH del medio, y la presencia de materia orgánica en suspensión o proteínas (Lucena, et al., 1991).

ii. Concentración de virus por ultracentrifugación

Basada en la capacidad de los virus de precipitar cuando son sometidos a una fuerza centrífuga. Aplicable solo a pequeños volúmenes de agua, se ha utilizado con éxito para recuperar virus a partir de aguas con gran cantidad de materia orgánica o como método de reconcentración (Puig, et al., 1994).

iii. Concentración de virus por ultrafiltración

La ultrafiltración permite la separación mecánica de las partículas en función de su peso molecular. Se utilizan membranas con un diámetro de poro inferior al tamaño de los virus para permitir su retención. La suspensión vírica puede pasar a través de la membrana perpendicularmente o circular tangencialmente a la superficie. Son métodos de gran sensibilidad aunque el caudal de filtración suele ser pequeño y limitado por la colmatación de los filtros. Se ha aplicado comúnmente en muestras de aguas muy limpias y como método de concentración secundaria (Pina, 2001).

c. Métodos de detección e identificación de virus

En la mayoría de los casos el análisis virológico e identificación, se efectúa después del proceso de concentración de partículas víricas a partir de la muestra. Los sistemas de detección e identificación desarrollados son complejos, económicamente caros y se requiere de personal y equipamientos especializados (Primrose, et al., 2011).

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido la detección e identificación de bajas concentraciones de virus en muestras de diversos orígenes, proporcionando la máxima sensibilidad y especificidad. En la actualidad la mayoría de protocolos de detección e identificación de virus están basados en técnicas moleculares. La utilización de técnicas moleculares no implica la eliminación de la práctica de los métodos tradicionales. Las primeras permiten incrementar la sensibilidad y especificidad, y proporcionan resultados en el menor tiempo posible. Contrariamente, la detección molecular de virus no aporta información sobre viabilidad de las

partículas víricas, características evidenciadas únicamente mediante los estudios de inefectividad frente a células huésped (Primrose, et al., 2011).

NORMATIVAS GUATEMALTECAS REFERENTES A BACTERIAS Y VIRUS EN AGUA.

La legislación Guatemalteca actual, no contempla el parámetro microbiológico de virus en el agua, al hacer referencia a los reglamentos COGUANOR NTG 29001 (Norma Técnica Guatemalteca de Agua para el consumo humano –Agua potable-) y el Reglamento de las Descargas y Reúso de Aguas Residuales y de la Disposición de Lodos (Acuerdo Gubernativo 236-2006).

Lo concerniente al parámetro microbiológico de bacterias, si es regulado por el reglamento y la norma mencionados en el párrafo anterior, siempre referente al agua Potable y al agua residual, como podrá observarse en el siguiente cuadro:

Tipo de Agua Parámetro Microbiológico	Agua Residual	Agua Potable	Agua Envasada
Coliformes Fecales	NMP $<1 \times 10^4$	NA	NA
Coliformes Totales y <i>E. coli</i>	NA	No detectables 100 mL de	NA
<i>Pseudomona Aeruginosa</i>	NA	NA	Ausente

NA: No Aplica.

NMP: Número más probable.

Debe destacarse que para aguas naturales: Ríos, riachuelos, manantiales, Lagos, laguna, Mar, etc., no se cuenta con normativas ni reglamento nacional.

El parámetro de *Pseudomonas*, obedece a la Norma Guatemalteca Obligatoria de Agua Envasada para Consumo Humano –COGUANOR NGO 29005-.

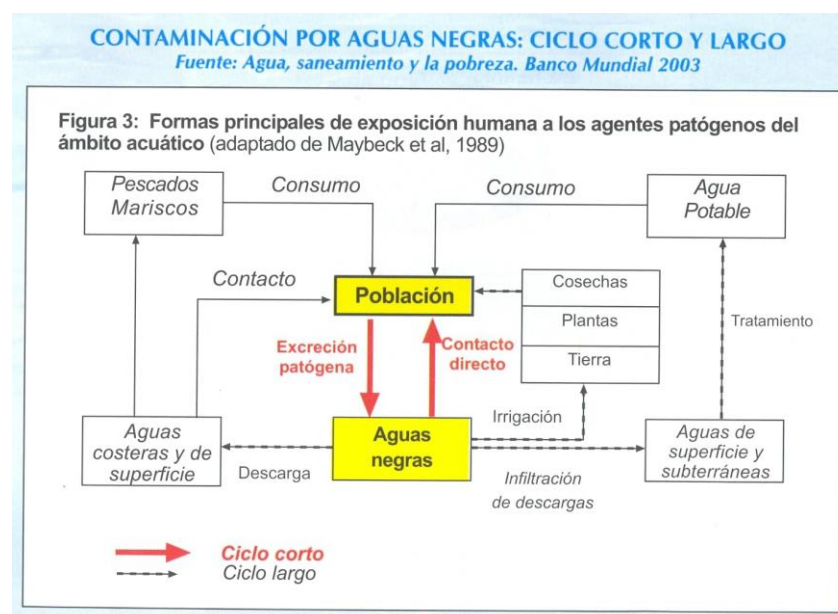
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.3.1 ANTECEDENTES EN GUATEMALA

El agua es un bien natural que se consume diariamente y que no puede sustituirse por otro bien o producto. Es un bien social porque coadyuva al bienestar y la salud individual y colectiva. Es un bien económico porque contribuye al desarrollo personal y de las comunidades. El agua es un bien, pero por sobre todo es un derecho y es un derecho humano inalienable e imprescindible. La relación entre agua potable-saneamiento básico y la salud (enfermedades por contaminación hídrica y muerte por diarrea, son dos variables estrechamente vinculadas, el contagio de enfermedades que se transmiten por el agua se debe a la falta de higiene, principalmente de agua contaminada (de mala calidad) y/o aguas residuales vertidas a ríos y lagos.

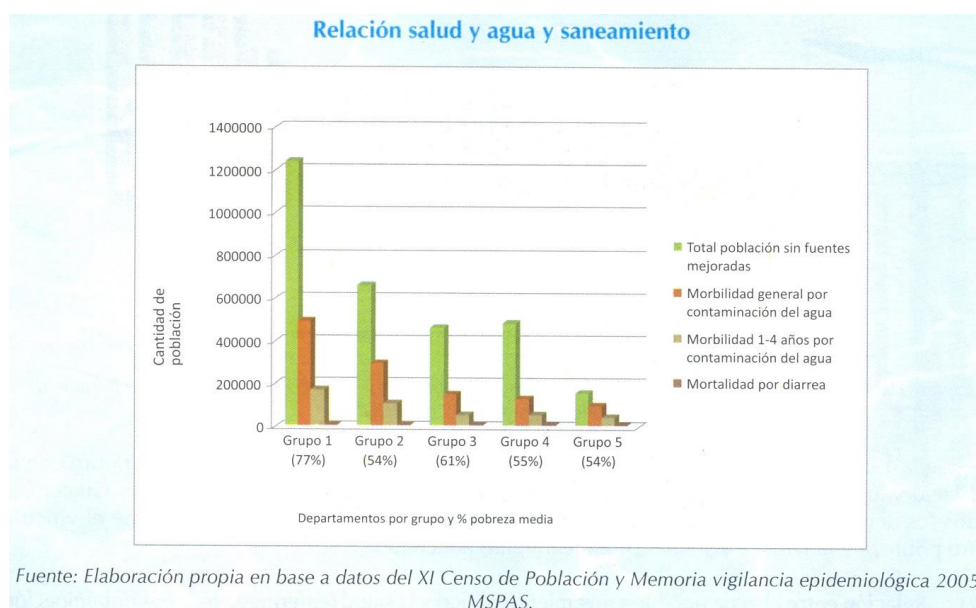
En Guatemala 4 de cada 10 habitantes se ve afectado anualmente por enfermedades causadas por contaminación del agua y malas prácticas higiénicas (.RASGUA 2007). Solo el sistema de salud pública atendió más de un 1.3 millones de casos en el 2005 y de estos a más de medio millón de niños y niñas. El estudio del Banco Mundial “Agua, saneamiento y pobreza” destaca la transmisión a través del ciclo corto (falta de aseo personal) y el ciclo largo (contaminación ambiental).

Figura No.1



Un diagnóstico realizado en el año 2005 por Plan Internacional en 447 comunidades rurales del interior del país de 14 municipios y 6 departamentos, realizado por Plan Internacional: dio como resultado que el 97% del agua para consumo humano estaba contaminada con E. coli, infraestructura de saneamiento sumamente precario a cielo abierto en todas las comunidades, así como aguas residuales sin disposición y malas prácticas higiénicas.(Plan Internacional Mayo 2007, present. Power point). En la gráfica que sigue, se presenta la relación entre enfermedades gastrointestinales por contaminación del agua, a partir de la conformación de grupos de departamentos según la pobreza media que reportan los mismos, agrupados de mayor a menor porcentaje de pobreza media.

Grafica No. 1



La segunda causa de mortalidad general en los departamentos del grupo 1 (San Marcos, Quiché, Huehuetenango, Alta Verapaz y Peten), es la diarrea. Pero para el grupo 5 (Sacatepéquez, Zacapa, Baja Verapaz, Jalapa y el Progreso) en unos no aparece entre las 10 primeras causas y en otros es la sexta causa de mortalidad general. La morbilidad general en 2005, a causa de la contaminación del agua fue en total 1.3 millones y la infantil de 400 mil casos reportados. Para el grupo 1, la morbilidad general fue de 485,758 (38%), la morbilidad de niños y niñas de 165,500 (41%) y la mortalidad de 1-4 años 482 el 51% del total. Es evidente que contar con agua potable de buena calidad y servicios sanitarios adecuados reduce las enfermedades transmisibles especialmente la diarrea.

La relación que existe entre la población que carece de servicios, principalmente agua potable, está fuertemente asociada con el número de casos reportados de enfermedades gastrointestinales (diarreas, amebiasis, parásitos etc.) y otras de transmisión de la piel y por vectores. La crisis del agua potable y saneamiento básico se traduce en pobreza y precarias condiciones de salud para la población que habita el área rural y las áreas peri urbanas.

El II Informe de Avances de los Objetivos del Milenio –ODM- de SEGEPLAN (Secretaría General de Planificación de la Presidencia), señala que las enfermedades

diarreicas se relacionan directamente con el acceso al agua potable y el saneamiento. Menciona que en el nivel socioeconómico más bajo se ha incrementado la frecuencia de enfermedades diarreicas agudas y lo contrario sucede en el nivel más alto. Las enfermedades diarreicas son más recurrentes en aquellos hogares que i) carecen de servicios básicos, ii) están ubicados en el área rural y con mayor población indígena y iii) casi seguramente con niveles bajos de educación.

Fuente: Valoración Estratégica sobre la importancia del agua potable y el saneamiento básico para el desarrollo, la salud y la educación en Guatemala RASGUA (Red de Agua y Saneamiento de Guatemala) Dic. 2007

I.3.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La calidad del agua y por lo tanto la salud humana pueden verse afectadas por la presencia de microorganismos entéricos patógenos, este producto del vertido de aguas residuales al medio ambiente acuático. Este tipo de contaminación causa importantes problemas en la salud pública y en el medio ambiente especialmente en países pobres y en vías de desarrollo. Los conocimientos del papel del agua en la transmisión de estos agentes patógenos en el medio ambiente varía; el papel de los virus entéricos es menos conocida que otros microorganismos como las bacterias y los protozoos, sin embargo en los últimos años se han venido realizando diversos estudios para entender el comportamiento de los virus en el medio ambiente.

Los virus entéricos son transmitidos por la vía fecal-oral, por lo tanto pueden causar infecciones severas al ser humano cuando estos entran en contacto con agua o alimentos contaminados. Los virus entéricos son excretados a través de las heces fecales en grandes cantidades principalmente por individuos infectados, usualmente entre 10^5 y 10^{11} partículas víricas por gramo.

Existe una alta prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas principalmente a través de la transmisión de virus por agua y alimentos. En estudios realizados sobre el virus de la hepatitis E se ha observado, analizando aguas residuales en Europa y Estados Unidos, que existe una elevada prevalencia de este virus en áreas geográficas que se consideraban libres de cepas endémicas y también que existen casos clínicos esporádicos y reservorios animales, por lo que se puede considerar como una potencial zoonosis. La detección de poliomasvirus en prácticamente 100% de las muestras de aguas residuales sugiere su utilización como potenciales indicadores de contaminación viral humana, en adición a los adenovirus humanos.

Con la ejecución del presente proyecto de investigación logramos estandarizar la metodología para la concentración y detección de virus en agua de mar, río y lago, por lo tanto contamos con métodos estandarizados de detección de virus en aguas. Así mismo encontramos la evidencia científica del hallazgo de virus patógenos en los diferentes tipos de agua para uso y consumo humano como son los Adenovirus y Polyomavirus JC.

1.4 OBJETIVOS

I.4.1 Objetivo General

Caracterizar y evaluar los virus entéricos contaminantes, presentes en diferentes tipos de agua relacionados con el consumo y uso humano.

I.4.2 Objetivos Específicos

Caracterizar y evaluar los virus entéricos contaminantes presentes en diferentes tipos de aguas (aguas residuales, lagos, ríos, aguas costeras y aguas de pozo) en Guatemala.

Evaluar metodologías diagnósticas de punta para la concentración de virus en biología molecular y de cultivo celular.

Caracterizar molecularmente mediante genotipificación y análisis filogenético los resultados obtenidos de los virus detectados en Guatemala.

Tipificación y análisis filogenéticos de los resultados obtenidos en reacciones de secuenciación de los virus detectados en Guatemala con gastroenteritis

Genotipificar y analizar los resultados obtenidos con los datos epidemiológicos de brotes relacionados con gastroenteritis obtenidos por el Laboratorio Nacional de Salud.

Dar recomendaciones para la prevención de virus contaminantes presentes en diferentes tipos de aguas en Guatemala.

Divulgar a las autoridades, actores sociales e instituciones en el campo de su competencia la información obtenida de la investigación.

I.5 MATERIALES Y METODOS:

I.5.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se realizó en el Laboratorio Nacional de Salud que se encuentra ubicado en el Kilómetro 22 carretera al Pacífico en Bárcena, del Municipio de Villa Nueva.

Su ubicación con respecto a los meridianos y los trópicos corresponde a una Latitud de Latitud 14°31'32" Norte, Longitud 90°35'15" Oeste del meridiano de Greenwich. Con un Clima templado de 15 grados Mínimo y 28 grados máximo con un promedio de 21° C.

I.5.2 RECLUTAMIENTO:

Toma de muestras:

Las muestras de agua utilizadas en el presente estudio se tomaron y se transportaron según la norma ISO 19458, 2006. (Calidad del agua. Muestreos para análisis microbiológicos. Guías para planear un muestreo, procedimientos de muestreo y transporte para análisis microbiológicos, manipulación y almacenamiento de muestras hasta ser analizadas)

Puntos de muestro y tipos de muestra:

Se colectaron muestras de 10 L para las muestras, en triplicado, excepto para agua residuales que se colectaron 50 mL.

Agua de mar (Puerto San José, Puerto Barrios, Mariscos, Matías de Galvez)

Agua de lago (lago Amatitlán y Atitlán)

Agua de pozo Los Aposentos Chimaltenango (región endémica de gastroenteritis)

Aguas residuales (planta de tratamiento Bello Horizonte)

Concentración los virus presentes en las muestras:

Los virus presentes en las muestras ambientales se concentraron según protocolos previamente descritos, ver metodología.

Resumidamente, las muestras se concentraron por métodos eficientes, de bajo costo y fácilmente estandarizables. Los métodos se basan en la concentración de los virus a través de una floculación orgánica con leche descremada de laboratorio. Ver metodología

Detección molecular de virus entéricos:

Todos los ensayos de detección molecular se realizaron basándose en protocolos previamente descritos en publicaciones científicas.

Extracción de ácidos nucleicos (AN) virales:

Los AN virales se extrajeron a partir de un volumen de los concentrados virales obtenidos en el proceso de concentración de virus de las muestras ambientales.

La extracción se realizó empleando el Kit comercial “QIAamp viral RNA kit”(Qiagen) y según las instrucciones del fabricante.

Cuantificación por PCR cuantitativa (qPCR) de los virus entéricos:

Se cuantificaron los genomas virales de los siguientes virus entéricos presentes en las muestras ambientales. Los ensayos de cuantificación se realizaron empleando un juego de oligonucleótidos y una sonda TaqMan específicos para cada virus.

Los virus a cuantificar fueron:

- JC polyomavirus
- Adenovirus

Detección por *nested* PCR (nPCR) de virus entéricos:

Para tipificar los virus entéricos cuantificados en las muestras ambientales, se realizaron también ensayos de nPCR de algunas muestras cuantificadas por qPCR. Los amplicones obtenidos se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se compararon con otras ya existentes en bancos de datos.

I.5.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:

La recolección de las muestras se realizó durante los meses de Noviembre 2012 a Agosto 2014 en los siguientes Ríos, Lagos y Puertos del país: Lago Peten Itzá, Peten, Río Dulce, Mariscos, Bahía de Amatique, en Izabal, Río el Naranjo, Río La Gloria, Río Zepelá, Lagos: San Marcos La Laguna, Lago de Atitlán, Lago de Amatitlán, Los Aposentos Chimaltenango, Puerto San José Y Tenería Herrera, Laguna Lemoa en Quiche.

I.5.4 NÚMERO DE MUESTRAS

Se llevó a cabo 19 muestreos de los diferentes lugares arriba mencionados

Procedencia	Total
Los Aposentos, Chimaltenango	1
Río Dulce, Izabal	1
Río El Naranjo, Peten	1
Lago de Amatitlán	3
Mariscos, Izabal	1
Lago Petén Itzá	1
Puerto Matías de Gálvez	1
Puerto San José	5
Río la Gloria Amatitlán	1
Río Zepelá	1
San Marcos la Laguna, Atitlan	1
Tenería Herrera	2
Total	19

I.5.5 ANÁLISIS DE LABORATORIO:

En este estudio se tomaron en triplicado las muestras de 10 litros cada una, se realizaron los procedimientos de concentración de virus en las aguas de los diferentes muestreos tanto de mar, lago, río y muestras residuales por el método de floculación orgánica.

I.5.6 FICHA (INSTRUMENTO RECOLECCION DE DATOS (ver anexo 1):

I.5.7 METODOLOGÍA:

REACTIVOS:

- Kit de extracción para purificación de arn viral; protocolo de: influenza porcina; versión: 2009; extracción: arn; equipo: qiacube;
- Primer R Adenovirus
- Primer F Adenovirus
- Sonda Adenovirus
- TaqMan Environmental Master Mix 2.0 4x200 rx
- Quanti Tect Probe RT-PCR Kit
- QIAgen OneStep RT-PCR Kit (100)
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase + Gold Buffer, 6x250 U
- Rnase Inhibitor
- Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 500 rx
- Dnase I Kit
- Glicina, 1 Kg
- Difco Skim Milk, 500 gr.
- UltraCruz Mounting Medium, 10 ml
- MEM Powder (autoclavable), 50 L
- MEM-Earles w/o L-Glu, 500 ml x 10 u

MATERIALES E INSTRUMENTOS:

Equipo

Equipo para concentración viral

- Centrifuga con capacidad de 250ml y velocidad de 4,000xg
- Envases de vidrio o plástico con fondo plano con capacidad de 250ml.
- Medidor de pH, termómetro y conductímetro
- Tubos cónicos con una longitud de 100-200cm
- Pipetas calibradas estériles descartables
- Tubos plásticos estériles de 1.5 y 10-15mL (Eppendorf)
- Agitadores magnéticos e imán
- Bomba peristáltica para extracción de sobrenadante
- Cronometro con capacidad para 8 a 10 horas
- Colector de desechos (bote plástico)

Equipo para determinación y cuantificación de virus PCR

- Vórtex
- Cabina de bioseguridad
- Gabinete de flujo laminar
- Congelador -20 °C
- Congelador a -80 °C
- Centrífuga
- Centrífuga placas
- Viales de 2 mL para extracción de ADN
- Crioviales
- Criobox
- Incubadora a 37 °C
- Microcentrífuga
- Pipetas automáticas de 1 a 10 µL, 5 a 50 µL, de 10 a 100 µL, 10 a 200 µL y de 100 a 1000 µL
- Puntas para micropipetas (1 a 10 µL)
- Puntas para micropipetas (5-50 µL y de 10 -100 µL)
- Puntas para micropipetas (100-1000 µL)
- PCR tiempo real applied Biosystem
- Recipiente para descartar material bioinfeccioso
- Viales de almacenamiento de 1.5 mL

Reactivos

Reactivos para concentración de virus

- Ácido Clorhídrico (1N)
- Hidróxido de Sodio (1M)
- Leche descremada (Difco ref. 232100)
- Buffer de Fosfatos (PBS)
- Sales marinas artificiales (Sigma Ref. S9883)
- Estándar de Adenovirus a concentración de 53,700,000Cg/L.

Reactivos para determinación y cuantificación de virus PCR

Reactivos para extracción de ADN

- Buffer AVL (Buffer de lisis para la purificación del ácido nucléico viral)
- Buffer AW1 concentrado (Buffer para desnaturalizar proteínas en las muestras)
- Buffer AW2 concentrado (Buffer para la purificación de ADN)
- Buffer AVE (Buffer para disolver carrier ARN)
- **Sondas y primers para extracción de ADN**
- TaqManEnvironmental Master Mix 2.0
- Sonda de ADN de adenovirus humano AdP1 (5'-FAMCCGGGCTCAGGTA CTC- CGAGGCGTCCT-TAMRA-3') a una concentración final de 0.225 µM
- Primers de ADN de adenovirus humano Adf (5'-CWTACATGCACATGKCSGG-3') y AdR (5'-CRCGGCARAA YTGACCG-3') a una concentración final de 0.9 µM

CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUA DE MAR, RÍO, LAGO Y RESIDUALES POR EL MÉTODO DE FLOCULACIÓN ORGÁNICA.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Equipo:

- Centrífuga de alta velocidad (8000 xg) con capacidad de 500 mL
- Potenciómetro
- Termómetro
- Conductímetro

Materiales:

- Tubos plásticos de 100 – 200 cm de longitud
- Pipetas graduadas, desechables y esterilizadas
- Tubos plásticos esterilizados de 1.5 y 10 – 15 mL (Eppendorf, Falcons, etc)
- Recipiente para centrífuga (500 mL)
- Revolvedores magnéticos e imanes
- Recipientes plásticos o de vidrio con base plana que permitan el uso de revolvedores magnéticos
- Bomba peristáltica para remover la supernata
- Controlador de tiempo

Reactivos:

- Ácido hidrolórico (1N)
- Hidróxido de sodio (4% p/v = 1M)
- Leche descremada (SM), (Difco Ref. 232100)
- Fosfato amortiguador pH 7.5
- Sales marinas (Sigma Ref. S9883)

CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUA DE MAR

Principio:

10 L de agua marina es acidificados antes de agregar 100 mL de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogénea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500 mL) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10 mL de fosfato amortiguador a pH 7.5.

