

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MATERIAL GENÓMICO
FRAGMENTADO DE NOROVIRUS COMO POSIBLE CONTAMINANTE DE
AGUA POTABLE EN UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR.**



MARÍA PAULA GUTIÉRREZ FORERO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTÁ DC.**

2012

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MATERIAL GENÓMICO
FRAGMENTADO DE NOROVIRUS COMO POSIBLE CONTAMINANTE DE
AGUA POTABLE EN UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR.**



MARÍA PAULA GUTIÉRREZ FORERO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MICROBIÓLOGA AGRÍCOLA Y VETERINARIA

INGRID SCHULER Ph D.

Decana Académica

Facultad de ciencias

JANETH ARIAS PALACIOS M.Sc

Directora de Carrera

Microbiologías

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MATERIAL GENÓMICO
FRAGMENTADO DE NOROVIRUS COMO POSIBLE CONTAMINANTE DE
AGUA POTABLE EN UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR.**



MARÍA PAULA GUTIÉRREZ FORERO

María Fernanda Gutiérrez Ph. D

DIRECTORA

Gustavo Arbeláez Rendón Ph. D

JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. MARCO TEORICO	4
3.1 Historia	4
3.2 Características de Norovirus	5
3.3 Patogenicidad y patología	5
3.4 Prevalencia	6
3.5 Transmisión	7
3.5.1 Brotes ocasionados por Norovirus transmitidos por agua	7
3.6 Técnicas de detección viral en agua	8
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo general	8
4.2 Objetivo específicos	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1 Lugar de Muestreo	9
5.2 Clarificación del agua	9
5.3 Concentración viral	10
5.3.1 Ultrafiltración	10
5.3.2 Centriprep	10
5.4 Detección del Norovirus	10
5.5 Obtención de datos de los factores ambientales	11
6. RESULTADOS	12
7. DISCUSIÓN	14
8. CONCLUSIONES	15
9. RECOMENDACIONES	16
10. BIBLIOGRAFÍA	16

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Resultados de la presencia viral en cada sitio de muestreo	12
Tabla 2. . Valores promedio de los factores ambientales suministrados por el IDEAM.	12
Tabla 3. . Valores promedio del pH para los sitios de muestreo.	13

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Modelo genoma viral de NVs	5
Figura 2. Gel de agarosa al 2% con las muestras positivas para Norovirus	13

RESUMEN

Con el fin de evaluar la presencia de genoma viral fragmentado de *Norovirus* (NVs) en agua de consumo en una Institución de Educación Superior, y establecer si ésta era una fuente de transmisión del agente viral, se llevó a cabo éste trabajo, donde se realizó un muestreo en el cual se recolectaron 64 muestras durante ocho semanas, en ocho puntos específicos de la Universidad. El procesamiento de las muestras incluyó una clarificación inicial a partir de 5 litros recolectados, seguido de una homogenización manual, filtración por medio de dos filtros Millipore™ Opticap XL de membranas de celulosa con tamaños de poro de 0,45 µm y 0,22 µm respectivamente por un sistema de filtración frontal. Para la ultrafiltración se utilizó un sistema tangencial a través de un filtro Millipore™ Prep/Scale TFF con una membrana de celulosa con poro de 1000 Daltons para poder lograr una concentración inicial del virus. Finalmente, se realizó la extracción del material genético; por medio de la técnica Trizol modificada utilizando TRIzol® LS Reagent de InVitrogen™, a partir del extracto de RNA se procedió a la detección de *Norovirus* utilizando la técnica RT-PCR. De 64 muestras analizadas cuatro fueron positivas para NVs, obteniéndose un porcentaje de 6,3%. Los resultados encontrados permitieron evidenciar la presencia de genoma viral en el agua, siendo esta una fuente de transmisión del virus.

1. INTRODUCCION

Los virus entéricos están asociados a muchas enfermedades en humanos, pero la infección viral más frecuente es la gastroenteritis producida por *Norovirus*, uno de los principales agentes etiológicos de origen no bacteriano distribuidos alrededor del mundo [1]. El estudio de patógenos como éste en el agua, permitirá diseñar estrategias para eliminar su presencia en el agua de consumo.