Preparación de reactivos:

Acido hidrolórico 1 N:

A un balón de 500 mL, agregar 400 mL de agua desionizada, luego, agregar lentamente 34.4 mL de Ácido hidrolórico concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidrolórico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

Hidróxido de sodio (1 M/4%):

En un balón de 500 mL esterilizado disolver 4 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V):

Disolver en un balón de 500 mL usando un revolvedor magnético 1 g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100 mL de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Fosfato amortiguador:

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

Agua marina artificial:

En un balón de 1 L aforar con agua de grifo de clorada. Agregar 33,33 g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Procedimiento de análisis:**Preparación de PSM (1%):**

Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario.

Por cada muestra de agua marina prepare 100 mL de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 ($\pm 0,1$).

No autoclavar. El PSM deberá ser preparado justo antes del proceso.

Condicionamiento de agua y coagulación:

Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.

Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.

Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.

Ajustar el pH de la muestra de agua de mar a 3.5 ($\pm 0,1$) mediante la adición de HCl 1 N. Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.

Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.

Agregar 100 mL de PSM 1% a la muestra de agua marina.

Para muestras germinadas: agregar 1 mL de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.

Revolver las muestras despaciosamente durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grumo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.

Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación.

- Remover la supernata usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras germinadas la supernata debería ser recogida dentro de una botella desinfectada. En todos los casos tener cuidado de no afectar los grumos.
- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500 mL) dentro de una botella centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugadora.

Suspensión de grumos.

- Muy cuidadosamente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7 mL de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.
- Una vez los grupos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10 mL.
- Homogenizar el concentrado viral girándolo rápidamente, distribuya 10 mL en tubos eppendorf los cuales deben ser guardados para futuro análisis.

CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUA DE RIO.

Principio:

10 L de agua de río son acidificados antes de agregar 100 mL de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogenea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500 mL) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10 mL de fosfato amortiguador a pH 7.5.

Preparación de reactivos:

Acido hidrolórico 1 N:

A un balón de 500 mL, agregar 400 mL de agua desionizada, agregar lentamente 34.4 mL de Ácido hidrolórico concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidrolórico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

Hidróxido de sodio (1 M/4%):

En un balón de 500 mL esterilizado disolver 40 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V):

Disolver en un balón de 500 mL usando un revolovedor magnético 1 g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100 mL de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Fosfato amortiguador:

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

Agua marina artificial:

En un balón de 1 L aforar con agua de grifo de clorada. Agregar 33,33 g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Procedimiento de análisis:**Preparación de PSM (1%):**

Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario. Por cada muestra de agua de río prepare 100 mL de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 (\pm 0,1). No autoclavear.

Condicionamiento de agua y coagulación:

Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.

Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.

Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.

La conductividad deber ser mayor a 1200 μs . Ajustar conductividad con sales artificiales.

Ajustar el pH de la muestra de agua de río a 3.5 (\pm 0,1) mediante la adición de HCl 1 N. Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.

Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.

Agregar 100 mL de PSM 1% a la muestra de agua de río.

Para muestras germinadas: agregar 1 mL de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.

Revolver las muestras durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grupo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.

Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación.

- Remover la supernata usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras germinadas la supernata debería ser recogida dentro de una botella desinfectada. En todos los casos tener cuidado de no molestar los grumos.
- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500 mL) dentro de una botella centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugación.

Suspensión de grumos.

- Muy gentilmente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7 mL de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.
- Una vez los grupos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10 mL.

CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUA DE LAGO

Principio:

10 L de agua de lago y/o cuerpos de agua dulce con poca materia orgánica son acidificados antes de agregar 100 mL de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogeneiza por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500 mL) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 10 mL de fosfato amortiguador a pH 7.5.

Preparación de reactivos:

Acido hidroclicóric 1 N:

A un balón de 500 mL, agregar 400 mL de agua desionizada, agregar lentamente 34.4 mL de Ácido hidroclicóric concentrado, dejándolo resbalar por las paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidroclicóric utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

Hidróxido de sodio (1 M/4%):

En un balón de 500 mL esterilizado disolver 40 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V):

Disolver en un balón de 500 mL usando un revolvedor magnético 1 g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100 mL de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Fosfato amortiguador:

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

Agua marina artificial:

En un balón de 1 L aforar con agua de grifo de clorada. Agregar 33,33 g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Procedimiento de análisis:**Preparación de PSM (1%):**

Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario. Por cada muestra de agua de lago y/o cualquier otro cuerpo de agua dulce con poca materia orgánica prepare 100 mL de PSM 1% (p/v) en agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 ($\pm 0,1$). No autoclavar.

Condicionamiento de agua y coagulación:

Siempre use una muestra extra como control positivo del proceso, esta muestra sería una muestra ambiental semejante a las que van a ser probadas pero serán germinadas con una concentración conocida de partículas virales usadas como un control.

Siempre preparar un control negativo de la concentración mediante el uso de agua de chorro.

Si la muestra presenta una alta cantidad de material suspendido (arena y otros materiales) dejarla sedimentar por 15 minutos. Recuperar el agua dentro de un nuevo recipiente usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo de plástico. Usar una pipeta plástica diferente para cada muestra.

La conductividad deber ser mayor a 1200 μs . Ajustar conductividad con sales artificiales.

Ajustar el pH de la muestra de agua de río a 3.5 ($\pm 0,1$) mediante la adición de HCl 1 N.

Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.

Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.

Agregar 100 mL de PSM 1% a la muestra de agua de lago y/o cualquier otro cuerpo de agua dulce con poca materia orgánica.

Para muestras germinadas: agregar 1 mL de una solución de cada virus a la muestra. Mezclar revolviendo evitando salpicar o crear un efecto aerosol.

Revolver las muestras durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grupo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.

Parar de revolver y permitir que el grupo sedimente por gravedad durante 8 – 10 horas.

Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación.

- Remover el sobrenadante, usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. Para muestras terminadas, el sobrenadante debería ser recogido dentro de una botella esterilizada. En todos los casos tener cuidado de no molestar los grumos.
- Recoger el sedimento con los grumos (aproximadamente 500 mL) dentro de una botella de centrífuga.
- Balancear los recipientes agregando PSM pH 3.5.
- Centrifugar los recipientes mediante una velocidad de 8,000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Tan pronto la centrifugación se detenga, remover los recipientes centrífugos, cuidadosamente de la centrifugación.

Suspensión de grumos.

- Muy gentilmente verter y descargar la supernata. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Agregar 7 mL de fosfato amortiguador para cada botella centrífuga.
- Una vez los grupos han sido disueltos, mida y agregue fosfato amortiguador para alcanzar un volumen de 10 mL.

CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUA RESIDUALES Y EFLUENTES SECUNDARIOS

Principio:

50 mL de agua residual y/o efluentes secundarios se mezclan con buffer de glicina 0,25 N, pH 9.5 para diluir los virus presentes en la materia orgánica, la muestra se centrifuga después de agitar por 30 minutos con hielo o a 4 °C y el sobrenadante resultante es acidificado antes de agregar 100 mL de leche descremada pre-coagulada. La muestra se homogenea por 8 – 10 horas para permitir que los virus presentes se absorban en el grumo. La muestra es colocada en reposo para sedimentar los grumos por 8 – 10 horas. La supernata es extraída usando una bomba peristáltica, y el volumen remanente con sedimento (aproximadamente 500 mL) es centrifugado para redissolver el grupo de grumos en 1 mL de fosfato amortiguador a pH 7.5.

Preparación de reactivos:

Acido hidroclicórico 1 N y 0,1 N:

A un balón de 500 mL, agregar 400 mL de agua desionizada, luego, agregar lentamente 34.4 mL de Ácido hidroclicórico concentrado, dejándolo resbalar por las

paredes, agitar suavemente, dejar enfriar. Anotar en el cuaderno de trabajo del analista responsable de la preparación el volumen de ácido hidroclicórico utilizado. Transferir a un frasco de vidrio con tapadera hermética, etiquetar el número de lote y fecha de expiración.

Hidróxido de sodio (1 M/4% p/v):

En un balón de 500 mL esterilizado disolver 4 g de hidróxido de sodio en 400 mL de agua desionizada. Transferir a un frasco de vidrio o plástico con tapadera hermética. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Leche descremada pre-coagulada (PSM) 1% (W/V):

Disolver en un balón de 500 mL usando un revolvedor magnético 1 g de leche descremada (Difco Ref. 232100) en 100 mL de agua marina artificial. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Fosfato amortiguador:

1:2 v/v de Na_2HPO_4 0,2 M y NaH_2PO_4 0,2 M a pH de 7.5. Etiquetar con el número de lote y la fecha de expiración.

Glicina amortiguador:

Glicina a 0,25 N y pH 9.5.

Agua marina artificial:

En un balón de 1 L aforar con agua de grifo de clorada. Agregar 33,33 g de sal marina artificial (Sigma Ref. S9883). Dejar reposar en cuarto frío toda la noche para disolver si es necesario. Agitar o revolver el recipiente para ayudar a mezclar. Etiquetar debidamente el número de lote y la fecha de expiración.

Procedimiento de análisis:

Preparación de PSM (1%):

Chequear la calibración del medidor de pH en el rango alcalino y ácido y recalibrar si fuera necesario.

Para cada conjunto de diez muestras de agua residual y/o efluentes secundarios prepare 25 mL de PSM 1% (p/v) de agua marina artificial y después de disolver ajustar el pH a 3.5 ($\pm 0,1$).

No autoclavar. El PSM deberá ser preparado justo antes del proceso.

Condicionamiento de agua y coagulación:

- Mezclar 50 mL de la muestra con 100 mL de buffer de glicina 0,25 N, pH 9.5 y agitar durante 30 minutos en hielo o a 4 °C con agitación magnética.
- Centrifugar a 8000 xg durante 30 minutos a 4 °C.
- Colocar el sobrenadante en una botella limpia de 150 mL.
- Ajustar el pH de la muestra de agua residual a 3.5 ($\pm 0,1$) mediante la adición de HCl 1 N. Este paso es importante para la concentración de los virus para asegurarse que el pH ha sido apropiadamente ajustado. Mezclar el agua mediante agitación vigorosa mientras se agrega HCl.
- Registrar el pH de las muestras antes y después del acondicionamiento conforme el volumen de HCl es usado.
- Agregar 1,5 mL de PSM 1% a la muestra de agua marina.

- Revolver las muestras despaciosamente durante 8 – 10 horas para permitir que los virus sean absorbidos por el grumo. Es recomendado el uso de un contador para apagar automáticamente el proceso de revolver.

Recoger y re-disolver los grumos. Centrifugación.

Centrifugar a 8000 xg durante 30 minutos a 4 °C.

Remover el sobrenadante, usando una bomba peristáltica y una pipeta plástica conectada a un tubo plástico. En todos los casos tener cuidado de no afectar los grumos. Recoger el sedimento con los grumos dentro de una botella centrífuga.

Suspensión de grumos.

- Muy cuidadosamente verter y descargar el sobrenadante. Seguir las medidas apropiadas para los materiales infecciosos.
- Resuspender el pellet en 1 mL de fosfato amortiguador pH 7.5 para cada botella centrífuga.
- Homogenizar el concentrado viral girándolo rápidamente, distribuya la muestra en tubos eppendorf los cuales deben ser almacenados a -80 °C para futuro análisis.

PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La extracción de ARN utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kits proporciona una manera fácil para purificar el ARN viral para el uso fiable en tecnologías de amplificación.

Para trabajar la extracción de ARN, deben tomarse las máximas precauciones para evitar contaminaciones con RNasas y la degradación del ARN. Es importante trabajar en un ambiente libre de nucleasas, por lo que debe tratarse todo el material para su eliminación.

Reactivos provistos por el kit

- **Buffer AVL:** (lisis) inactiva RNasas y asegura el aislamiento de ARN viral intacto.
- **Buffer AW1** (concentrado): Solución de lavado 1.
- **Buffer AW2** (concentrado): Solución de lavado 2.
- **Buffer AVE:** Buffer AVE es RNasa libre de agua que contiene 0.04% de azida de sodio para prevenir el crecimiento microbiano y la posterior contaminación con RNasas. La azida de sodio afecta las lecturas de absorbancia entre 220 y 280 nm pero no tiene ningún efecto en las aplicaciones posteriores, tales como RT-PCR. Si desea determinar la pureza de la ARN eluido, se recomienda la elución con agua libre de RNasa en lugar de tampón AVE.

Carrier ARN (poly A): mejora la unión de los ácidos nucleicos virales a la membrana QIAamp Mini, especialmente si hay muy pocas moléculas diana en la muestra.

Reactivos no provistos por el kit

Etanol (96% - 100%)

Material y Equipo

Materiales provistos por el kit

- Columnas QIAamp Mini Spin
- Tubos de colección (2 ml)

Materiales no provistos por el kit

- Puntas para pipetas de 1000µl y 200µl con filtro para uso biología molecular
- Tubos de microcentrifuga de 1.5 – 1.7 ml
- Gradillas para tubos de microcentrifuga
- Materiales para identificar los tubos (rótulos, marcador permanente de punta fina)
- Recipientes para descarte de residuos
- EPP (Batas, guantes libres de polvo descartables, anteojos de protección.)
- Materiales de limpieza y decontaminantes
- Formulario de trabajo y registro

Equipo

- Gabinete de bioseguridad
- Microcentrifuga
- Mezclador Vortex
- Pipetas automáticas de volumen regulable de 1000µl y 200µl

Precauciones de seguridad y generales

En todo el momento del procedimiento use equipos de protección personal (EPP) adecuada cuando trabaja con químicos y materiales biológicos. Estos son: guantes, batas y anteojos de protección.

NO AÑADIR lejía o soluciones acidas directamente al desecho que contiene los Buffer AVL y Buffer AW1. Estas soluciones contienen sales de guanidina que son componentes altamente reactivas cuando combina con la lejía.

Riesgos y frases de seguridad se aplican para:

Buffer AVL: R20/21/22-32, S13-26-36-46 (Contiene guanidina tiocianato: nocivo, dañino a la salud).

Buffer AW1: R20/21/22-32, S13-26-36-46 (Contiene clorhidrato de guanidina: nocivo, irritante, dañino a la salud).

El ARN es extremadamente sensible a RNasas y siempre debe ser manejado con cuidado. Las manos y las partículas de polvo pueden contener bacterias y hongos que son los medios más comunes de contaminación de RNasa. Todos los materiales (tubos, puntas de pipetas) deben ser libres de RNasa/DNasa garantizados.

La limpieza es fundamental en el laboratorio para evitar contaminaciones. Use lejía y otro producto para descontaminar superficies y equipos. Tenga en cuenta que el alcohol al 70% utilizado como desinfectante no destruye los ácidos nucleicos.

Procedimiento

El presente procedimiento será realizado en el cuarto de extracción únicamente.

Principio del método

La muestra es lisada bajo altas condiciones desnaturalizantes para inactivar las RNAsas para asegurar un aislamiento de ARN viral intacto. Seguidamente, se ajustan las condiciones amortiguadoras para permitir que desarrolle una unión óptima de los ARN a la membrana QIAamp, la muestra es cargada dentro de la columna de QIAamp Mini Spin. El ARN se une a la membrana y los contaminantes son eliminados eficientemente mediante lavados en dos pasos usando dos diferentes buffer de lavado. Finalmente el ARN de alta calidad es eluido en un buffer especial, listo para su posterior uso inmediato o para almacenamiento seguro a -20 o -70°C. El ARN purificado es libre en proteína, nucleasas, y otros contaminantes e inhibidores.

Preparación de los reactivos

Adición de carrier RNA al Buffer AVL: Adicionar 310 µl de Buffer AVE al tubo con 310 µg de “carrier RNA” liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl. Disolver el “carrier RNA” completamente, divida en alícuotas de volumen conveniente, y almacene a -20°C. No descongele más de 3 veces. Si el Buffer AVL se cristaliza, incube a 80°C hasta que el precipitado sea disuelto. Calcule el volumen de la mezcla Buffer AVL-carrier RNA necesario para cada lote de muestra siguiendo la Tabla No. 3. Mezcle suavemente invirtiendo el tubo 10 veces. NO MEZCLE en vortex para evitar la formación de burbujas. Anote la fecha de preparación.

Buffer AW1: El Buffer AW1 es suministrado como una solución concentrada. Antes de usar, adicionar una cantidad apropiada de etanol (96-100%) como se indica en las instrucciones de la botella y en la Tabla No. 1. El Buffer AW1 es estable por 1 año cuando es almacenado cerrado a temperatura ambiente o hasta la fecha de expiración del kit. Anote la fecha de preparación en la botella.

Tabla No. 1. Preparación del Buffer AW1

AW1 concentrado	Etanol	Volumen final
95 ml	125 ml	220 ml

Buffer AW2 El Buffer AW2 es suministrado como una solución concentrada. Antes de usar por primera vez, adicione una cantidad apropiada de etanol (96-100%) como se indica en la botella y en la Tabla 2. El Buffer AW2 es estable por un año cuando es almacenado cerrado y a temperatura ambiente, pero es solamente hasta la fecha de vencimiento del kit. Anote la fecha de preparación en la botella.

Tabla No. 2. Preparación del Buffer AW2

AW2 concentrado	Etanol	Final volumen
66 ml	160 ml	226 ml

Preparación de otros componentes antes de comenzar el procedimiento de purificación:

- Limpie la superficie de trabajo y los equipos (cabina de bioseguridad, centrifuga, vortex).
- Encienda la luz UV de la cabina de Bioseguridad por 15 a 20 minutos, apague la luz UV y encienda el flujo durante por lo menos 5 minutos.
- Aliste los siguientes materiales:
- Tubos ependorff de microcentrifugación de 1.5ml (no proveído en el kit) en gradillas separadas e identifique con informaciones necesarias para contener el eluído de ARN purificado.
- Tubo colector de 1.5 mL
- Columnas para MinElute QIAamp
- Tips de 1000 µl (QIAcube)
- Equilibre a temperatura ambiente 15–25°C las muestras.
- Equilibre el Buffer AVE a temperatura ambiente.
- Revisar que el Buffer AW1 y Buffer AW2 haya sido preparado siguiendo las instrucciones de preparación.
- Adicionar el Carrier RNA reconstituido con el Buffer AVE en el Buffer AVL de acuerdo a las instrucciones.

Metodología

Preparar Buffer AVL y carrier RNA

Calcule el volumen de Buffer AVL + Carrier dependiendo de la cantidad de muestras a procesar, según tabla No. 3

Tabla No. 3. Volúmenes de Buffer AVL y carrier RNA requeridos para el procedimiento del QIAamp Viral RNA Mini kit.

No. Muestras	Vol. Buffer AVL (µL)	Vol. Carrier RNA-AVE (µL)	No. Muestras	Vol. Buffer AVL (µL)	Vol. Carrier RNA-AVE (uL)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

Procedimiento

- Pipetear 560 µl del mix preparado del Buffer AVL/Carrier RNA dentro de un microtubo colector de 1.5 ml, previamente identificados
- Pipetear 140 µl de muestra dentro de los microtubos colectores del paso a. Utilice el vortex para homogenizar la muestra, durante 15 segundos.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. (La lisis de partículas virales se lleva a cabo a los 10 minutos, tiempos de incubación prolongados no tienen efecto en la purificación del ARN.)
- Pipetear 560 µl de Etanol concentrado a cada tubo y pasar por el vortex para homogenizar, durante 15 segundos aproximadamente. (Solo utilice Etanol, otros alcoholes pueden contener sustancias que interfieren con la PCR.)
- Identificar las mini columnas con su tubo colector. (Identificar la tapadera de la columna, no el tubo colector.)
- Trasferir 630 µl de la mezcla a cada mini columna, tapar y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
- Descartar el tubo colector de cada mini columna y colocar la columna a un nuevo tubo colector. Si la solución no paso en su totalidad, centrifugar nuevamente.
- Trasferir 630 µl o el resto de la mezcla a cada mini columna, tapar y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
- Descartar el tubo colector de cada mini columna y colocar la columna a un nuevo tubo colector. Si la solución no paso en su totalidad, centrifugar nuevamente.
- Pipetear a cada mini columna 500 µl del Buffer AW1, cierre la columna y centrifugue a 8,000 rpm por 1 minuto. Coloque la mini columna en un tubo colector nuevo y descarte el tubo ya usado.
- Pipetear a cada mini columna 500 µl del Buffer AW2, cierre la columna y centrifugue a velocidad máxima por 3 minutos.
- Rotular microtubos nuevos con tapa a presión (tipo Safe-Lock) con el número de las muestras.

- Colocar las mini columnas en los microtubos anteriormente identificados. Descartar los tubos colectores usados.
- A cada mini columna pipetear 70 µl del Buffer AVE, cierre las columnas y deje a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugue a 8,000 rpm por un minuto y descarte la mini columna. (Una doble elución con 40 µl del Buffer AVE aumenta el rendimiento hasta un 10%.)
- Almacene el eluido de ARN a -20°C. (El ARN viral es estable hasta un año cuando es almacenado a -70°C.)
- Descarte las columnas, Adaptadores y tips, deje todo limpio y listo para usar nuevamente.

Control de calidad

El control de extracción que se utiliza, en cada corrida de 12 muestras, es utilizar agua tipo II (libre de RNasas y DNasas) en lugar de la muestra del paciente. Este control debe de salir negativo en cada corrida de PCR para asegurar que no hay contaminación entre muestra y muestra.

En cada lote de purificación se debe incluir como mínimo un control positivo alto, un control positivo bajo y un control negativo.

Para prevenir contaminaciones, siga las recomendaciones de buenas prácticas de laboratorios para biología molecular.

Registre siempre el número de lote de los kits para cada lote de muestras que procesara.

PCR CUANTITATIVO PARA ADENOVIRUS Y JC POLIOMAVIRUS HUMANO. CADA VIRUS SE REALIZA POR SEPARADO

Principio:

Consiste en la amplificación de fragmento de ADN que han sido obtenidos luego de la extracción, y ser detectados y cuantificados por la técnica de qPCR o PCR cuantitativa, la especificidad del método se logra utilizando el reactivo TaqMan que posee una sonda fluorogénica que permite la detección de productos o fragmentos de ADN detectados durante toda la reacción.

Equipo:

- Vortex
- Cabina de bioseguridad
- Campana de flujo laminar
- Congelador a -20 °C
- Congelador a -80 °C
- Centrífuga
- Centrífuga para placar RT-PCR
- Cubetas para extracción de ADN
- Crioviales
- Caja de almacenamiento de muestras
- Incubadora a 37 °C
- Microcentrífuga
- PCR tiempo real applied Biosystem

Materiales:

- Pipetas automáticas de 1 a 10 µL
- Pipetas automáticas de 5 a 50 µL
- Pipetas automáticas de 10 a 100 µL
- Pipetas automáticas de 10 a 200 µL
- Pipetas automáticas de 100 a 1000 µL
- Puntas para pipetas de 1 a 10 µL
- Puntas para pipetas de 5 a 50 µL y de 10 a 100 µL
- Puntas para pipetas de 100 a 1000 µL
- Viales de almacenamiento de 1.5 mL

Reactivos:

- Reactivo para extracción de ADN
- Buffer de lisis para la purificación de ácido nucleico viral (AVL)
- Buffer para la desnaturalización de proteínas en la muestra (AW1)
- Buffer para la purificación de ADN (AW2)
- Buffer para la dilución de carrier ARN (AVE)
- TaqMan Enviromental Master Mix 2.0
- Sonda de ADN de adenovirus humano AdP1 (5'-FAMCCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA-3') a una concentración final de 0.225 µM.
- Primers de ADN de adenovirus humano Adf (5'-CWTACATGCACATGKCSGG-3') y AdR (5'-CRCGGCARAAAYTGCACCG-3') a una concentración final de 0.9 µM.
- Sonda de ADN de JC Poliomavirus Humano JE3P (5'-6-FAM-AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA-BHQ1-3').

Preparación de Reactivos:

Solución de Trabajo:

Diluir los primers y las sondas, que se encuentran en una solución de 100 µM, a 10 µL del primers se agregan 34,44 µL de agua, para obtener una concentración final de 22,50 µM y a 10 µL de la sonda se agregan 78,89 µL de agua, para alcanzar una concentración final de 11,25 µM.

Master Mix:

Agregar 12,5 µL de Mix 2x, 1 µL de primer 1, 1 µL de primer 2 y 0,5 µL de la sonda.

Procedimiento de análisis:

Reacción final:

- Agregar 15 µL de Master Mix a cada pozo de la placa.
- Agregar 10 µL de muestra en los respectivos pozos y 10 µL de agua purificada (duplicado) para los controles negativos.
- Agregar 10 µL del estándar de las diluciones 10^0 a 10^6 / 10 µL por triplicado, utilizando una pipeta exclusiva para ADN estándar.
- Centrifugar a 3000 xg durante 3 minutos.

- Desarrollar el qPCR dentro de un adecuado sistema, seleccionando los parámetros apropiados (considerando el uso de la cubierta con adhesivo y el volumen total en cada recipiente, etc.). Siguiendo la activación del AmpliTaq Gold por 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos (15 a 95 °C y 1 minuto a 60 °C) son desarrollados.
- La cantidad de ADN será definida como la mediana de la información obtenida después de corregir el factor de diluciones cuando sea necesario.

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN:

- Añada 560 µl de solución amortiguadora AVL a un tubo de 1,5 ml limpio y estéril.
- Añada 140 µl de muestra al tubo indicado en el paso 3, mezcle con pulsos vorticiales durante 15 segundos e incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Añada 560 µl de solución de 95% a 100% de etanol a cada tubo y mezcle con pulsos vorticiales durante 15 segundos.
- Centrifugue el tubo brevemente en una microcentrífuga a fin de recoger las gotas de la parte de adentro de la tapa.
- Para cada muestra, rotule una minicolumna de centrifugado y colóquela en un tubo colector de 2 ml.
- Añada 630 µl de la mezcla a la columna y centrifugue durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- Vacíe el tubo colector y repita el paso 5 una vez.
- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo colector limpio.
- Añada 500 µl de solución amortiguadora AW1.
- Centrifugue durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo colector limpio.
- Añada 500 µl de solución amortiguadora AW2.
- Centrifugue durante 3 minutos a 14.000 rpm.
- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo de 1,5 ml estéril rotulado.
- Añada 60 µl de solución amortiguadora AVE, que viene en el estuche, espere 1 minuto y centrifugue durante 1 minuto a 8.000 rpm.
- Saque la columna y deséchela; ponga el tubo de 1,5 ml que contiene ARN sobre hielo para usar de inmediato o guárdelo en el congelador a -20 °C o -70 °C para usar más adelante.

Estándar para HAdV

Preparar material.

- 500 mL Buffer TE 1X (10 mM Tris, pH 8.0 ajustado con HCl puro y 1 mM EDTA) autoclavear.
- 300 tubos de PCR de 200 µL separados NO en tiras.
- 4 cajas plásticas de puntas vacías de 20 o 200 µL
- 12 tubos Eppendorf de 1,5 mL y gradilla
- Micropipetas P1000, P200
- Guantes y bata exclusiva para preparar el estándar.

El estándar se debe preparar en un área separada y que no tenga contacto con las muestras o material de virología ambiental o clínica. Las pipetas y puntas no deben usarse para virología ambiental o clínica.

Con guantes preparar:

- Rotular en la tapa 24 tubos de PCR de 200 µL con el número 0, 24 más con el número 2, y así hasta 6, para un total de 84 tubos. Introducirlos en las cajas vacías de puntas en filas NO columnas, no cerrarlos y separar del resto de material.
- Añadir 900 µL de TE a 12 Eppendorf de 1,5 mL y rotularlos de la siguiente forma:
-1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.
- En un Eppendorf (TUBO 10) de 1,5 mL añadir 175,05 µL de TE y de ultimo añadir 24,95 µL del plásmido cortado de adenovirus humanos (0,101 µg/µL). MEZCLAR BIEN.
- Añadir 100 µL al Eppendorf 9 (que tiene los 900 µL de TE) mezclar, cambiar de punta, añadir del tubo 9 100 µL al Eppendorf 8 y mezclar, así sucesivamente, mezclando bien y cambiando de punta seguir con el banco de diluciones hasta el tubo -1.
- Dispensar a partir del tubo 6, 40 µL a para cada tubo de PCR de 200 µL hasta el tubo 0. Comenzar con el Eppendorf 0 para los tubitos 0 y así ir subiendo hasta el tubo 6.
- Que otra persona prepare MIX para qPCR para analizar por triplicado las diluciones -1 hasta la 6.
- Con los resultados se debe construir una recta estándar. Enviar los resultados lo antes posible.
- Almacenar a -80 las cajas de puntas con las diferentes diluciones del estándar.
- Almacenar a -80 el tubo original de plásmido y el tubo 10.

PCR amplificación Adenovirus.

El par de cebadores exterior, hex1deg (59-CCG SCA RTG GKCWTA CAT GCA CAT C-39) y hex2deg (59-CAG CAC SCC ICG RAT GTCAAA-39), que creó un producto de 301 pb, se utilizó para ambos la secuenciación y el diagnóstico.

El par anidado, nehex3deg (59-CCG CGY GCM ACI GAIACS TAC TTC-39) y nehex4deg (59-CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGMRCY TTG TA-39), produjeron un amplímero de 171 pb.

Todas las secuencias de cebadores encontradas entre la posición de par de base 21 y la posición 322 en la región de codificación del gen hexon (3).

Amplificaciones de un solo paso se llevaron a cabo en mezclas de reacción de 100 ml que contenían 50 mM KCl, mM Tris-HCl 10 (pH 9,0), 3 mM MgCl₂, 0,1% de Triton X-100, cada desoxinucleósido trifosfato a una concentración de 100 mM, cada cebador a una concentración de 0,5 mM, Y 1U de TaqDNA polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wis.).

Se añadió un total de 30 ul de ADN eluido-QIAGEN a cada mezcla de reacción. Los tubos de reacción se colocaron en un termociclador PTC-200 MJResearch y se

mantuvieron a 94 ° C durante 3 min, seguido inmediatamente por 35 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 30 s, y 72 ° C durante 1 min.

El ciclo final tuvo un tiempo de extensión prolongada de 5 min. Una décima parte de la mezcla de PCR fue sometida a PCR anidada en una mezcla idéntica pero con cebadores anidados.

Después que se completó la amplificación, 10 μ l del producto de la PCR anidada se sometió a electroforesis en 2% NuSieve GTG más 1% de agarosa ME SeaKem (FMCBioscience, Rockland, Maine) en tampón 0.53 Tris-borato-EDTA (pH 8,0) a 10 V / cm durante 90 min.

Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio de 0,25 mg por ml y la inspección bajo la luz UV

PCR para la detección de HAdV

Primera ronda de PCR (utilizando AmpliTaq de Applied Biosystems)

- Preparar la mezcla de PCR para n + 1 tubos (Tabla 1).
- Mezclar bien.
- Distribuir 40 μ l de RT-PCR de la mezcla en tubos de 0,2 ml.
Añadir 10 μ l de ADN extraído a cada tubo de reacción. Añadir primero el control negativo, las muestras y el control positivo al final.
- Centrifugar durante 5 segundos.
- Incubar los ciclos siguientes:
 - 5 Min. A 95° C
 - 1 Min a 94° C/ 1 Min a 55° C/ 1 Min a 72° XC durante 30 ciclos
 - 10 Min a 72° C
 - 4° C.

NESTED PCR (utilizando AmpliTaq de Applied Biosystems)

- Preparar la mezcla de n + 1 tubos (Tabla 2).
- Mezclar bien.
- Distribuir 49 μ l de la mezcla Nested-PCR (Tabla 4) en tubos de 0,2 ml.
Añadir 1 μ l del ADN amplificado en la PCR en los tubos de PCR anidada: Añadir el ADN amplificado en un área separada del laboratorio con consejos específicos y micropipeta y el cambio de los guantes entre tubo y tubo. Siga el orden de negativo, las muestras diluidas superior para dirigir y control positivo al final.
- Centrifugar durante 5 segundos.
- Incubar siguiendo los ciclos apropiados:
 - 5 Min. A 95° C
 - 1 Min a 94° C/ 1 Min a 55° C/ 1 Min a 72° XC durante 30 ciclos
 - 10 Min a 72° C
 - 4° C.

Los resultados deben ser analizados en un 3% electroforesis en gel de agarosa usando bromuro de etidio como mancha.

TABLA 1

Componentes	Volumen	Final Concentración
PCR BufferII 10x	5µl	1x
MgCl ₂ 25mM	3µl	1.5mM
dNTPs 25 mM of cada dNTP	0.5µl	250µM de cada dNTP
Hex1deg (25µM)	1µl	0.5µM
Hex2deg (25µM)	1µl	0.5µM
AmpliTaq (App. Bios.)5U/µl	0.4µl	2U
Agua	29.1µl	

TABLA 2

Componentes	Volumen	Final concentración
PCR BufferII 10x	5µl	1x
MgCl ₂ 25mM	3µl	1.5mM
dNTPs 25 mM de cada dNT	0.5µl	250µM de cada dNTP
Nehex3deg (25µM)	1µl	0.5µM
Nehex4deg (25µM)	1µl	0.5µM
AmpliTaq (App. Bios.)5U/µl	0.4µl	2U
Agua	38.1µl	

Cebadores externos: hex1deg (5'-CCG SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3 ')
 hex2deg (5'-CAG CAC SCC ICG GTC RAT AAA-3 ')
 crear un producto 301 pb.

Cebadores anidados: nehex3deg (5'-CCG CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC-3 ')
 nehex4deg (5'-CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTG TA-3 '), producen
 un amplímero de 171 pb.

Estándar para HAdV

Preparar material.

- 500 mL Buffer TE 1X (10 mM Tris, pH 8.0 ajustado con HCl puro y 1 mM EDTA) autoclavear.
- 300 tubos de PCR de 200 µL separados NO en tiras.
- 4 cajas plásticas de puntas vacías de 20 o 200 µL
- 12 tubos Eppendorf de 1,5 mL y gradilla
- Micropipetas P1000, P200
- Guantes y bata exclusiva para preparar el estándar.

El estándar se debe preparar en un área separada y que no tenga contacto con las muestras o material de virología ambiental o clínica. Las pipetas y puntas no deben usarse para virología ambiental o clínica.

Con guantes preparar:

- Rotular en la tapa 24 tubos de PCR de 200 µL con el número 0, 24 más con el número 2, y así hasta 6, para un total de 84 tubos. Introducirlos en las cajas vacías de puntas en filas NO columnas, no cerrarlos y separar del resto de material.
- Añadir 900 µL de TE a 12 Eppendorf de 1,5 mL y rotularlos de la siguiente forma:
- -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

- En un Eppendorf (TUBO 10) de 1,5 mL añadir 175,05 μL de TE y de ultimo añadir 24,95 μL del plásmido cortado de adenovirus humanos (0,101 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). MEZCLAR BIEN.
- Añadir 100 μL al Eppendorf 9 (que tiene los 900 μL de TE) mezclar, cambiar de punta, añadir del tubo 9 100 μL al Eppendorf 8 y mezclar, así sucesivamente, mezclando bien y cambiando de punta seguir con el banco de diluciones hasta el tubo -1.
- Dispensar a partir del tubo 6, 40 μL a para cada tubo de PCR de 200 μL hasta el tubo 0. Comenzar con el Eppendorf 0 para los tubitos 0 y así ir subiendo hasta el tubo 6.
- Que otra persona prepare MIX para qPCR para analizar por triplicado las diluciones -1 hasta la 6.
- Con los resultados se debe construir una recta estándar. Enviar los resultados lo antes posible.
- Almacenar a -80 las cajas de puntas con las diferentes diluciones del estándar.
- Almacenar a -80 el tubo original de plásmido y el tubo 10.

PCR para la detección JCV

Preparar la mezcla de PCR mezclando los siguientes componentes en un Eppendorf teniendo en cuenta que los volúmenes descritos son para 1 reacción de PCR, preparar la mezcla para $n + 1$ de reacción. Alícuota 40 μl de mezcla en tubos de $n \cdot 0.2\mu\text{l}$.

Tabla 3

Componentes	Volumen	Final concentración
PCR BufferII 10x	5 μl	10mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)
MgCl ₂ 25mM	3 μl	1.5mM KCl
DNTPs 25 mM	0.5 μl	1mM
Primer R	1 μl	4 μM
Primer F	1 μl	4 μM
Taq pol 5U/ μl	0.4 μl	2U
Agua	29.1 μl	

Añadir 10 μl de cada muestra a cada tubo que contiene 40 μl de mezcla. Añadir también un negativo (10 μl de TE o agua) y el control positivo (10 μl de una muestra positiva conocida JCV). Diluciones decimales de las muestras analizadas son aconsejables para analizar con el fin de descartar resultados negativos debido a la muestra inhibidores.

- Mezclar bien
 - Centrifugar durante 1 segundo
 - Incubar: 2 min a 95°C
 - 15s a 95°C / 30s a la temperatura de hibridación de los cebadores / 1 min 72 ° C
- 29 ciclos, 5 min 72 ° C

El ciclo térmico de la mezcla de amplificación se realizó en un bloque de calor programable (Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer).

Nested PCR para la detección JCV

Preparen + 1 tubos (n es el número de reacciones) de la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen	Final concentración
PCR BufferII 10x	5µl	10mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)
MgCl ₂ 25mM	3µl	1.5mM KCl
DNTPs 25 mM	0.5µl	1mM
Primer R	1µl	3.5µM
Primer F	1µl	3.5µM
Taq pol 5U/µl	0.4µl	2U
Agua	38.1µl	

Añadir 1µl del ADN amplificado en la primera ronda de PCR en un tubo que contiene 0.2µl 49µl de la mezcla Nested-PCR.

- Mezclar bien
- Centrifugar durante 10 segundos
- Incubar: 2 min a 95°C

15s a 95°C / 30s a la temperatura de hibridación de los cebadores / 1 min 72 ° C 29 ciclos, 5 min 72 ° C

El ciclo térmico de la mezcla de amplificación se realizó en un bloque de calor programable Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer).

* Todos los reactivos de PCR y tubos que contienen las reacciones de PCR deben mantenerse en hielo o en un refrigerador.

Los resultados deben ser analizados en un 1,5% (primera ronda de PCR) y el 3% de electroforesis (Nested PCR) en gel de agarosa usando bromuro de etidio como mancha.

El control de calidad del método de amplificación. Para reducir la probabilidad de contaminación de la muestra por las moléculas de ADN amplificados, se aplicaron las precauciones estándar en todas las manipulaciones. Áreas separadas de laboratorio se utilizaron para reactivos, tratamiento de las muestras y la manipulación de muestras amplificadas. Todas las muestras se analizaron dos veces en experimentos independientes, y un control negativo se añadieron cada dos muestras (un control negativo es una mezcla de reacción de amplificación con los mismos reactivos como en los tubos de ensayo de las muestras pero sin el inóculo de ácidos nucleicos virales). Directa y una dilución de diez veces de los extractos de ácido nucleico se analizaron rutinariamente en muestras altamente contaminadas con el fin de evitar falsos negativos debido a la inhibición de las reacciones.

PARTE II

II.1 RESULTADOS:

Los resultados están divididos en tres capítulos:

Capítulo I: Caracterización geográfica-ambiental de tipos de agua relacionados con el uso y consumo humano.

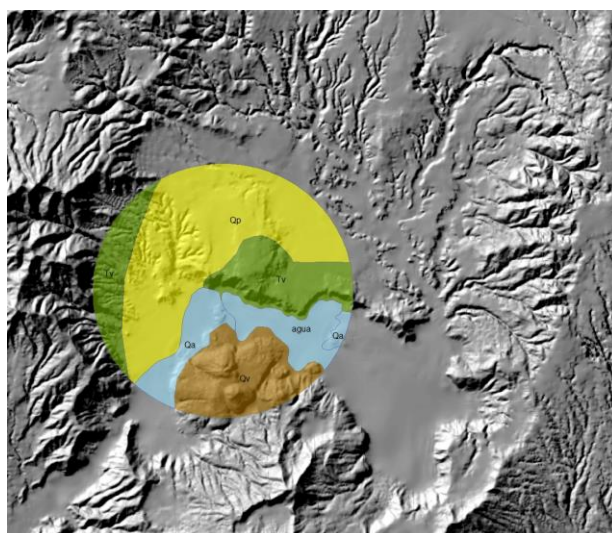
En cada sitio que se evaluó, se realizó una caracterización geográfico-ambiental a escala local, con esto se pretende brindar información espacial de los componentes ambientales que pueden dar indicios sobre los parámetros evaluados en las muestras de agua por parte del proyecto de investigación. En cada punto se realizó un “buffer” de 5 km (circular) y sobre esto se obtuvieron datos geográficos de suelos, cuencas, cobertura y uso del suelo, geología, relieve, clima y aspectos socio-económicos.

A. Lugar Evaluado: Muelle Público del Lago de Amatitlán.

Localización: Municipio de Amatitlán, Departamento de Guatemala

Ubicación Geográfica:

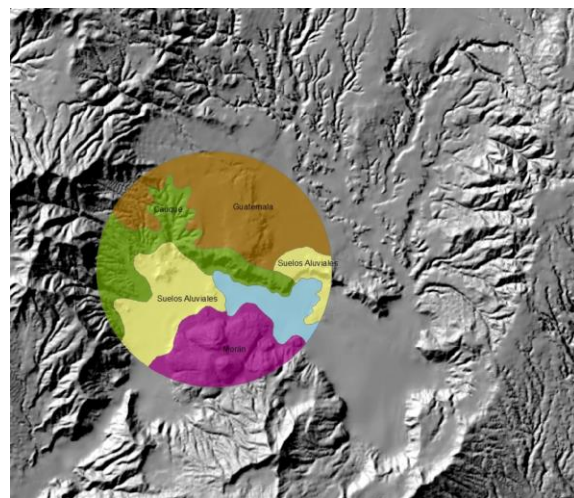
El área local alrededor del punto de análisis se observa en la figura siguiente:



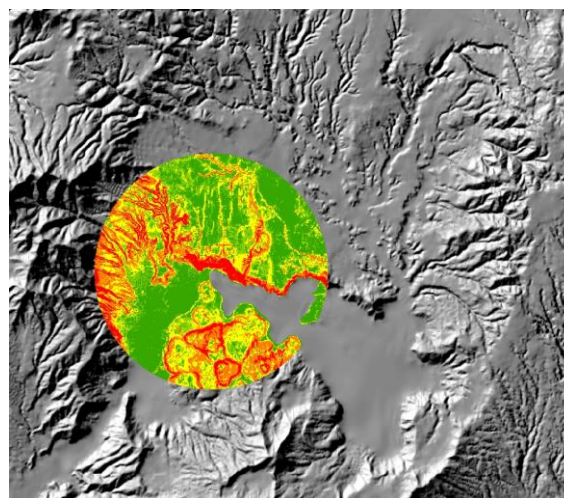
En la misma se puede observar los diferentes tipos rocas que se encuentran, cercanas a este punto. La capa geológica proviene del mapa 1:250,000 producido por el MAGA. Como se observa en la imagen las rocas que predominan en el área local son las cuaternarias de tipos Qa, Qp y Qv. Estas se componen de aluviones del cuaternario, rellenos de cenizas pómez (pumicitas), coladas de lava, tobas, lahares y edificios volcánicos. Las rocas del terciario que se encuentran expuestas por donde finaliza el teleférico de Amatitlán son de tipo Rocas volcánicas sin dividir. En éstas se

incluyen tobas, coladas de lava, material lahárico, y sedimentos volcánicos del Mio-Plioceno. El resto es el cuerpo de agua del lago con áreas de aluviones.