El proyecto que se presentará resulta importante ya que se fortalece la investigación básica, la cual se constituye en soporte y apoyo para procesos de investigación aplicada, los resultados obtenidos permitirán sugerir un manejo adecuado de las aguas de consumo y disminuir los riesgos de aparición de enfermedades entéricas por ésta causa.

El agua es uno de los recursos naturales fundamentales y una fuente básica en la que se apoya el desarrollo, junto con el aire, y la energía. La evaluación de la calidad del agua ha tenido un lento desarrollo ya que hasta finales del siglo XIX no se conocía el papel de ésta como posible fuente de transmisión de numerosas enfermedades infecciosas; sin embargo hoy en día, la importancia tanto de la cantidad como de la calidad del agua está fuera de toda duda [1].

La importancia que ha cobrado la calidad del agua ha permitido evidenciar que los factores que causan su contaminación se encuentran: agentes patógenos, como bacterias, parásitos y partículas virales, además sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, nutrientes que ocasionan crecimiento excesivo de plantas acuáticas, sedimentos o material suspendido, como sustancias radioactivas entre otros [2].

Las evaluaciones de calidad del agua potable en el mundo han estado basadas durante décadas en la determinación de bacterias coliformes, las cuales se usan como indicadores de presencia de patógenos humanos. Esto ha presentado serias limitaciones, dado que la aparición de dichas bacterias tiene un valor predictivo bajo e incluso nulo para otros grupos de microorganismos patógenos como son los virus [3].

En Colombia existen normas que establecen los rangos permisibles de contaminación como es el caso del decreto 475 de 1998, con el cual se busca entre otros aspectos asegurar la calidad microbiológica del agua potable, teniendo en cuenta únicamente la presencia de microorganismos como el grupo de coliformes y bacterias patógenas como *E.coli*. No obstante, no se establecen parámetros relacionados con la presencia de partículas virales, debido posiblemente al desconocimiento de la importancia que estos pueden llegar a

tener como agentes patógenos o por la dificultad para contar con técnicas apropiadas y económicas para su identificación [4].

Las enfermedades transmitidas a través del agua, pueden tener causales de origen biológico o químico, algunas afecciones que se producen por agentes biológicos casi siempre son contagiosas. A causa de esto, y el interés por controlarlas, los estudios microbiológicos del agua se han orientado en mayor parte hacia el aspecto sanitario [4].

Algunas de las razones por las que, la gastroenteritis continúa presente, representando un importante problema de salud, es la falta de higiene, y/o el mal funcionamiento de los servicios sanitarios. Los programas de potabilización de agua han sido responsables de la disminución de las infecciones transmitidas por agua a pesar de que este tratamiento no es eficaz contra todos los patógenos (OMS, 1995) entre éstos los virus entéricos, que comúnmente afectan el agua subterránea, debido a la descarga de aguas contaminadas. Los virus pueden moverse considerablemente en el ambiente y persistir por varios meses cuando las temperaturas son bajas y el suelo es húmedo [5].

Los Norovirus (NVs), son un grupo de agentes virales que han tomado gran importancia debido al nuevo conocimiento sobre su patogenicidad, especialmente en el ser humano, ya que se caracteriza, por ser uno de los principales causantes de gastroenteritis en la población [6]. Han sido relacionados con un gran número de brotes de gastroenteritis en diversas partes del mundo [7], algunos de los cuales han mostrado que el agua ha estado involucrada con la transmisión de enfermedades gastrointestinales a causa de estos agentes virales, y que pueden convertirse en contaminantes por diversos factores tales como; la actividad humana y condiciones ambientales. La presencia de estos virus en los diferentes sistemas de aguas municipales, está relacionada con un manejo inadecuado de residuos y con tratamientos insuficientes para su eliminación [5].