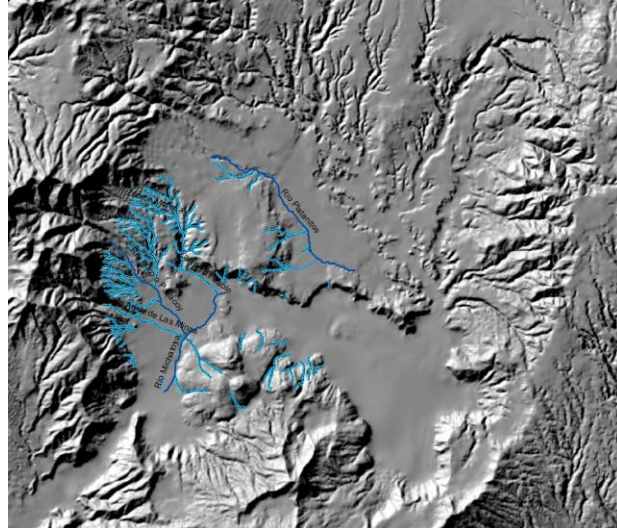
Con la capa de cuencas 1:50,000 del MAGA se encontró a qué cuenca pertenece el área que está dentro del límite local establecido. En general las aguas drenan hacia la cuenca del río María Linda y a lo interno se encuentran dos cuencas: la del río Villalobos y la propiamente del Lago de Amatitlán. Con las capas de suelos 1:250,000 se encontró a qué tipo de suelos según la clasificación de Simmons, Tárano y Pinto se encuentran dentro del límite. En esta predomina la serie Guatemala caracterizada por buen drenaje, relieve plano a ondulado, riesgo de erosión bajo. Le siguen las series Cauqué y los suelos aluviales que también presentan buen drenaje, patrón de relieve ondulado ha inclinado, pero con un riesgo de erosión alto. Finalmente la Serie Morán con relieve inclinado a ondulado, buen drenaje, y riesgo de erosión bajo. Estos datos se observan en la siguiente figura:



Con el modelo digital de elevación se calcularon los siguientes elementos del relieve: ángulo de la pendiente. Esto permite tener cierta inferencia sobre procesos ecológicos como el flujo del agua, erosión, transporte de sedimentos y otros. La escala utilizada fue de 1:50,000. Este cálculo fue realizado con herramientas que vienen incluidas en software de sistemas de información geográfica. El área contiene todo un par de clases de pendientes (en %) con un predominio de las clases de 0 a 5% (verde oscuro)

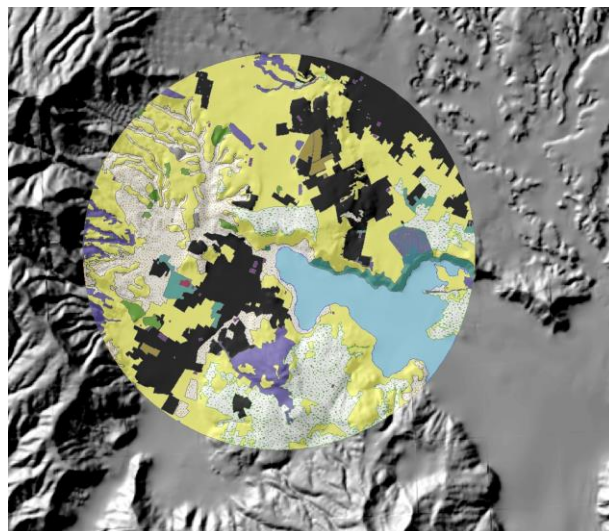


El clima predominante es BB' pero también existe el CB' es decir, que predominan áreas húmedas y semi-cálidas pero encontramos también áreas semi-secas semi-cálidas. En cuanto a la hidrografía, el área cuenta con 67 corrientes de agua intermitentes, ríos perennes menores a 18 metros de ancho y acequias perennes menores a 25 metros de ancho. La longitud total de las corrientes de agua es de 720.2 kilómetros. La media de longitud es de 10.7 km. Estos se pueden observar en la figura siguiente:

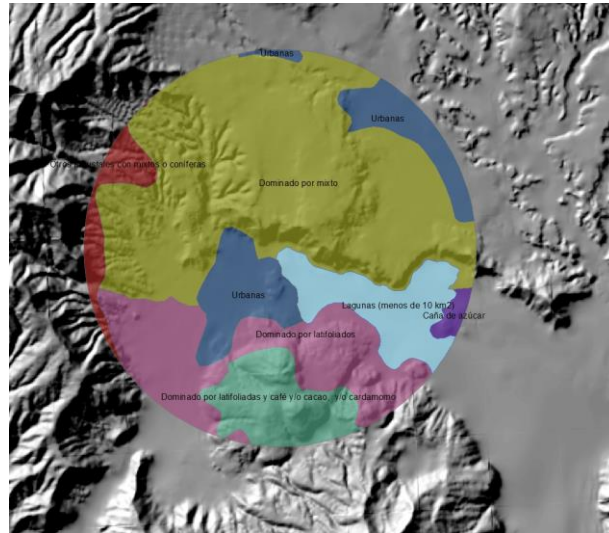


El concepto de “Uso de la Tierra” se refiere a las actividades que el hombre emprende en un cierto tipo de cobertura de la tierra para producir, cambiarla o mantenerla. Establece una relación directa entre la cobertura de la tierra y las acciones del hombre en su medio ambiente. La cobertura y uso de la tierra es un elemento geográfico que puede formar una base de referencia para diversas aplicaciones que van desde el monitoreo forestal, agrícola y pastoril, pasando por la generación de estadísticas, planificación, inversión, biodiversidad, cambio climático, hasta el control de la desertificación, entre otras cosas. Siguiendo con la misma metodología se estableció el uso de la tierra en los 5 km de área local del punto donde se tomó la muestra.

En la siguiente figura se observan los usos identificados cercanos al punto evaluado. Predominan el uso urbano (negro) y claros (amarillo) así como plantaciones y bosques dispersos (fondo de puntos verdes y cafés).



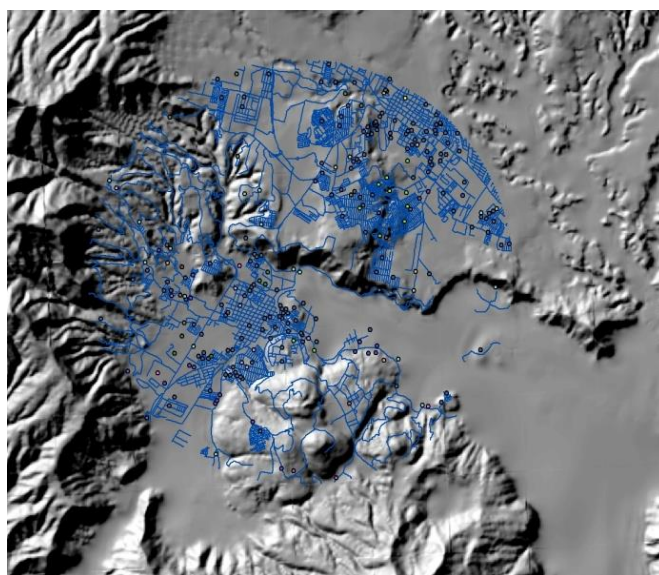
Los ecosistemas vegetales potenciales, fueron obtenidos de la clasificación de UNESCO, esta es una información como referente sobre cuáles serían los ecosistemas que existieron o que existen (remanentes naturales) dentro del área, el mapa anterior muestra la realidad actual. Aquí predominan los bosques dominados por mixto y le siguen los dominados por latifoliados, en menor área están los latifoliados con café y bosques con mixtos o coníferas.



Con la información que tiene el instituto nacional de estadística –INE- se procedió, por medio de procedimientos estándar en software SIG, a identificar aspectos sociales que se relacionan con el ambiente dentro del límite local establecido de 5 km alrededor del punto de muestreo. Con esta información se obtuvieron datos de población y de las carreteras lo cual podría influir en los resultados tomados en relación al agua y virus.

En el aspecto de la red vial, se contabilizaron 55 segmentos de diferentes tipos como senderos, pavimentados de una y dos vías, no pavimentados de una y dos vías, autopistas, calles en áreas urbanas y calles en construcción. La longitud total fue de 1,553.34 km., con caminos de longitud mínima de 0.075 km y máxima de 359.73 km.

En el caso de población, se obtuvieron los siguientes datos enfocados en la cantidad de centros poblados que están dentro del perímetro escogido. La información sostiene que habitan esa área 159,425 habitantes urbanos y 42,490 habitantes rurales. Estos se encuentran en 4 aldeas, 11 asentamientos, 16 caseríos, 1 cantón, 164 colonias urbanas, 23 fincas, 2 granjas, 3 lotificaciones, 1 paraje, 1 parcelamiento, 7 pueblos, 1 villa y 6 residenciales.



Estos son los resultados de la caracterización geográfica-ambiental local de los sitios muestreados.

En cada sitio que se evaluó, se realizó una caracterización geográfico-ambiental a escala local, con esto se pretende brindar información espacial de los componentes ambientales que pueden dar indicios sobre los parámetros evaluados en las muestras de agua por parte del proyecto de investigación. En cada punto se realizó un “buffer” de 5 km (circular) y sobre esto se obtuvieron datos geográficos de suelos, cuencas, cobertura y uso del suelo, geología, relieve, clima y aspectos socio-económicos.

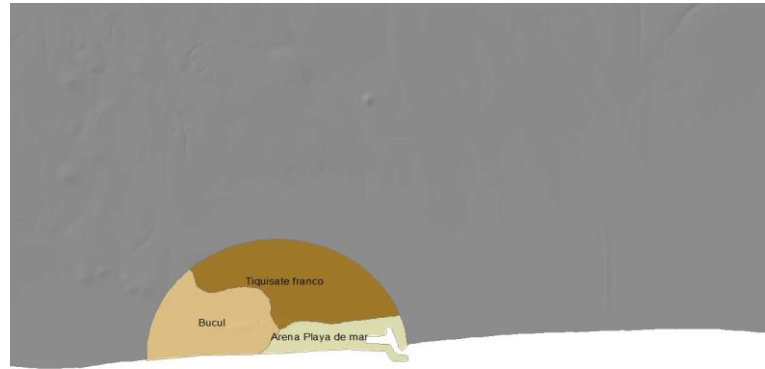
B. Lugar Evaluado: Puerto de San José

Localización: Municipio de San José, Departamento de Escuintla

Ubicación Geográfica: Longitud -90.829341 Latitud 13.915020

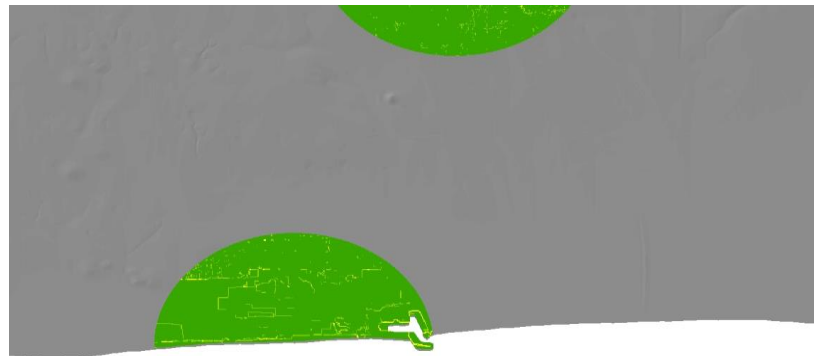
La geología que se encuentra cerca de este punto es muy simple. La capa geológica proviene del mapa 1:250,000 producido por el MAGA. Las rocas que dominan en el área local son las cuaternarias de tipos Qa, es decir los aluviones del cuaternario producto de la erosión y acumulación río arriba.

Con la capa de cuencas 1:50,000 del MAGA se encontró a qué cuenca pertenece el área que está dentro del límite local establecido. En general las aguas drenan hacia la cuenca del río Maria Linda en su totalidad. Con las capas de suelos 1:250,000 se encontró a qué tipo de suelos según la clasificación de Simmons, Tárano y Pinto se encuentran dentro del límite. En esta predomina la serie Tiquisate Franco caracterizada por buen drenaje, relieve casi plano, con riesgo de erosión bajo y potencial de fertilidad alta. Le siguen las series Bucul y las arenas de playa. Estos datos se observan en la siguiente figura:

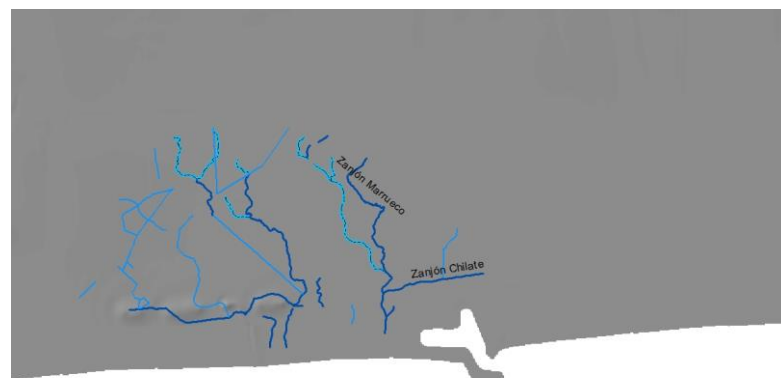


Con el modelo digital de elevación se calculó el ángulo de pendiente. Esto permite tener cierta inferencia sobre procesos ecológicos como el flujo del agua, erosión, transporte de sedimentos y otros. El área contiene todas las clases de pendientes (en %) con un predominio de las clases de 0 a 5% (verde oscuro)

Aquí se mira la distribución de la pendiente en el sitio de toma de muestras de agua:

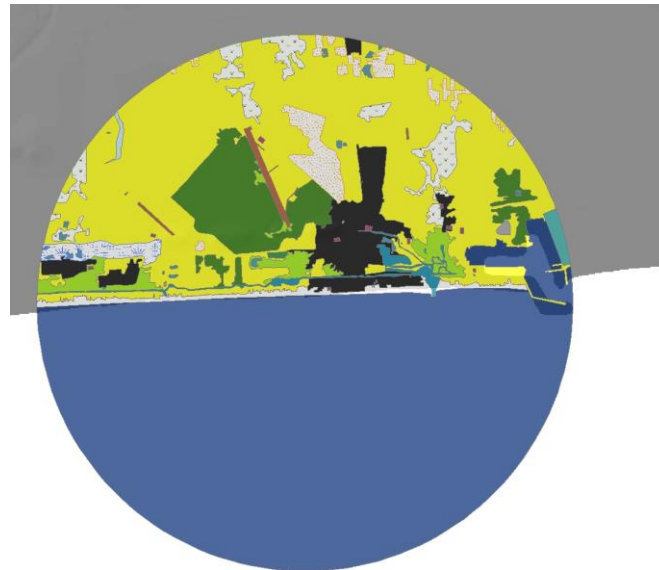


El clima predominante es BA´ es decir, que predominan áreas húmedas y cálidas. En relación a la hidrografía, el área cuenta con 7 corrientes de agua intermitentes, ríos perennes menores a 18 metros de ancho y acequias perennes menores a 25 metros de ancho. La longitud total de las corrientes de agua es de 44.89 kilómetros. La media de longitud es de 6.41 km.

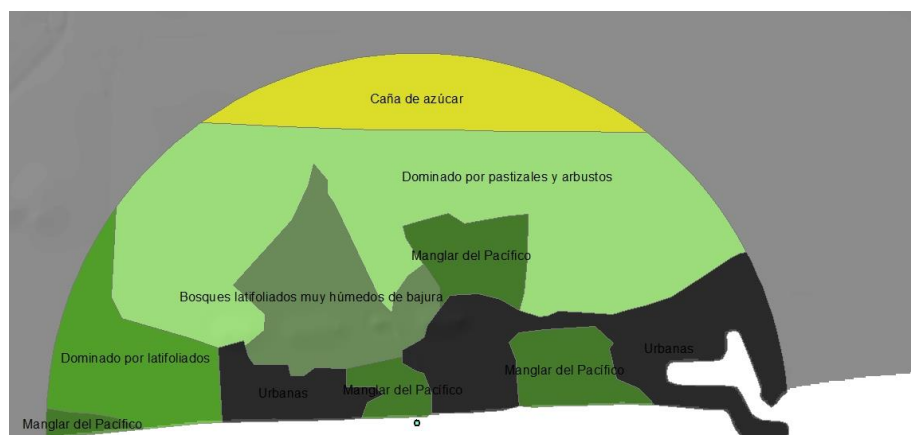


La cobertura y uso de la tierra es un elemento geográfico que puede formar una base de referencia para diversas aplicaciones que van desde el monitoreo forestal, agrícola y pastoril, pasando por la generación de estadísticas, planificación, inversión, biodiversidad, cambio climático, hasta el control de la desertificación, entre otras cosas. Siguiendo con la misma metodología se estableció el uso de la tierra en los 5 km de área local del punto donde se tomó la muestra.

En la siguiente figura se observan los usos identificados cercanos al punto evaluado. Predominan los claros (amarillo, que podrían ser cultivos de caña) así como bosques (verdes) manglares (verde claro) y centros urbanos (negro).



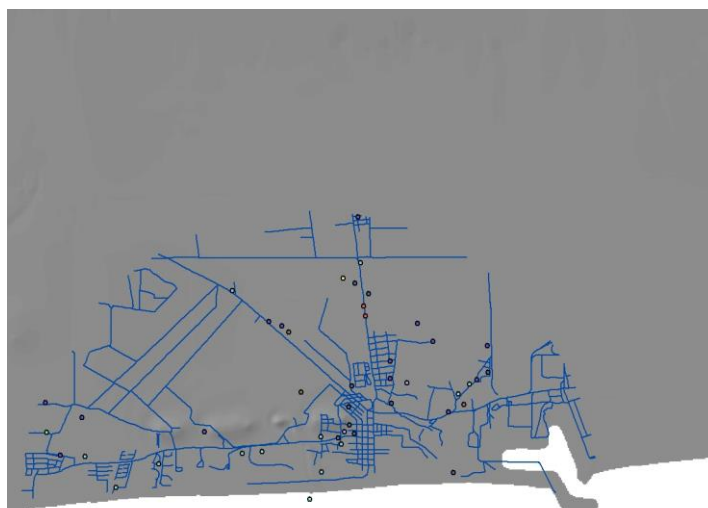
Los ecosistemas vegetales potenciales, fueron obtenidos de la clasificación de UNESCO, esta es una información como referente sobre cuáles serían los ecosistemas que existieron o que existen (remanentes naturales) dentro del área, el mapa anterior muestra la realidad actual. En el sitio de estudio predominan los ecosistemas dominados por pastizales, le siguen la caña de azúcar y el manglar del pacífico. Así se observa la figura:



Con la información que tiene el instituto nacional de estadística –INE- se procedió, a identificar aspectos sociales que se relacionan con el ambiente dentro del límite local establecido de 5 km alrededor del punto de muestreo. Con esta información se obtuvieron datos de población y de las carreteras.

En el aspecto de la red vial, se contabilizaron 9 segmentos de diferentes tipos como 1 sendero, 1 pavimentado de una y 1 de dos vías, 1 no pavimentado de una y 1 no pavimentado de dos vías, autopistas y calles en áreas urbanas. La longitud total fue de 132.27 km., con caminos de longitud mínima de 0.99 km y máxima de 38.29 km.

En el caso de población, se obtuvieron los siguientes datos enfocados en la cantidad de centros poblados que están dentro del perímetro escogido. La información sostiene que habitan esa área 16,913 habitantes urbanos y 7,942 habitantes rurales. Estos se encuentran en 1 aldea, 12 caseríos, 3 sin definir, 10 colonias urbanas, 14 fincas, 1 hacienda, 2 labores, 12 pueblos. Ver la figura siguiente:



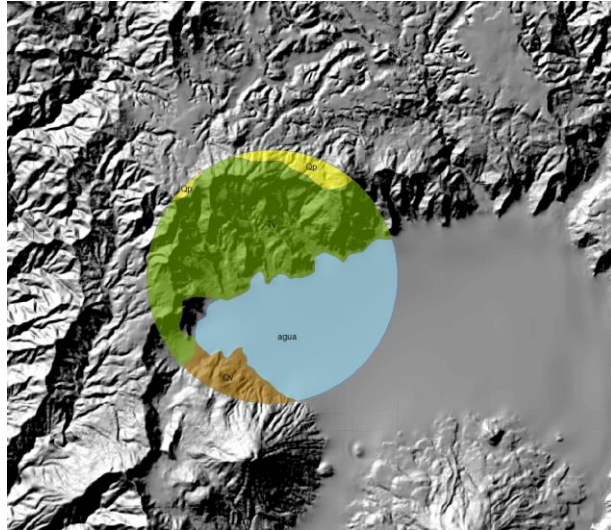
En cada sitio se realizó una caracterización geográfico-ambiental a escala local, con esto se pretende brindar información espacial de los componentes ambientales que pueden dar indicios sobre los parámetros evaluados en las muestras de agua por parte del proyecto de investigación. En cada punto se construyó el espacio local a partir de un “buffer” de 5 km (circular) y sobre esto se obtuvieron datos geográficos de suelos, cuencas, cobertura y uso del suelo, geología, relieve, clima y aspectos socio-económicos.

C. Lugar Evaluado: Lago de Atitlán, San Marcos La Laguna

Localización: Municipio de San Marcos La Laguna, Departamento de Sololá

Ubicación Geográfica: Longitud -91.259040 Latitud 14.721554

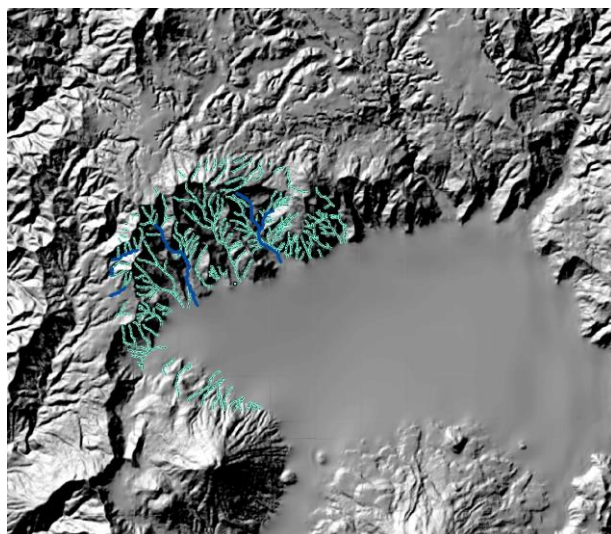
A continuación se describe lo encontrado en relación a los componentes geográfico-ambientales que están cerca del punto de muestra de agua. Empezamos por la descripción geológica del lugar y así continuamos con el resto de componentes del paisaje circundante.

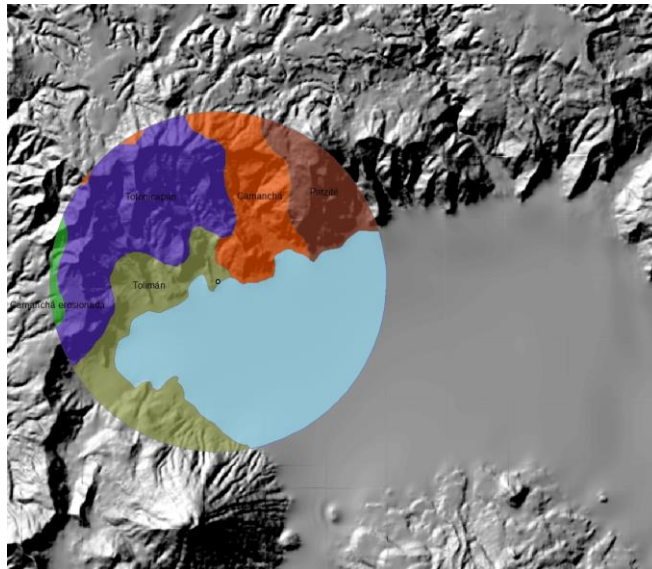


Como se observa en la figura las rocas del terciario volcánicas son las que predominan el área (en verde) luego las tocas cuaternarias Qv y finalmente en menor área las Qp e I. las dominantes son: Rocas volcánicas sin dividir. Predominantemente Mio-Plioceno. Incluye tobas, coladas de lava, material lahárico, y sedimentos volcánicos. Las Qp e I son rellenos de ceniza pómez de diversa edad y Rocas plutónicas sin dividir que incluye granitos y dioritas de edad pre-Pérmico, Cretácico y Terciario, respectivamente.

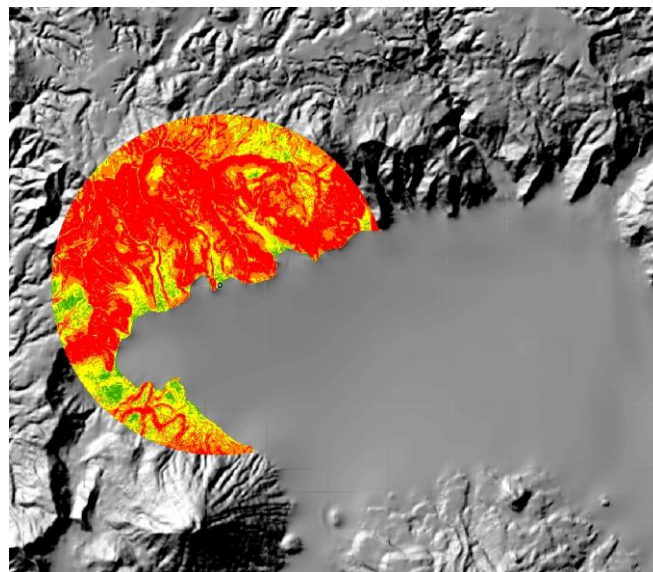
Con la capa de cuencas 1:50,000 del MAGA se encontró hacia dónde fluyen las corrientes de agua, es decir, a qué cuenca pertenece el área que está dentro del límite local establecido. En general las aguas drenan hacia la cuenca del Lago de Atitlán y una pequeña parte hacia el río Nahualate.

De acuerdo a la clasificación de suelos de Simmons, Tárano y Pinto se encuentran dentro del límite las diferentes series de suelos. En esta predomina la serie Totonicapán que presenta caracterizada por buen drenaje, relieve suavemente inclinado ha ondulado, con riesgo de erosión alto. Le siguen las series Tolimán, Patzité, Camanchá. Estos datos se observan en la siguiente figura





A partir del modelo digital de elevación se calculó el ángulo de pendiente. Esto permite relacionar diferentes aspectos sobre procesos ecológicos como el flujo del agua, erosión, transporte de sedimentos y otros. El área contiene todas las clases de pendientes (en %) con un predominio de las clases significativo de las pendientes mayores a 55%.

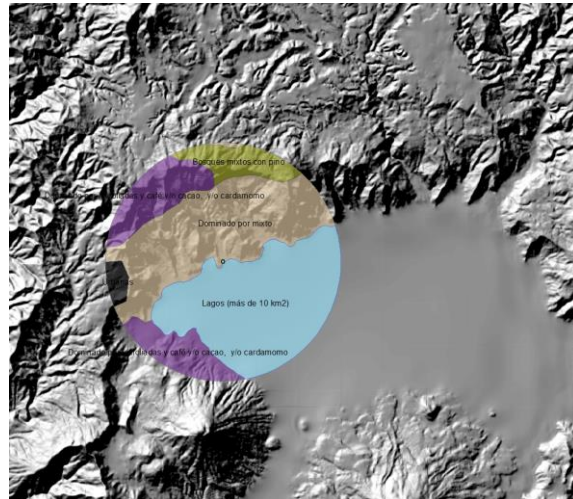


En San Marcos la Laguna, el clima predominante es BBA'2 es decir, que tiene mayoría en las áreas húmedas y templadas, mientras que el clima que se encuentra en menor proporción el BB'3.

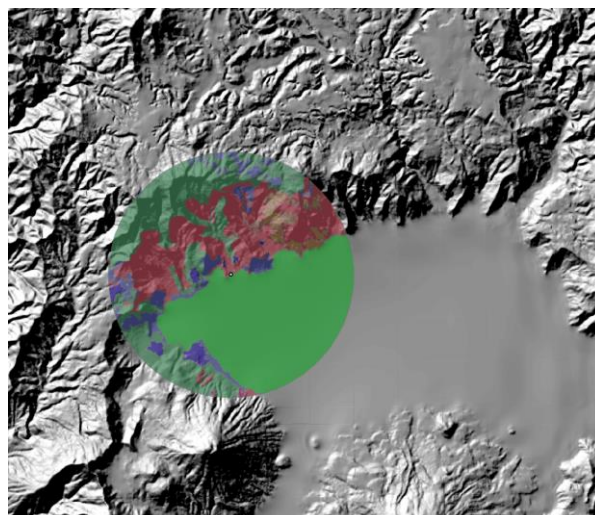
En relación a la hidrografía, el área cuenta con 10 corrientes de agua intermitentes y ríos perennes menores a 18 metros de ancho. La longitud total de las corrientes de agua es de 145.73 kilómetros. La media de longitud es de 14.57 km. En la siguiente figura se observa la hidrografía del área local circundante al río:

La cobertura y uso de la tierra es un elemento geográfico que puede formar una base de referencia para diversas aplicaciones. Siguiendo con la misma metodología se estableció el uso de la tierra en los 5 km de área local del punto donde se tomó la muestra.

En la siguiente figura se observan los usos identificados cercanos al punto evaluado. Predominan los bosques (amarillo, que podrían ser cultivos de caña) y los árboles dispersos.



Los ecosistemas vegetales potenciales, fueron obtenidos de la clasificación de UNESCO, esta es una información como referente sobre cuáles serían los ecosistemas que existieron o que existen (remanentes naturales) dentro del área, el mapa anterior muestra la realidad actual. En el sitio de estudio predominan los ecosistemas bosques dominados por mixto, en menor área los dominados por latifoliadas y con café. Así se observa la figura.

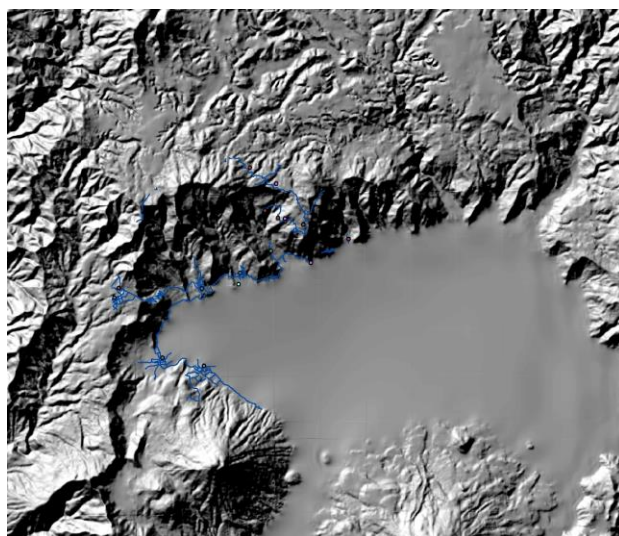


A partir de la información que tiene el instituto nacional de estadística –INE- se procedió, a identificar aspectos sociales que se relacionan con el ambiente dentro del

límite local. Con esta información se obtuvieron datos de población y de las carreteras.

En el aspecto de la red vial, se contabilizaron 6 segmentos de diferentes tipos como 1 sendero, 1 pavimentado de una y 1 de dos vías, 1 no pavimentado de una y 1 no pavimentado de dos vías, autopistas y calles en áreas urbanas. La longitud total fue de 67.13 km., con caminos de longitud máxima de 17.99 km y mínima de 2.89 km.

En el caso de población, se obtuvieron los siguientes datos enfocados en la cantidad de centros poblados que están dentro del perímetro escogido. La información sostiene que habitan esa área 25,902 habitantes urbanos y 3,990 habitantes rurales. Estos se encuentran en 1 aldea, 6 caseríos, 5 pueblos y 3 sin definir. Ver la figura siguiente



En cada sitio que se evaluó, se realizó una caracterización geográfico-ambiental a escala local, con esto se pretende brindar información espacial de los componentes ambientales que pueden dar indicios sobre los parámetros evaluados en las muestras de agua por parte del proyecto de investigación. En cada punto se realizó un “buffer” de 5 km (circular) y sobre esto se obtuvieron datos geográficos de suelos, cuencas, cobertura y uso del suelo, geología, relieve, clima y aspectos socio-económicos.

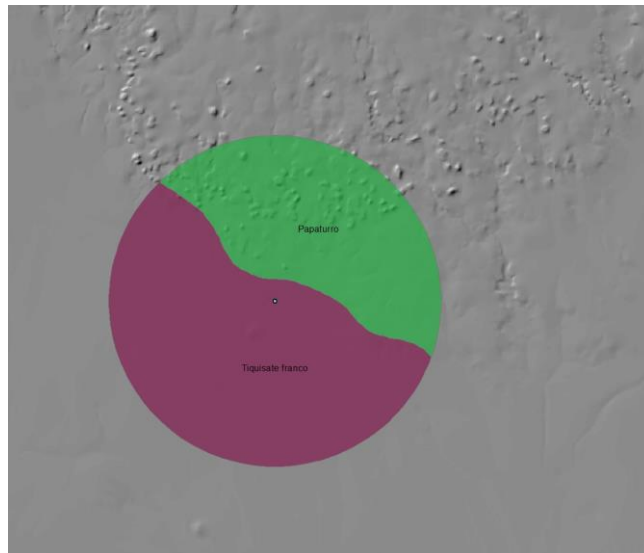
D. Lugar Evaluado: Río Las Pozas, Km53 carretera al Pacífico
Localización: Municipio de Escuintla, Departamento de Escuintla
Ubicación Geográfica: Longitud -90.801312 Latitud 14.095840

Se procede a la descripción de los componentes geográfico-ambientales que están cerca del punto de muestra de agua. Se inicia con la descripción geológica del lugar y luego con el relieve, hidrografía, clima, suelos, vegetación y uso del suelo para finalizar con población y vías de transporte.

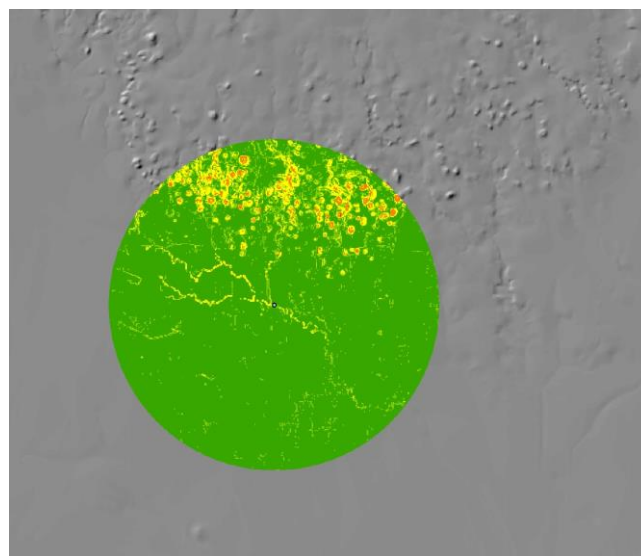
En el caso de la geología, el 100% del material es de origen volcánico del cuaternario formado por aluviones que son depositados por efecto de la bocacosta proveniente de la cadena volcánica y el efecto de los ríos. En relación a su posición dentro del sistema de cuencas, el punto pertenece a la cuenca del Río María Linda.

Esta misma posición dentro de la costa pacífica hace que su clima predominante sea el BA´o cálido húmedo.

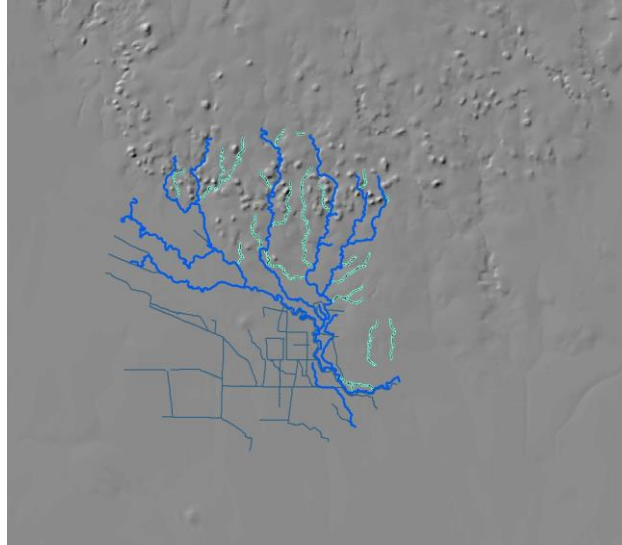
En relación a los suelos presente dos series: Tiquizate franco que es el que domina con un 60% aproximadamente es presenta características como buen drenaje, relieve casi plano, profundidad efectiva de 100cm, potencial de fertilidad alto y riesgo de erosión bajo. La otra serie es la Papaturo, relieve plano, con drenaje pobre, profundidad efectiva de 100 cm, fertilidad baja y riesgo de erosión bajo. La distribución de estas series se puede observar en la siguiente figura.



En el aspecto más importante del relieve, se calculó el ángulo de pendiente, a partir del modelo digital de elevación. Este aspecto es importante pues está relacionado con diferentes aspectos del funcionamiento ecológicos como el flujo del agua, erosión, transporte de sedimentos y otros. El área contiene todas las clases de pendientes (en %) con un predominio de las clases significativo de las pendientes entre 0 y 55% lo que lo significa que posee más relieve plano alrededor del punto. En el caso de las inclinaciones pronunciadas éstas se encuentran localizadas de manera puntual tal y como se observa en la figura (en color rojo):

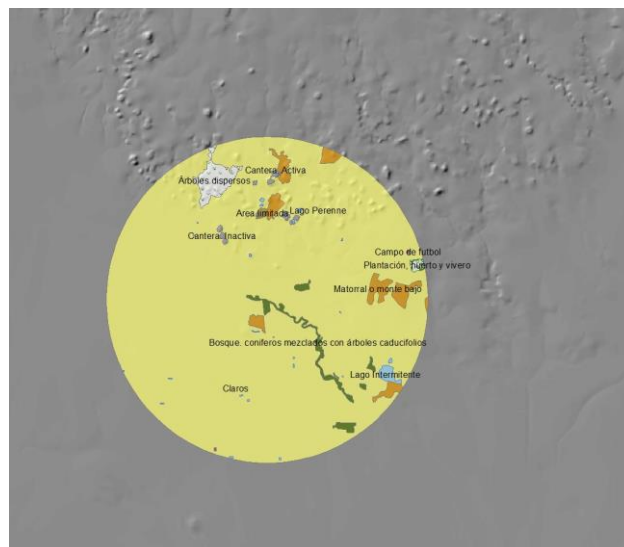


En relación a la hidrografía, el área local cercana al punto presenta 15 segmentos que corresponden a corrientes de agua intermitentes, ríos perennes menores a 18 metros de ancho y acequias perennes menores a 25m. La longitud total de las corrientes de agua es de 153.37 kilómetros. La longitud media es de 10.22 km. En la siguiente figura se observa la hidrografía del área local circundante al río:



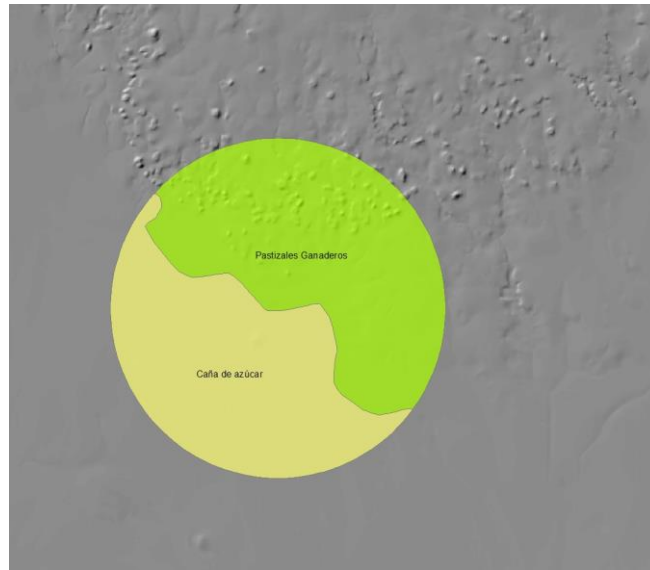
En términos de cobertura y uso de la tierra, este es un elemento geográfico importante puesto que relaciona el potencial ecológico del lugar con las actividades económicas reflejadas en una cobertura distinta y puede servir para diversas aplicaciones. Siguiendo con la misma metodología se estableció el uso de la tierra en los 5 km de área local del punto donde se tomó la muestra.

En este caso se observan los usos identificados cercanos al punto evaluado. Predominan los claros en un 80% aproximadamente del área evaluada, en menor proporción hay matorrales y bosques ribereños.



Los ecosistemas vegetales potenciales, fueron obtenidos a partir de una capa que contiene las clases propuesta por la UNESCO, esta es una información como referente sobre cuáles serían los ecosistemas que existieron o que existen (remanentes naturales) dentro del área. En el sitio de estudio predominan los ecosistemas de

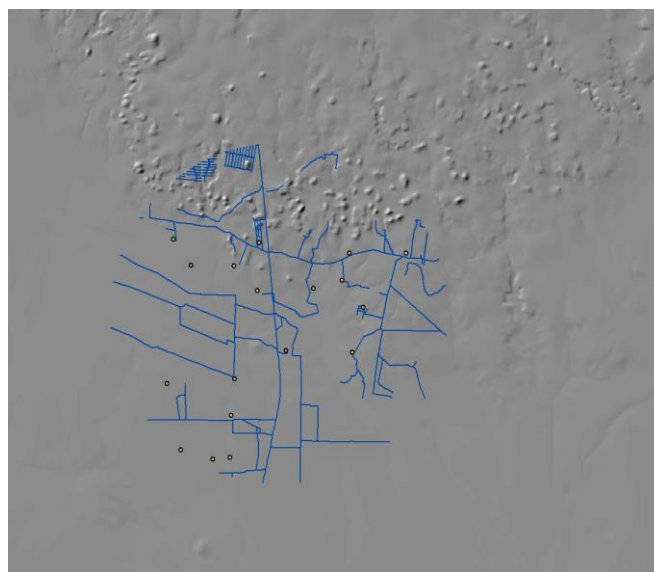
vegetación antrópica_ pastizales ganaderos y caña de azúcar. Así se observa la distribución de estos en la siguiente figura.



Información importante como la red de camino y la población cercana al punto de muestreo se obtuvo a partir de la información que tiene el instituto nacional de estadística –INE–.

En el aspecto de la red vial, se contabilizaron 9 segmentos de diferentes tipos como sendero, vereda, rodera, pavimentado de dos vías, no pavimentados de una y de dos vías, autopistas y calles en áreas urbanas. La longitud total fue de 119.96 km., con caminos cuya longitud máxima es de 25.44 km y mínima de 3.1 km.

En el caso de población, se obtuvieron los siguientes datos enfocados en la cantidad de centros poblados que están dentro del perímetro escogido. La información sostiene que habitan esa área 1,319 todos, habitantes rurales. Estos se encuentran en 2 haciendas, 1 caserío, 14 fincas y 1 sin definir. Ver la figura siguiente.



Capítulo II: Evaluación de metodologías diagnosticas de punta para la concentración de virus en biología molecular.

Los adenovirus humanos (HAdV) son excretados en las heces fecales y orina por la mayoría de la población incluso sin presentar un cuadro clínico, estos además y en comparación con *E. coli* los enterococos fecales son estables a las condiciones del medio ambiente y a métodos convencionales de desinfección. Debido a estas características, los HAdV han sido propuestos como una nueva generación de indicadores de contaminación fecal humana en el medio ambiente.

En el presente proyecto se logró transferencia de conocimientos y tecnología por parte de el Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua y Alimentos de la Universidad de Barcelona para poder detectar a los HAdV y otros virus entericos de interes clinico en el medio ambiente . Esto permitió la implementación de la metodologia para detectar virus patogenos humanos en agua, a traves de Procedimientos Operativos Estándares (POES) para: (i) la toma de la muestras, (ii) concentración de los virus en la muestra, (iii) extracción de ADN/ARN y (iv) la detección y cuantificación de genomas viricos a traves de ensayos de biología molecular como la PCR anidada y la PCR cuantitativa con tecnología Taq®Man. Para el establecimiento de estos POES se procedió como se describe a continuacion:a) La transferencia de tecnologia se dio de parte del laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad de Barcelona, por expertos en el tema, consistio en: Dos capacitaciones teorico-practicas del personal involucrado en el proyecto, dicha capacitacion se realizo en el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala.

a) Dos capacitaciones teorico-practica para los investigadores guatemaltecos, en Guatemala, por parte de investigadores de la contraparte en Barcelona.

Esto se realizó en dos eventos durante la duracion del proyecto. La primera capacitacion fue en un curso de 40 horas donde se trataron temas para entender el comportamiento de los virus patogenos en el medio ambiente, asi como tambien fundamentos fisico-quimicos de las tecnicas moleculares empleadas y actividades practicas con los protocolos propuestos. La segunda capacitacion de 40 horas, se abordaron aspectos experimentales, interpretacion de resultados y solucion de problemas (Fotografias No. 1 y 2). Es importante tener en cuenta que en este punto se procedio a adaptar la metodologia de concentracion de virus de la version original ya que se presentaron problemas tecnicos con la centrifuga requerida, y no fue posible encontrar una solucion en ningun laboratorio de investigacion o docencia en Guatemala.

b) Ensayos Intra-laboratorio en Guatemala para validar la metodologia.

b.1) Reproducibilidad del metodo de concentracion

Para estos ensayos se colectaron muestras de un volumen de 10 L de agua de rio, lago y mar. Un total de 3 muestras de cada tipo de agua se contaminó artificialmente con una solucion de concentracion conocida de adenovirus humanos y 3 muestras fueron tomadas como muestras blanco. Posteriormente se procedió a tratar las muestras para detectar los virus en las 6 muestras de cada tipo de agua. El porcentaje de recuperacion en cada muestra se definio tomando en cuenta la cantidad conocida de virus añadidos y la cantidad de adenovirus recuperados, en las muestras artificialmente contaminadas despues

de haber sido corregida con la cantidad de adenovirus autoctonos de las muestras blanco. Para evaluar la reproducibilidad del metodo se consideró el coeficiente de variación de los valores de recuperacion de las muestras artificialmente contaminadas, asi como tambien la desviacion estandar. Los resultados se muestran en la tabla 1 y 2.

Tabla No. 1. Resultados de la Precisión del Método de Concentración de Partículas Víricas en muestras de mar

Medidas de Dispersión	Resultado
Coefficiente de Variación (%)	129.98
Desviación Estándar	1.1073
Promedio	0.8519

Fuente: Datos experimentales, área de virologia UCREVE/LNS.

Tabla No. 2.

Origen	Muestra	Porcentaje de Recuperación (%)
Mar	1	0.0452
	2	0.1196
	3	0.2035
Lago	1	37.9881
	2	54.9054
	3	35.7123
Río	1	12.1259
	2	6.8282
	3	4.0832
Pozo	1	2.0305
	2	1.1601
	3	0.6325

Recuperación del método de concentración de partículas víricas (n=9)

Fuente: Datos experimentales, Virología, LNS, 2013

En la tabla No. 2 se presentan los resultados obtenidos en la recuperación de partículas víricas, se utilizaron tres muestras de orígenes diferentes (río, lago y mar). El porcentaje de recuperación se obtuvo de la diferencia de la muestra contaminada con estándar vírico de HAdV con un valor de 53,700,000Cg/L (muestra contaminada) menos la muestra sin contaminar (muestra blanco). Como se observa los resultados de recuperación para agua de mar son bajos en comparación con las muestras de río y lago.

b.2) Reproducibilidad de los ensayos de PCR cuantitativa:

Las soluciones estandar de ADN de adenovirus humanos proporcionadas por la contraparte en Barcelona fueron analizadas en Guatemala. Este estandar esta formado por diluciones seriadas 1:10 y comprende las cantidades de 1×10^0 hasta 1×10^6 copias de genomas en 10 μ L. En la Figura 1 se muestra que la recta patron obtenida para cuantificar cumple con los parametros adecuados para cuantificar ADN de adenovirus humano, presentando valores de correlacion cercanos a 1 y de pendiente cercanos a -3,00.

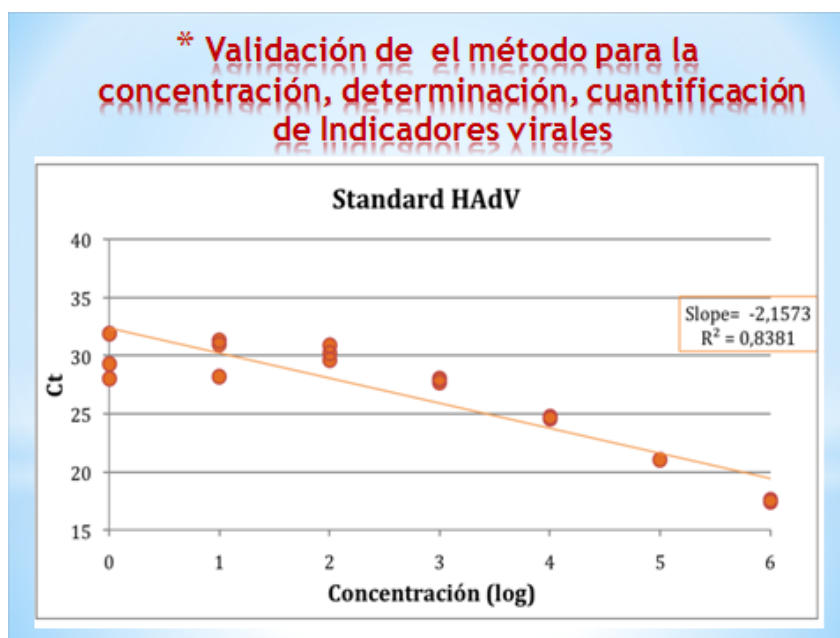
- c) Ensayos Intrer- laboratorio entre los laboratorios de Guatemala y Barcelona
 Replicas de las solución estandar de ADN de adenovirus fue evaluado bajo las mismas condiciones en Barcelona y Guatemala (Figura 1, 2 y 3). La comparación se realizó por medio de la prueba de hipotesis para diferencias pareadas por t de student, en donde: $H_0: \mu_d=0$ (μ_d = promedio de las diferencias), a un nivel de significancia alfa (α) de 0.05. Los resultados indicaron que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas curvas, porque lo que la validacion se considero adecuada.

Tabla No. 3. Tabla para prueba t de dos muestras equivalentes, para comparación de métodos

	<i>Ct, ESTÁNDAR BCN*</i>	<i>Ct, ESTÁNDAR LNS*</i>
Media	26.2679	25.4074
Desviación estándar	6.3750	4.8226
Diferencia de los promedios	0.8605	
Desviación estándar de las diferencias	2.6477	
Observaciones	19	19
P(T<=t) dos colas	0.1737	

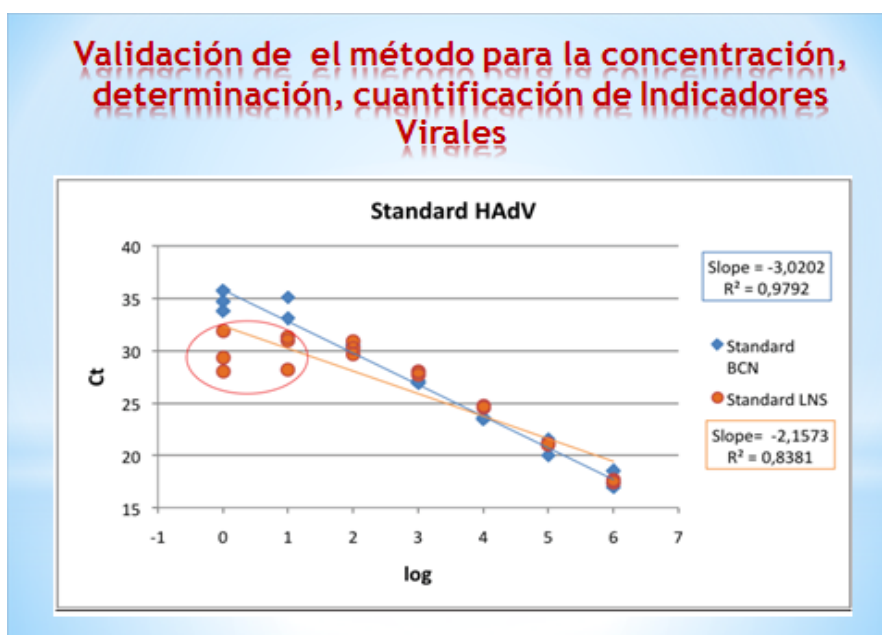
Fuente: Datos experimentales, Área de Virología Laboratorio Nacional de Salud Guatemala, Laboratorio de Aguas y alimentos, Universidad de Barcelona, 2013
 BCN* Barcelona LNS*Laboratorio Nacional de Salud

FIGURA 1



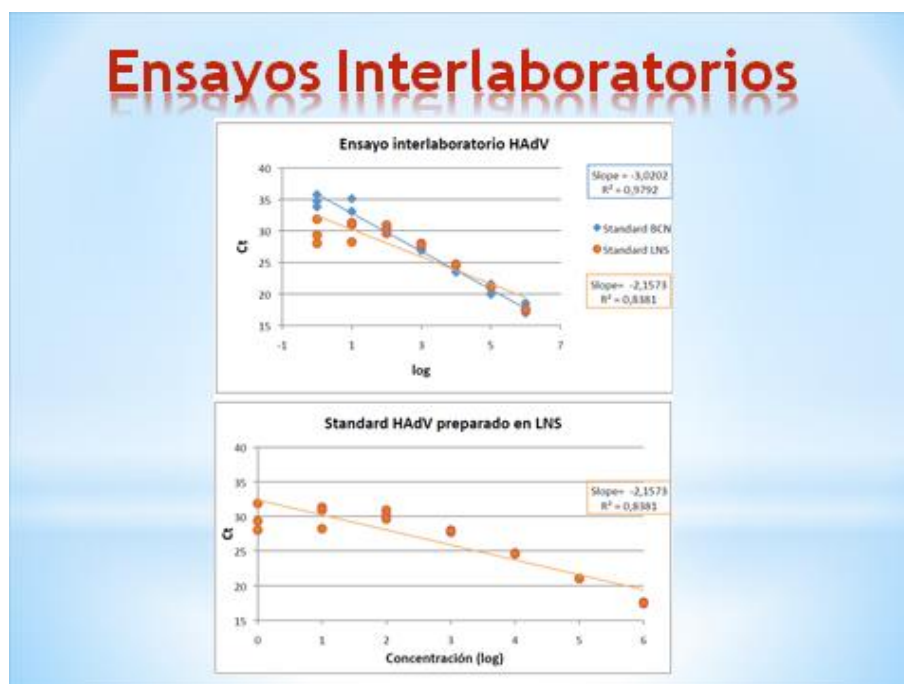
Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FIGURA 2



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FIGURA 3



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Después de haber validado la metodología a través de ensayos inter e intralaboratorio, se procedió a realizar los análisis de los diferentes muestreos que se realizaron en varias partes del país, a continuación se describen los resultados obtenidos

La tabla No. 3 describe la comparación entre el Laboratorio de la Universidad de Barcelona y el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala por medio de la t student, de la cual se puede inferir que es aceptable dado que el promedio de las diferencias es muy cercano a cero y que no hubo una diferencia significativa entre ambos laboratorios ($p = 0.1737$). Y también como muestra la figura No. 1.

En los Anexo 3 y 4, se puede observar que esta comparación presenta una buena precisión y exactitud, así como los resultados.

d) Toma de muestras para determinar la presencia de Adenovirus en muestras de río, mar, lago, agua residual y pozo en Guatemala.

Tabla No. 4. Muestras recolectadas en lagos

Tipo de muestra	Procedencia	Muestreo	No. de Muestras	Conc. (CG/L)
Lago	Lago de Amatitlán	06/06/2012	1	0
		26/07/2012	1	Negativo
			2	Negativo
			3	Negativo
			4	Negativo
			5	Negativo
			6	Negativo
		17/09/2013	1	5803.8
	2		Negativo	
	Lago Petén Itzá	17-may-12	1	0
	Atitlán (San Marcos la Laguna)	09-jul-13	1	Negativo
			2	Negativo
			3	80.83
	Mariscos	12-nov-12	1	0.34
			2	0.17
3			0.028	

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Tabla No. 5. Muestras recolectadas en Mar

Tipo de muestra	Procedencia	Muestreo	No. de Mx.	Conc. (CG/L)
Mar	Puerto Matías de Gálvez	14-nov-12	1	12.66
			2	Negativo
			3	0.013
	Puerto San José	11-may-12	1	Negativo
			2	Negativo
		25-jun-12	1	Negativo
			2	Negativo
			3	Negativo
			4	Negativo
			5	Negativo
			6	Negativo
		22-abr-13	1	2766.1
			2	Negativo
			3	4.14
			4	Negativo
			5	Negativo
			6	17.53
			7	Negativo
			8	Negativo
			9	705.86
			10	157.05
		23-may-13	1	272.6
			2	95.25
			3	15,041.20
4	11,157.10			
5	17,824.76			
17-sep-13	1	397.99		
	2	Negativo		
	3	Negativo		

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Tabla No. 6. Muestras recolectadas en Ríos

Tipo de muestra	Procedencia	Muestreo	No. de Mx.	Conc. (CG/L)
Río	Río la Gloria Amatitlán	06-jun-12	1	0
	Río Zepelá	13/05/2012	1	2152.79
	El Naranjo	17/09/2013	1	7568.3
			2	355.67
			3	8303.9
	Dulce	13/11/2012	1	1.46
			2	0.04
			3	0.007

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Tabla No. 7. Muestras recolectadas en Pozo y Tenerife

Tipo de muestra	Procedencia	Muestreo	No. de Mx.	Conc. (CG/L)
Pozo	Aposentos	10/07/2013	1	18.39
			2	3.836
			3	5.361
Tenería	Tenería Herrera	13-may-12	1	23,317.33
		25-jun-12	1	931.5
			2	Negativo
			3	Negativo
			4	Negativo
			5	Negativo
			6	Negativo

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

La presencia de microorganismos patógenos en agua de uso y consumo humano contaminada con residuos fecales representa un problema de salud pública y económico, especialmente en áreas donde la economía se basa en el turismo, como queda demostrado en este estudio, donde encontramos Adenovirus Humano, en el Lago de Amatitlán, en el Rio La Gloria (Amatitlán), Lago de Mariscos, (Izabal), San Marcos La Laguna (Lago de Atitlán), Puerto de San José, Puerto Matías de Gálvez, Rio Zepelá, Rio El Naranjo, Rio Dulce y agua de pozo Los Aposentos Chimaltenango.

De las 213 muestras recolectadas en 19 muestreos. En 77 de las muestras se identificó Adenovirus que son virus contaminantes del agua. Todas las muestras fueron analizadas por qPCRTaqMan®, dando valores de promedio de 1,904.84 CG/L. Así mismo el Puerto de San José, se le encontró JC polyomavirus.

CAPITULO III: Estudio sobre Gastroenteritis en Guatemala 2013-2014

Uno de los principales efectos sobre la salud se relaciona con el aumento de la contaminación del agua causada por las frecuentes inundaciones, las aguas residuales vertidas a aguas naturales, como ríos y lagos, que supone un aumento en la contaminación del agua para su uso y consumo humano y que se relaciona directamente con la tasa de enfermedades diarreicas, que actualmente matan a 2,2 millones de personas cada año (WHO-UNICEF. 2000).

Las gastroenteritis agudas son una de las enfermedades más comunes en los niños. Éstas se asocian a la deshidratación y constituyen la principal causa de hospitalización en los países desarrollados y la principal causa de mortalidad en los países en desarrollo (Tran, y otros, 2010).

Los virus entéricos han sido reconocidos como la principal causa etiológica de las gastroenteritis agudas, y se reconocen cuatro virus como relevantes: Rotavirus del grupo A, Norovirus genogrupos GI y GII, Adenovirus 40/41 (Subgénero F) y Astrovirus.

El Rotavirus del grupo A ha sido el principal causante de gastroenteritis y es el responsable del 29 al 45% de las hospitalizaciones por gastroenteritis a nivel mundial; recientemente también se ha demostrado que los Norovirus son la segunda causa más frecuente en la etiología de las gastroenteritis en niños y que incluso podría llegar a reemplazar en el primer lugar a Rotavirus. Por otro lado es posible encontrar coinfecciones en cualquier combinación de los virus antes mencionados (Tran, y otros, 2010). En el marco del proyecto se realizó una vigilancia relacionada con los virus transmitidos por agua y contaminación feco-oral y estos son los principales virus encontrados en muestras provenientes de pacientes menores de 5 años, como un indicador de la distribución de virus que están causando diarrea en nuestro país. Posteriormente, en todas las muestras negativas se buscó un virus que están causando diarrea en niños menores de 5 años, poco estudiado y se realizó un pool de muestras y a continuación se coloca los resultados de Klassevirus, ha habido bandas inespecíficas que no han permitido confirmar la presencia de Klassevirus, pero se trabaja en el protocolo de virus emergentes para esclarecer información de forma retrospectiva. También se han detectado por secuenciación en masa usando la plataforma 454 Titanium en muestras de agua residual de Nepal (Ng et al., 2012). En Guatemala tenemos que seguir mejorando el método de detección que será objeto de otro estudio de investigación, pero que en el presente proyecto sentamos las primeras bases para empezar a detectar.

Como podemos observar en la gráfica No. 2 que norovirus estuvo presente a lo largo de todos los meses durante los dos años que lo vigilamos, siendo los meses con más presencia de casos, enero, julio septiembre y noviembre, en estos meses hubo un aumento significativo relacionado con otros virus que vigilamos en el mismo periodo de tiempo.

Otro hallazgo importante que se puede observar en la tabla no. 9 son las coinfecciones, que fueron alrededor de 10, donde en algunas muestras de heces encontramos hasta 3 virus presentes en una sola muestra de heces, esto es indicativo

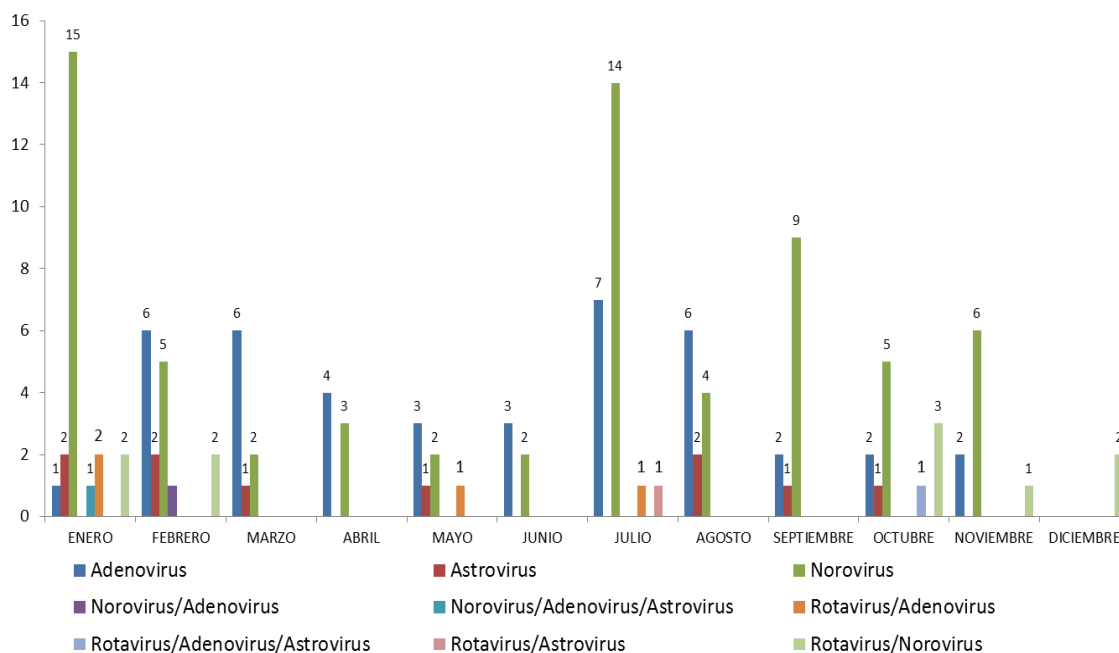
del alto grado de contaminación ambiental, que se puede encontrar en niños menores de 5 años, en este trabajo el área que más se vigiló, fue Guatemala Central (área de la capital y sus lugares cercanos).

Tabla No. 8 Estudio complementario sobre Gastroenteritis en Guatemala 2013-2014

Resultado	Chimaltenango	El Quiché	Escuintla	Guatemala Central	Izabal	Jalapa	Total
Adenovirus	1		1	9	1	2	14
Astrovirus				4			4
Noro/Adenovirus				1			1
Noro/Adeno/Astro				1			1
Norovirus		1		21	3	2	27
Rotavirus				8			8
Rota/Adeno/Astrovirus				1			1
Rotavirus/Norovirus				3			3
Total	1	1	1	48	4	4	59

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Gráfico No. 2 Estudio complementario sobre Gastroenteritis en Guatemala 2013-2014, por mes



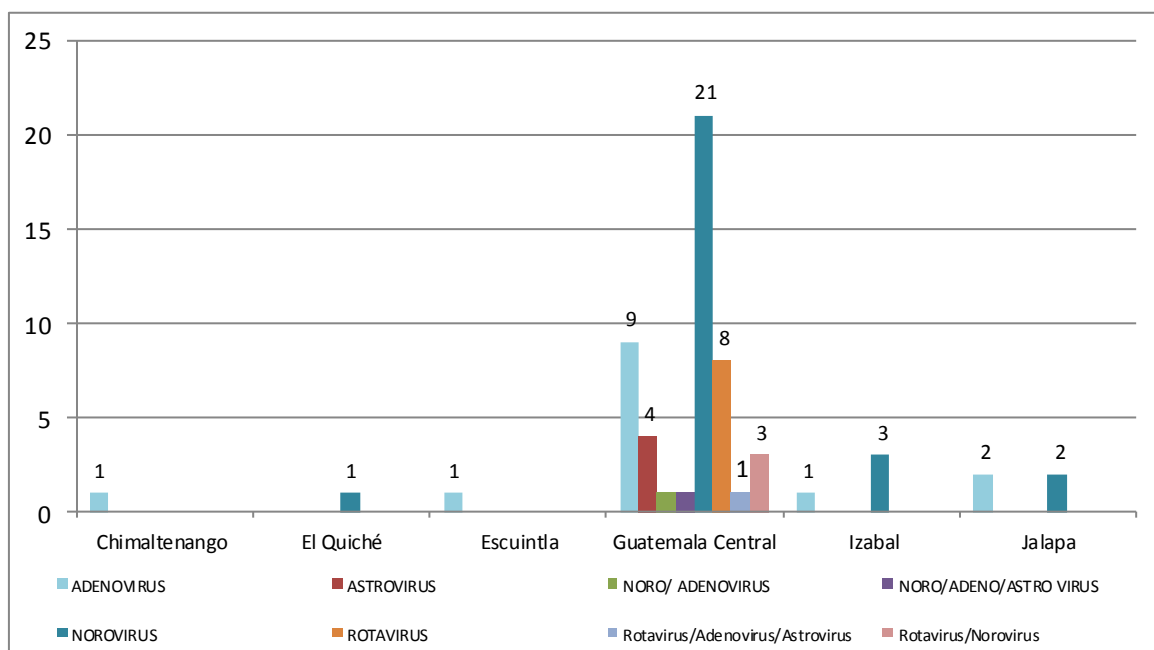
Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Tabla No. 9 Co-Infecciones por edad, Guatemala en Estudio complementario sobre Gastroenteritis en Guatemala 2013-2014

	2013				2014		
	4 meses	7 meses	8 meses	2 años	1 mes	1 año	> 11 años
Norovirus/Adenovirus		1					
Norovirus/Adenovirus/Astrovirus				1			
Rotavirus Adenovirus				1	1	2	
Rotavirus/Adenovirus/Astrovirus				1			
Rotavirus/Astrovirus				1			
Rotavirus/Norovirus	1	1	1		1	5	1

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Gráfico No. 3 Muestras analizadas para Estudio complementario sobre Gastroenteritis en Guatemala 2013-2014 por área de Salud



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Genotipificación y Análisis Filogenético de los Adenovirus encontrados en Muestras Clínicas y Ambientales de Guatemala

Se enviaron a secuenciar un total de 15 muestras positivas para adenovirus humanos obtenidas a través de ensayos de qPCR y nPCR. De estas muestras, 6 se corresponden con muestras ambientales (tabla No. 9 y 10) con muestras de heces fecales de pacientes con gastroenteritis. El tamaño de los amplicones obtenidos para los análisis filogenéticos fue de 82 - 121 pb y 207 - 256 pb, para las muestras ambientales y clínicas respectivamente (Tabla 10)

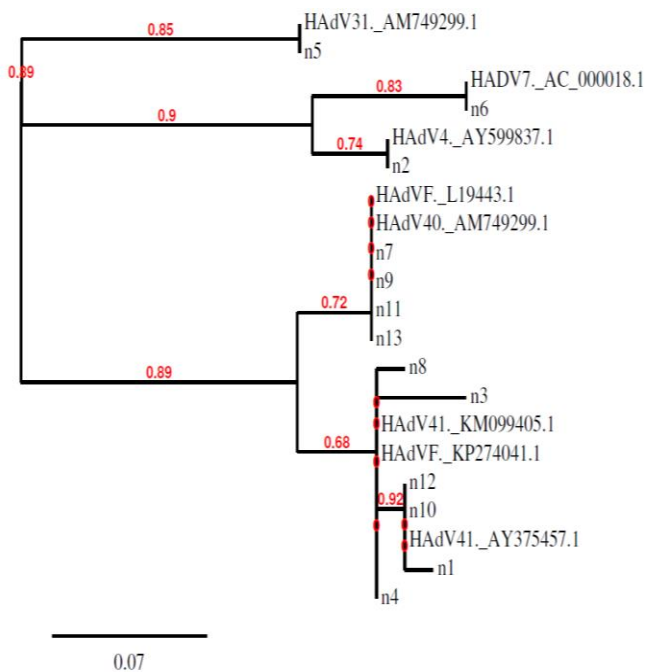
Tabla No. 10. Resultados de la genotipificación de muestras Clínicas y ambientales de Adenovirus

Muestras	Resultado de la nested-PCR	Fragmentos obtenidos (pb)	Tipificación
Na19 (1)	+	120 pb	HAdV-41 (99%)
NA21 (2)	+	121 pb	HAdV-4 (98%)
NA11 (3)	-	-	NT
NA61 (4)	-	-	NT
NA68 (5)	+	89 pb	HAdV-41 (98%)
NA69 (6)	+	82 pb	HAdV-41 (100%)
Ad34 (1)	+	256 pb	HAdV-31 (99%)
Ad35 (2)	+	256 pb	HAdV-7 (100%)
Ad37 (3)	+	256 pb	HAdV-40 (100%)
Ad39 (4)	+	256 pb	HAdV-41(99%)
Ad43 (5)	+	256 pb	HAdV-40 (100%)
Ad46 (6)	+	255 pb	HAdV-41 (100%)
Ad48 (7)	+	210 pb	HAdV-41 (100%)
Ad49 (8)	+	255 pb	HAdV-41(100%)
Ad—(9)	+	207 pb	HAdV-40 (100%)

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

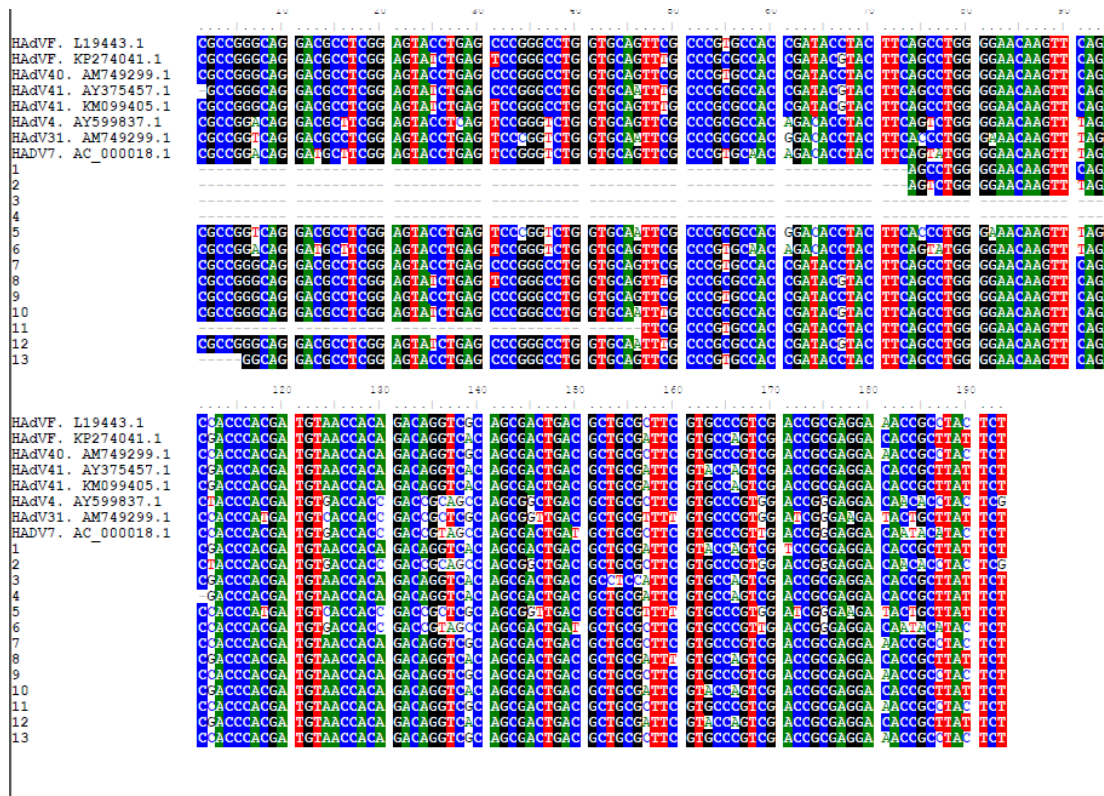
La muestras se alinearon con cepas de referencia depositadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Sep.2015) y posteriormente se construyó un árbol filogenético (figura 3 y 4).

Figura No. 3 Árbol Filogenético de Adenovirus, muestras de Guatemala



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

Figura No. 4 Alineamientos de secuencias de Adenovirus



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

En los análisis filogenéticos se puede identificar 5 *clusters* que se corresponden con los 5 tipos de adenovirus identificados en las muestras analizadas (Tabla 20). A diferencia de las muestras para HAdV 40, las muestras positivas para HAdV 41 (excepto n11) han formado dos subgrupos, y en cierto sentido las muestras ambientales han quedado divididas de las clínicas. Sin embargo no se puede especular con una relación clara ya que el tamaño de los fragmentos es diferente y el número de muestras no es significativo, es importante mencionar que no se ha reportado esta división filogenética para adenovirus humanos con anterioridad.

Según la literatura depositada en las bases de datos internacionales, no existen datos previos de secuencias para adenovirus humanos en Guatemala. Y aunque hay pocos artículos sobre adenovirus en Centro América estos datos, no han depositados la secuencias en el Banco de Datos. Debido a esto, los análisis filogénicos no han incluido esta información.

II.2 DISCUSION DE RESULTADOS:

De acuerdo con varios estudios, los indicadores de contaminación fecal de origen bacteriano descritos en las normativas internacionales, no garantizan la ausencia de virus patógenos. Entre la nueva generación de potenciales indicadores, se han propuesto, entre otros, a los adenovirus humanos. Estos virus presentan una gran estabilidad al medio ambiente y son excretados por la mayoría de la población, incluso sin que se presente un cuadro clínico. En el presente proyecto se implementó la metodología para la detección de estos virus como indicadores para evaluar la calidad microbiológica del agua, se demostró su presencia y se demostró que es factible para las condiciones socio-económicas del país, así como también que el LNS tiene las capacidades tecnológicas y humanas para realizar dichos análisis.

La metodología para estos análisis ha sido descrita anteriormente por el grupo de contraparte en Barcelona. En este proyecto se realizaron entrenamientos en Guatemala por el apoyo del laboratorio de Barcelona, y se realizaron satisfactoriamente los ensayos para validar la metodología. Aunque los resultados de validación del método de concentración de virus obtenidos en Guatemala no fueron similares a los descritos por el equipo de Barcelona, se logró identificar que el tipo de centrífuga del LNS fue el origen de esta diferencia. Teniendo en cuenta esto se adaptó el protocolo a las condiciones actuales del LNS y se concluyó que se debe contar con la centrífuga descrita en los protocolos originales para poder obtener resultados similares. Los demás ensayos como la extracción de ácidos nucleicos y la amplificación de genes a través de PCR convencional y cuantitativa cumplieron los criterios propuestos por la contraparte.

En un total de 6/10 (60%) de las muestras se detectó genoma vírico, probablemente, el porcentaje de las muestras negativas 4/10 (40%) se pudo deber a la presencia de posibles inhibidores víricos presentes en las muestras de agua de mar, como lo son, la alta concentración de sal y la falta de una centrífuga adecuada. Estos factores influyeron en la poca adherencia de los virus a los flóculos de la leche tal como está descrito en el método original (Calgua, et. al. 2008).

En el estudio de validación se contaminaron artificialmente muestras de agua de mar, lago, río y pozo, con una suspensión de concentración conocida de adenovirus humanos. La eficiencia del método se definió como la cantidad de virus recuperados en cada muestra. En nuestro caso la recuperación obtenida fue de 1.02277 para agua de mar, 54.9 para agua de lago, 37.98 para agua de río y 1.0849 para agua de pozo. Los resultados de la eficiencia descritos anteriormente son de aproximadamente 50 % para estos tipos de agua (Calgua et al., 2013). En términos de conductividad el agua de mar podría ser 100 veces mayor que en agua de río y lago. Aunque la alta conductividad de las muestras se ha identificado como un factor positivo para el método de concentración, en varios estudios también se ha reportado que esta

conductividad podría inhibir los ensayos moleculares como la extracción de ADN/ARN y la amplificación por PCR. Esto podría explicar, la baja eficiencia obtenida en agua de mar, en el presente proyecto; sin embargo, los valores de eficiencia, obtenidos en el presente proyecto, no se pueden comparar con los valores de referencia obtenidos por la contraparte en Barcelona, ya que el protocolo tuvo la limitante de la centrífuga.

Los ensayos moleculares empleados en el presente proyecto, representan una herramienta de alta sensibilidad y de bajo costo económico, que permiten obtener resultados específicos, rápidamente. Es importante remarcar que la detección de virus infecciosos a través de técnicas de cultivo celular solo se requiere en estudios específicos para evaluar el riesgo de infectividad de estos virus, estos ensayos son de gran utilidad pero son tardados y costosos.

El ensayo interlaboratorio con el laboratorio de aguas de la Universidad de Barcelona, permitió evaluar la metodología de qPCR en el Laboratorio Nacional de Salud; para la comparación de la metodología de detección y cuantificación viral; para lo cual se analizaron réplicas del estándar de adenovirus humano, con diluciones que van desde la 10^{-1} a la 10^{-6} , obteniendo un total de 7 réplicas analizadas. Los estándares fueron medidos al mismo tiempo en ambos laboratorios, y la comparación se realizó, por medio de la prueba de hipótesis para diferencias pareadas por t de student, en donde: $H_0: \mu_d=0$ (μ_d = promedio de las diferencias), a un nivel de significancia alfa (α) de 0.05. Al comparar los valores obtenidos se puede inferir que existió poca dispersión, ya que el promedio de la diferencias $\mu_d = 0.86$ en las diluciones con respecto a la media correspondiente, dicha desviación fue menor para el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala como se muestran los resultados en la tabla 3.

El análisis gráfico muestra una ligera discrepancia en las concentraciones 0 y 1 mejora en las siguientes diluciones (ver anexo 2), ésta diferencia fue atribuible a un posible error analítico de pipeteo, se descarta error de tipo sistemático ya que las otras diluciones no muestran variabilidad. Según los datos obtenidos en este estudio comparativo de evaluación de método de detección de partículas víricas, no hubo diferencia hipotética, ni significativa, entre ambos laboratorios ($p = 0.1737$). Se clasifica a ésta metodología como factible, sensible, específica y fiable.

Es necesario realizar estudios posteriores para la reproducibilidad del método, utilizando diferentes matrices de muestras de agua artificial y/o muestreos sistemáticos, para mejorar, el porcentaje de recuperación viral, sobre todo en agua de mar.

La presencia de microorganismos patógenos en agua de uso y consumo humano contaminada con residuos fecales representa un problema de salud pública y económico, especialmente en áreas donde la economía se basa en el turismo, como queda demostrado en este estudio, donde encontramos Adenovirus Humano, en el Lago de Amatitlán, en el Río La Gloria (Amatitlán), Mariscos, (Izabal), San Marcos La Laguna (Lago de Atitlán), Puerto de San José, Puerto Matías de Gálvez, Río Zepelá, Río El Naranjo, Río Dulce y agua de pozo Los Aposentos Chimaltenango.

De las 213 muestras recolectadas en 19 muestreos. En 77 de las muestras se identificó Adenovirus que son virus contaminantes del agua. Todas las muestras

fueron analizadas por qPCRTaqMan®, dando valores de promedio de 1,904.84 CG/L. Así mismo el Puerto de San José, se le encontró JC polyomavirus.

Las gastroenteritis agudas constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Diversos virus han sido identificados y asociados a las gastroenteritis agudas, desde aproximadamente la década de los años 70. Se estima que 2.0 millones de muertes al año están relacionados con síntomas de diarrea, sin embargo, en la mayoría de países en desarrollo no se diagnostica el agente etiológico. A nivel mundial, el Rotavirus del grupo A es el responsable de alrededor de 440 mil muertes cada año en niños menores de cinco años. Luego de Rotavirus, Norovirus, Adenovirus y Astrovirus son los agentes etiológicos más importantes de las gastroenteritis agudas en niños menores de cinco años y han sido asociados a casos esporádicos y brotes en escuelas, cruceros, guarderías, casas para ancianos, hoteles, reportados también en nuestro país (Rocha Ferreira, y otros, 2012; Arvelo, y otros, 2012), y demostrado con los resultados encontrados en este proyecto de investigación, la importancia que tiene la vigilancia de gastroenteritis en niños menores de 5 años.

En los análisis filogenéticos se puede identificar 5 *clusters* que se corresponden con los 5 tipos de adenovirus identificados en las muestras analizadas (Tabla 20). A diferencia de las muestras para HAdV 40, las muestras positivas para HAdV 41 (excepto la No. 11) han formado dos subgrupos, y en cierto sentido las muestras ambientales han quedado divididas de las clínicas. Sin embargo no se puede especular con una relación clara ya que el tamaño de los fragmentos es diferente y el número de muestras no es significativo, es importante mencionar que no se ha reportado esta división filogenética para adenovirus humanos con anterioridad, habrá que seguir realizando este tipo de estudios, incluyendo más lugares de Guatemala.

Según la literatura depositada en las bases de datos internacionales, no existen datos previos de secuencias para adenovirus humanos en Guatemala. Y aunque hay pocos artículos sobre adenovirus en Centro América estos datos, no han sido depositadas secuencias en el Banco de Datos. Debido a esto, los análisis filogénicos no han incluido esta información.

PARTE III

III.1 CONCLUSIONES:

1. En el presente estudio de investigación, se validó el método para la concentración, determinación y cuantificación de los adenovirus humanos que ha sido propuesto como un indicador de contaminación fecal de origen humano en aguas. La reproducibilidad del método validado, se considera aceptable ya que, del 100% de muestras que fueron artificialmente contaminadas con adenovirus humano, el 60% fueron positivas y un 40% negativas.
2. La eficiencia de recuperación de partículas víricas fue más eficiente en el agua de lago, ya que en esta matriz se llegó a obtener hasta un 54.9% de partículas recuperadas, seguida por el agua de río, obteniendo un porcentaje de 37.98%
3. Se considera factible, sensible, específica y confiable la metodología de cuantificación viral, implementada en el Laboratorio Nacional de Salud.
4. En el presente proyecto quedo demostrado que el análisis cuantitativo de virus en agua, para uso y consumo humano, empleando ensayos de PCR cuantitativa TaqMan, es factible para cuantificar adenovirus humanos, y JC Polyomavirus produciendo información específica de gran utilidad en el control microbiológico del agua.
5. El presente proyecto es uno de los primeros que aporta secuencias de Adenovirus Humanos en Guatemala.

III.2 RECOMENDACIONES:

1. Continuar con la implementación de esta nueva metodología, mejorando los porcentajes de recuperación, para ello, es importante adquirir equipos de alta centrifugación para volúmenes de 500 ml.
2. Continuar con la evaluación de la reproducibilidad del método utilizando matrices de agua artificial, principalmente muestras de mar.
3. Incluir en la metodología validada otros parámetros víricos causantes de infecciones transmitidas por el agua en el país, como Rotavirus, Norovirus y el virus de la Hepatitis A (HAV).
4. Realizar estudios posteriores a las plantas de tratamiento de agua residuales del país, principalmente aquellas que vierten sus aguas a ríos importantes y cercanos a la población.
5. Realizar otros estudios sobre la calidad del agua en Guatemala, principalmente en puntos con alta prevalencia de gastroenteritis.
6. Continuar con este tipo de estudios y profundizar en estudios metagenómicos para brindar evidencia científica del papel que juegan los virus patógenos en la contaminación del agua para uso y consumo humano.
7. Difundir entre la comunidad científica, actores sociales e instituciones relacionadas con el tema, sobre la importancia de este tipo de estudios, para que en un futuro cercano, se pueda incluir dentro de la legislación del agua los virus como indicadores de contaminación fecal, como parámetros más estables y más confiables, que las bacterias entero patógenas.

III.3 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R, Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol.* 2006, 1;40(23):7416-22.

Albinana-Gimenez N, Miagostovich MP, Calgua B, Huguet JM, Matia L, Girones R.. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of wáter quality in source and drinking.water treatment plants. *Water Res.* 2009, 43 (7):2011-9.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human prolyomavirus. *Journal of Virology* 2007, 81; 4130-4136.

Angly FE, Felts B., Breatbart M. Salamon P, Edwards RA, Carlson C, Chan AM, Haynes M, Kelley S, Liu H, Mahaffy JM, Mueller JE, Nulton J, Olson R, Parsons R, Rayhawk S, Suttle CA, Rohwer F. The marine viromes of four oceanic regions, *PLoS Biol* 2006, 4 (11), e368.

Barreira BM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC, Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 2010, 47 (1). 60-64.

Bellizi A, Anzivino E, Rodio DM, Palamara AT, Nencioni L, Pietropaolo V. New Insights on Human Polyomavirus JC and Pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Clin Dew Immunol.* 2013.2013:839719.

Bibby K, Peccia J. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metafenome analysis. *Environ Sci Technol.* 2013.47(4):1945-51.

Bitton G, Charles MJ, Farrah SR. Virus detection in soils; a comparison of four recovery methods. *Can J Microbiol.* 1979, 25(8);874-80.

Block JC, Schwartzbrod L. Viruses in Water Systems. Detection and Identification. New York: *VCH Publishers*, 1989.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and stability of human

adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72(12):7894-6.

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66(1):238-45.

Bofill-Mas S, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Carratala A, Girones R. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants, *Virology J.* 2010, 28:7;141.

Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F y Girones R. Potential transmission of human polyomavirus through the gastrointestinal tract after exposure to virions of viral DNA. *J. Virol.* 2001; 75(21):10290-9

Bofill-Mas S, Pilar Clemente-Casares, Néstor Albiñana-Giménez, Carlos Maluquer de Motes Porta, Ayalkibet Hundesa Gonfa y Rosina Girones Llop EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA Y ALIMENTOS POR VIRUS EMERGENTES HUMANOS *Rev. Esp Salud Pública* 2005; 79: 253-269

Bull RA, White PA, Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends in Microbiology.* 2011 19(5), 233-240.

Banco Mundial. Agua, Saneamiento y la Pobreza. Documento electrónico sin fecha. Páginas.

Castro Rosario, Pérez Rubén, Organización Panamericana de la Salud. Guía para acciones a nivel local 2009:222.

Calgua B, Rodríguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods*, 2013, 187 (2):215-21.

Calgua B, Monte Celia, Bofill-Mas Silvia, Rodríguez-Manzano J, Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay, *J Virology Methods*, 2011, 171 (1):1-7 .

Calgua B, Nuevas metodologías para el estudio de virus humanos contaminantes del medio ambiente, Universidad de Barcelona, Tesis Doctoral, Julio 2013.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, and Girones R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 2008, 153(2):79-83.

Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodríguez-Manzano J, and Girones R. Detection and quantitation of Infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1):1-7

- Campello C, Comar M, D'Agaro P, Minicozzi A, Rodella L, Poli A. A molecular case-control study of the Market cell polyomavirus in colon cancer. *J Med Virol.* 2011, 83(4);721-4. doi:10.1002/jmv.22004.
- Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* 2005. 98 (6):1354-80.
- Cashdollar JL, Wymer L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J Appl Microbiol.* 2013, 115(1):1-11.
- Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K, Havelaar A, Pierz V, Boque M, Gawler A, Holler C, Lambiri M, Mirolo G, Moreno B, Niemi M, Sommer R, Valentin B, Wiedenmann A, Young V, Jofre J. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res.* 2002 Dec. (20):4963-74.
- Corredig M, Dalgleish DG. Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research Internacional.* 1996, 29(1), 49-55.
- Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* 2013, 15;437(2):63-72.
- De Abreu Correa A, Carratala A, Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2012, 78(18); 6450-7
- De Roda Husman AM, Lodder WJ, Rutjes SA, Schijven JF, Teunis PF. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwater, using PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 2009, 75(4):1050-7.
- DeCarpio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2013, 11(4):264-76.
- Demetriades K, Coupland JN, McClements DJ. Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as Related to pH and NaCl. *Journal of Food Science* 2006, (62), 2,342-347.
- Dixon LK, Chapman DA, Netherton CI, Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013, 173(1)-3-14.
- Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One.* 2009, 4(9), e7264.
- Dubrou S, Kopecka H, Lopez-Pila JM, Marechal J, Prevot J. Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in wastewater and surface water samples by gene probe assay. *Water Science and Technology.* 1991, 24 (2), 267-272.

- Eckardt AJ, Baumgart DC. Viral gastroenteritis in adults. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011, 6(1):54-63.
- Ekstrom J, Forslund O, Dillner J. Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology* 2010, 297(2):331-6.
- Esposito S, Preti V, Consolo S, Nazzari E, Principi N. Adenovirus 36 infection and obesity *J Clin Virol.* 2012.55(2):95-100.
- Farrah SR, Bitton G. 1990. Bollag Jean-Marc, Arthur Douglas Stotzky, G, Peterson, H. George (Eds), *Soil Biochemistry, 0824782321, vol. 6 CRC.*
- Felkamp MC, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi; recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol.* 2013, 94, (3) 482-96.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS, Clonal Integration of a Polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 200. 319(5866):1096-100.
- Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, Mayor EO. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-Induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 2012, 25(3):471-506.
- Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM, Andrade J, Volotao EM, Rocha M, Leite JP, Miagostovich MP, Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *Journal of Medical Virology.* 2010, 82 (8): 1442-1448.
- Fong TT, Lipo EK, enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005, 69 (2) 357-71.
- Formiga-Cruz M, Tofiño-Quesada G, Bofill Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Conden-Hansson AC, Hernroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones MD, Girones R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 2012.68(12)-5990-8.
- Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilth MA, Pariente K, Segondy M, Burguiere A, Manuguerra JC, Caro V, Eliot M. Human skin microbiota; high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing, *PLoS One* 2012, 7 (6):e38499.
- Fumian TM, Leite JP, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP, One year environmental surveillance of rotavirus species A (RVA) GENOTYPES IN CIRCULATION AFTER THE INTRODUCTION OF THE Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res.* 2011, 45(17)5755-63.

- Fumian TM, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP, Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health* 2013, 11(1):110-9.
- Gaynor A, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*, 2007, 4:3(5):e64
- Gerba CP Goyal SM LaBelle RL, Cech I Bodgan GF. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am J PublicHealth* 1979, 69(11):1116-9.
- Girones R. Ferrus MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Correa Ade A. Hundesa A. Carratala A. Bofill-Mas S. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 2010,44(15) 4325-39.
- Gray JJ. Green J, Gallimore C, Lee JV, Neal K, Brown DWG. Mixed genotype SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. *Journal of Medical Virology.* 1997,52,425-429.
- Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ, Human Caliciviruses D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.) et al., *Fields virology* (4thed), vol. 1-Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2001), pp. 841-874.
- Greninger AL, Holtz I., Kang G, Ganem D, Wang D, DeRisi JL. Serological evidence of human klassevirus infection. *Clin Vaccine Immunol* 2010. 17(10):1584-8.
- Greninger AL, Runckel C. Chiu CY, Haggerty T. Parsonnet J, Ganem D, DeRisi JL. The complete genome of klassevirus – a novel picornavirus in pediatric stool. *Viol J.* 2009 18;6:82.
- Hall Aj, Vinjé J, Lopman B, Park BW, Yen C, Gregoricus N, Parashar U, Updated Norovirus Outbreak Management and Disease prevention Guidelines (CDC). *Recommendations and Reports* 2011.60.3.
- Hamza IA, Jurzik L, Oberia K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health.* 2011, 214(6):424-36.
- Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. Klassevirus infection in children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2010,16(10):1623-5.
- Haramoto E, Kitajima M, Otagiri M. Development of a reverse transcription-quantitative PCR assay for detection of salivirus/klassevirus. *Appl Environ Microbiol.* 2013,79(11):3529-32.
- Haramoto E. Otagiri M. Prevalence and genetic diversity of klassevirus in wastewater in Japan. *Food Environ Virol.* 2013. 5(1):46-51

Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, Letz A, Diedrich S, LópezPila J, Schreier E. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiology and Infection*. 2005. 133(2),291-298.

Holtz LR, Finkbeiner SR, Zhao G, Kirkwood CD, Girones R, Pipas JM, Wang D. Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread. *Virol J*. 2009,24;6;86.

Hsu BM, Chen CH, Kung CM, Wan MT, Shen SM. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere*. 2007, 66(5):964-9.

Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol*. 2006, 1;40(23);7132-40.

Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol*. 2011, 156(9):1627-34.

Katzenelson E, Fattal B, Hostovesky T. organic flocculation; an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl Environ Microbiol*. 1976,32(4):638-9.

Kay D, Bartram J, Pruss A, Ashbolt N, Wyer MD, Fleisher JM, Fewtrell L, Rogers A, Rees G. Derivation of numerical values for the World Health organization guidelines for recreational waters. *Water Res*. 2004, 38(5):1296-304.

Kay D, Fleisher JM, Salmon RL, Jones F, Wyer MD, Godfree AF, Zelenauch-jacquotte Z, Shore R. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing; results from randomized exposure. *Lancet*. 1994, 344(8927):905-9.

Kirby A, Iturriza-Gómara M. Norovirus diagnostics: options, applications and interpretations. *Expert Tew Anti Infect Ther*. 2012, (4):423-33.

Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K, Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P(6) rotavirus strain isolated from a child with diarrhoea and encephalopathy in Japan. *J Gen Virol*. 2013, 94(7):1568-75.

Kosulin K, Hoffmann F, Clauditz TS, Willczak W, Dobner T. Presence of adenovirus species C in infiltrating lymphocytes of human sarcoma. *PLoS One* 2013, 3;8(5);e63646.

Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja W, Koonin EV. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol*. 2010,18,11-19.

La Rosa G, Fratini M, Accardi L, D'Oro G, Della Libera S, Muscillo M, Di Bonito P, Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewage. *PLoS One*, 2013, 8(1):e52391.

La Rosa G, Fratini M, Della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanita*. 2012, 48(4):397-406.

Laverick MA, Wyn-Jones AP, Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Letters in Applied Microbiology*. 2004,39,127-136.

Lee C, Lee SH, Han E, Kim SJ. Use of cell culture.PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70, 6695-6705.

Li I, Victoria J, Kapoor A, Blinkova O, Wang C, Babrzadeh F, Mason CJ, Pandey P, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser JM, Bartkus JM, Delwart EI. A novel picornavirus associated with gastroenteritis. *J. Virol*. 2009, 83(22):12002-6.

Lipp EK, Farrah SA, Rose JB. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar Pollut Bull*. 2001, 42(4):286-93.

Loh J, Zhao G, Presti RM, Holtz LR, Finkbeiner SR, Droit L, Villasana Z, Todd C, Pipas JM, Calgua B, Girones R, Wang D, Virgin HW. Detection of a novel sequences related to African Swine Fever virus in human serum and sewage. *J Virol*. 2009, 83(24):13019-25.

López-Bueno A, Tamames J, Velásquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science* 2009, 326(5954), 858-61.

Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo Am Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, Gray J, Iturriza Mm Gallimore C, Bottiger B, Hedlund KO, Torvén M, von Bonsdorff CH, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, Zimsek J, Reuter G, Szúcs G, Melegh B, Svennson L, van Duynhoven Y, Koopmans M. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*. 2004, 363(9410):682-8.

Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, Hoque MO, Chuang A, Kim MS, Sharma R, Liégeois NJ, Koch WM, Califano JA, Westra WH, Sidransky D. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J. Cancer*, 2010, 126(12):2991-6.

Lucey JA, Gorry C, O’Kennedy B, Kalab M, Tan-Kinita R, Fox PF, Effect of acidification and neutralization of milk on some physico-chemical properties of casein micelles. *Inter Dairy J*. 1996,(6);3,257-272.

Lukasik J, Scot TM, AndryshakDm Farrah SR. influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl Environ Microbiol*. 2000,66(7):2914-20.

- Major E. O. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 2010,61,35-47.
- Maunula L, Kalso S, von Bonsdorff CH, Pönkä A. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiology and Infection* 2004, 132(4), 737-743.
- McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR, Lukasik JO. Detection of human derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl Environ Microbiol.* 2006,72(12):7567-74.
- Medema GJ, I.A. van Asperen IA, Kokman-Houweling JM, Nooitgedagt A, van de Laar MJW, Havelaar AH. The relationship between health effects in triathletes and microbiological quality of freshwater. *Water Science and Technology.* 1995, 31 (5-6), 19-26.
- Melnick JL, Gerba CP, Wallis C. Viruses in water. *Bull World Health Organ.* 1978, 56(4):499-508.
- Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimaraes FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silvia LA, Leite JP. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74(2):375-82.
- Michen B, Graule T. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol* 2010, 109(2), 388-97.
- Moens U, Ludvigsen M, Van Ghelue M. Human polyomaviruses in skin diseases. *Patholog Res Int.* 2011, 2011:123491.
- Morkili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol.* 2012, 2(1):63-77.
- Monier A, Claverie JM, Ogata H. Taxonomic distribution of large DNA viruses in the sea. *Genome Biol.* 2008, 9(7):R106.
- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J. Infect Dis.* 2000, 181 Suppl 2:S284-7.
- Ng TF, Marine R, Wang C, Simmonds P, Kapusinszky B, Bodhidatta L, Oderinde BS, Wommack KE, Delwart E. High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J Virol.* 2012, 86(22):12161-75.
- Nielsen AC, Gyhrs ML, Nielsen LP, Pedersen C, Böttiger B. Gastroenteritis and the novel picornavirus salchi virus, cosavirus, scaffold virus, and salivirus in young children. *J Clin Virol.* 2013, 57(3):239-42.

Nuanualsuwan S, Mariam T, Himathongkham S, Cliver DO. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. *PhotochemPhotobiol* 2002,76(4):406-10.

Pecson BM, Ackermann M, Kohn T. framework for using quantitative PCR as a monoculture based method to estimate virus infectivity. *Environ Sci Technol*. 2011, 45(6):2257-63.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*. 1998, 64(9):3376-82.

PLAN INTERNACIONAL. Estrategia para el mejoramiento de la calidad del agua para consumo humano. Avances 2005-2007. Guatemala. Mayo 2007. Presentación en Power Point.

PNUD. Informe Desarrollo Humano 2006. Más allá de la escasez: Poder, pobreza y la crisis mundial del agua. Nueva York, EE.UU. Página 47.

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1994, 60(8):2963-70.

Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*. 2012, 93(Pt9):1853-68.

Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol* 1996,62(4), 1424-1427.

Ridinger D, Spendlove R, Barnett BB, George DB, Roth J. Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. *Appl. Environ Microbiol*. 1982, 43(4), 740-746.

Robinson CM, Singh G, Lee Jy, Dehghan S, Rajaiya J, Liu EB, Yousuf MA, Betensky RA, Jones MS, Dyer DW, Seto D, Chodosh J. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep*. 2013,(9),3,1812.

Rodríguez-Brito B, Li L, Wegley L, Furlan M, Angly F, Breithbart M, Buchanan J, Desnues C, Dinsdale E, Edwards R, Felts B, Haynes M, Liu H, Lipson D, Mahaffy J, Martin-Cuadrado AB, Mira A, Nulton J, Pasic L, Rayhawk S, Rodríguez-Mueller J, Rodríguez-Valera F, Salamon P, Srinagesh S, Thingstad TF, Tran T, Thurber RV, Willner D, Youle M, Rohwer F. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *ISME j*.2010,4(6):739-51.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzezutka A, Bosch A, Gironés R, Carducci A, Muscillo M, Kowac K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff CH, de Rodahusman AM, Hernández M, van der Poel WH. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev*. 2012, 36(4):786-814.

Rodríguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatments plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.* 2012,66(12):2517-23.

Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, Breitbart M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ Microbiol.* 2009, 11(11):2806-20.
Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* 2004,28(4):441-53.

RED DE AGUA Y SANEAMIENTO DE GUATEMALA (RASGUA). Valoración Estratégica sobre la importancia del agua potable y el saneamiento básico para el desarrollo, la salud y la educación en Guatemala. 2007: 65 p.

SECRETARÍA DE PLANIFICACIÓN Y PROGRAMACIÓN DE LA PRESIDENCIA.

Hacia el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo del Milenio en Guatemala. II Informe de Avances. Guatemala. 2006. 279 páginas.

Schoenfeld T, Patterson M, Richardson PM, Wommack KE, Young M, Mead D. Assembly of viral metagenomes from Yellowstone hot springs. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74(13),4164-74.

Schowalter RM, Pastrana DV, Buck CB. Glycosaminoglycans and sialylatedglycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathog.* 2011,7(7):e1002161.

Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe.* 2010,25;7(6):509-15.

Shan T, Wang C, Cui L, Yu Y, Delwart E, Zhao W, Zhao W, Zhu C, Lan D, Dai X, Hua X. Picornavirussalivirus / Klassevirus in children with diarrhea, China. *Emerg Infect Dis.* 2010,16(8):1303-5.

Sinclair RG, Jones EI, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology.* 2009,107(6),1769-1780.

Smith E, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ Microbiol.* 1982,43(6),1440-1450.

Spurgeon ME, Lambert PF. Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology.* 2013, 5:435(1):118-30.

Tamaki H, Zhang R, angly FE, Nakamura S, Hong PY, Yasunaga T, Kamagata Y, Liu WT. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environ Microbiol.* 2012, 14(2):441-52.

Teunis PF, Lodder WJ, Heisterkamp SH, de RodaHusman AM. Mixed plaques statistical evidence how plaque assays may underestimate virus concentrations. *Water Res.* 2005, 39(17) 4240-50.

Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69(1):577-82.

USGS WATER RESOURCES OF GEORGIA. El ciclo del agua = The Water cycle. USGS. 2005: disponible en <http://ga.water.usgs.gov/edu/watercyclespanish.html>

Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev Med Virol.* 2012, 22(6):354-77.

Vega E, Vinjé J. Novel GII. 12 norovirus strain, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 2011,17(8)1516-8.

Vieira CB, Mendes AC, Guimaraes FR, Fumian TM, Leite JP, Gaspar AM, Miagostovich MP. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *MemInstOswaldo Cruz,* 2012,107(6):778-84.

Vilagines P., Sarrette B, Husson G. Vilagines R. Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Science and Technology* 1993,27,299.306.

Wallis C, Meinick JL. Concentration of viruses on membrane filters. *Journal of Virology.* 1967,1 ,472-477.

Wan XF, Barnett JL, Cunningham F, Chen S, Yang G, Nash S, Long LP, Ford I, Blackmon S, Zhang Y, Hanson L, He Q. Detection of African swine fever virus-like sequences in ponds in the Mississippi Delta through metagenomic sequencing. *Virus Genes.* 2013, 46(3):441-6.

Wevers D, Metzger S, Babweteera F, Bieberbach m, Boesch C, Cameron K, Couacy-Hymann E, Cranfield m, Gray M, Harris LA, Head J, Jeffery K, Knauf S, Lankester F, Leendertz SA., Ionsdorf E. Mugisha L, Nitsche A, reed P, Robbins M, Travis DA, Zommers Z, Leendertz FH, Ehlers B, Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J Virol* 2011, 85(20):10774-84,

WHO, UNICEF Progress on Sanitation and Drinking. *Water Report 2013.* ISBN:9789241505390.

Wiedenmann A, Kruger P, dietz K, López-Pila JM, Szewzyk R, Botzenhart K. A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. *Environ Health Perspect.* 2006, 114(2):228-36.

Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H. Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* 2009,15(9):1496-8.

World Health Organization Report on Infectious Diseases. Geneva: Who:2004. Disponible en: www.who.int/infectious-disease-report/

World Health Organization. Water. Sanitation and Health. Geneva:WHO:2004Disponible en: www.int/water_sanitation_health.

World Health Organization. Report of WHO Scientific Group of Human Viruses in Water, waste water and soil. Technical Report Series. Geneva World Health Organization: 1979.639

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Höller C, de RodaHusman AM, Kay D, Kozyra I, López-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk, Wyer M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* 2011,45(3):1025-38.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J. ApplMicrobiol.* 2001,91(6):945-62.

Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Stenglein MD, Balmaseda A, Harris E, DeRisi JL. Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012, 6(2):e1485.

III.4 ANEXOS

III.4.1 ANEXO 1

Resumen del Procesamiento de Muestras para el Análisis de Adenovirus por Medio de qPCR

No.	Procesos	Detalles
1	Fecha de Muestreo	
2	Lugar de Muestreo	
3	Número y Tipo de Muestra	
4	Número de Muestras	
5	Fecha de Procesamiento	
6	pH 1	
7	Conductividad 1	
8	pH de Procesamiento	
9	Conductividad de procesamiento	
10	Descripción de la leche pre-floculada	
a	Preparación de agua de mar artificial	
b	pH	
11	Tiempo de agitación	
12	Tiempo de reposo	
13	Volumen del precipitado	
14	Volumen de centrifugado	
15	Tiempo de centrifugación	
16	Volumen de concentrado final	
17	Fecha de extracción de DNA	
18	Volumen final para extracción de DNA	
19	Fecha de qPCR	
20	Volumen cargado de qPCR	
21	Condiciones de PCR	
a	Lote de Kit	
b	Concentraciones de los reactivos del MM	
c	Lote de estándar	
d	Forma de prepararlo	
22	Problema para cada muestra o muestreo	
23	Modificaciones de la muestra o muestreo	
24	Condición climática antes del muestreo	
25	Condición climática durante el muestreo	
26	Descripción de los contenedores de muestras	

III.4.2 ANEXO 3. FOTOS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO

FOTO No. 1



Profesores de la Universidad de Barcelona, impartiendo talleres en el Laboratorio Nacional de Salud.
Mayo 2012

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FOTO No. 2



Se observa a los investigadores del proyecto realizando el muestreo de aguas.

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FOTO No. 3



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FOTO No. 4



Los investigadores realizando el muestreo de aguas en el San Marcos la Laguna, Atitlan.

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

FOTO No. 5



Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011



FOTO No. 6



En la presente foto se observa el tamaño del envase donde se recolectaban las muestras de agua, que son recipientes para 10 litros.

Fuente: Base de datos FODECYT 042-2011

PARTE IV
IV.1 INFORME FINANCIERO

FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA							
		LINEA: FODECYT					
Nombre del Proyecto:		"Caracterización y evaluación de virus entéricos contaminantes, presentes en diferentes tipos de agua relacionados con el consumo y uso humano"					
Numero del Proyecto:		042-2011					
Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:		LICDA. LETICIA DEL CARMEN CASTILLO SIGNOR					
Monto Autorizado:		Q 334,300.00		Orden de Inicio (y/o Fecha primer pago):			
Plazo en meses		24 Meses		PRIMERA PRORROGRA 01/01/2014 AL 31/5/2014			
Fecha de Inicio y Finalización:		02/01/2012 al 31/12/2013		SEGUNDA PRORROGRA 01/06/2014 AL 31/10/2014			
Grupo	Renglon	Nombre del Gasto	Asignación Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar
				Menos (-)	Mas (+)		
	035	Personal a Destajo			Q 1,200.00	Q 1,200.00	Q -
1		SERVICIOS NO PERSONALES					
	122	Impresión, encuadernación y reproducción	Q 5,000.00	Q 1,200.00			Q 3,800.00
	131	Viáticos en el exterior	Q 10,000.00			Q 9,720.74	Q 279.26
	133	Viáticos en el interior	Q 6,000.00			Q 3,394.00	Q 2,606.00
	141	Transporte de personas	Q 15,000.00	Q 4,595.80	Q 4,000.00	Q 14,043.32	Q 360.88
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 117,000.00			Q 91,875.00	Q 25,125.00
	185	Servicios de capacitación	Q 5,000.00		Q 3,450.00	Q 4,866.95	Q 3,583.05
	189	Otros estudios y/o servicios	Q 10,000.00	Q 1,000.00		Q 8,000.00	Q 1,000.00
	189	Otros estudios y/o servicios (Evaluación externa de impacto)	Q 8,000.00				Q 8,000.00
	195	Impuestos, derechos y tasas			Q 5,595.80	Q 5,472.68	Q 123.12
2		MATERIALES Y SUMINISTROS					Q -
	241	Papel de escritorio	Q 300.00			Q 106.70	Q 193.30
	242	Papeles comerciales, cartones y otros			Q 40.72	Q 40.72	Q -
	244	Productos de artes gráficas			Q 59.68	Q 54.58	Q 5.10
	245	Libros, revistas y periódicos	Q 3,000.00				Q 3,000.00
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 125,000.00	Q 26,492.51		Q 79,799.52	Q 18,707.97
	262	Combustibles y lubricantes	Q 5,000.00	Q 3,450.00		Q 1,550.00	Q -
	267	Tintes, pinturas y colorantes			Q 983.00	Q 963.00	Q 20.00
	268	Productos plásticos, nylon, vinil y pvc			Q 4,747.51	Q 4,747.51	Q -
	269	Otros productos químicos y conexos			Q 84.90	Q 84.90	Q -
	291	Útiles de oficina			Q 209.48	Q 197.78	Q 11.70
	295	Útiles menores médico-quirúrgicos y de laboratorio			Q 17,711.00	Q 14,061.66	Q 3,649.34
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES					Q -
	324	Equipo educacional, cultural y recreativo			Q 856.00	Q 856.00	Q -
	329	Otras maquinarias y equipos	Q 25,000.00	Q 2,199.78		Q 6,200.04	Q 16,600.18
							Q -
			Q 334,300.00	Q 38,938.09	Q 38,938.09	Q 246,035.10	Q 88,264.90
		MONTO AUTORIZADO	Q 334,300.00			Disponibilidad	Q 88,264.90
		(-) EJECUTADO	Q 246,035.10			-	
		SUBTOTAL	Q 88,264.90				
		(-) CAJA CHICA					
		TOTAL POR EJECUTAR	Q 88,264.90				