Las investigaciones realizadas al respecto, han sido llevadas a cabo en el Instituto Nacional de Salud y el Ministerio de la protección Social, donde se inició un monitoreo de agentes infecciosos causantes de diarrea en niños menores de 5 años. A pesar de que los estudios no se han terminado, se ha encontrado que estos virus pueden llegar a tener una prevalencia significativa en la población colombiana [8].

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua es un vehículo importante de agentes patógenos tanto de origen bacteriano, parasitario y viral. La gastroenteritis de etiología viral transmitida por aguas contaminadas parece ser una de las infecciones de mayor impacto en la salud humana. Se han reportado epidemias asociadas con agua potable, con presencia de virus tales como *Rotavirus* (RTV), *Adenovirus entéricos* (AdE), *Astrovirus* (HastV), *Calicivirus: Virus Norwalk*(NV) y *Virus de la Hepatitis A* (HAV) [9]. Existen más de 140 especies de virus que se pueden encontrar en el agua, uno de los principales problemas para confirmar ésta afirmación es que las pruebas tradicionales de laboratorio no permiten cuantificar la presencia de virus, y los sistemas de purificación de rutina no poseen la sensibilidad suficiente para lograr erradicarlos [10].

Teniendo en cuenta lo anterior, el propósito de este proyecto consiste en evaluar la presencia de genoma viral fragmentado de *Norovirus* presente en el agua de consumo en la universidad.

Este proyecto de investigación se realizará debido a la gran importancia que se ha dado en diversos países a la investigación y conocimiento de *Norovirus* (NVs), agente viral causante de gastroenteritis en todo el mundo [11]. En Colombia esta entidad no ha sido ampliamente estudiada ni asociada específicamente a brotes causados por el consumo de agua contaminada, principalmente por la limitada información que se tiene sobre su patogenicidad e incidencia, lo que conlleva a que no se tomen medidas necesarias para su prevención.

Las investigaciones realizadas en diversas partes del mundo sobre NVs, han permitido establecer que una de las principales fuentes de transmisión del virus es el agua, lo que ocasiona un incremento en el riesgo de contaminación o infección, si se tiene en cuenta que todas las personas están en contacto continuo con ésta; lo que ocasiona que el impacto producido por estos virus sea significativo, debido a la facilidad que estos tienen para propagarse de una región a otra [12].

Con el presente estudio, se pretende evaluar la presencia de material genómico fragmentado de NVs en el agua proveniente del acueducto en una universidad ubicada en una zona periurbana, mediante la técnica RT-PCR y así poder determinar si esta actúa como vehículo de transmisión contribuyendo al aumento de infecciones gastrointestinales reportadas en la población. Acorde a los resultados de este estudio, se podrían tomar medidas de carácter epidemiológico, para prevenir un aumento de estas infecciones en la población de la Universidad.

3. MARCO TEORICO

3.1 HISTORIA

Desde 1940,[13] se tenía la sospecha de que los virus podían ser causantes de gastroenteritis, debido a que la etiología de muchos de los brotes que ocurrían en diversas partes del mundo no podían ser atribuidos a agentes bacterianos o parásitos.

Sin embargo fue hasta 1972, por medio de la microscopia electrónica que partículas virales de aproximadamente 27nm fueron identificadas y claramente vinculadas a un brote de diarrea, ocurrido cuatro años atrás [14]. A estas partículas se les llamó virus Norwalk, debido a que el brote había sucedido en una escuela primaria ubicada en Norwalk, Ohio [15].

Los individuos afectados en el brote, desarrollaron evidencia serológica a causa de la infección, por lo cual se sugirió que estas partículas virales eran el agente etiológico de la gastroenteritis producida en Norwalk [16].

Los Norovirus (NVs) formalmente, llamados virus Norwalk, no se han podido propagar *in vitro* en ninguna célula o sistema de cultivo de órganos. La administración de este virus a animales de laboratorio incluyendo especies de primates, no han dado como resultado la producción de enfermedad [16].

Dado a que los NVs no pueden ser aislados en cultivos celulares, su detección por muchos años se había centrado en la determinación de sus características morfológicas, lo cual dificultaba el diagnóstico de los casos diarreicos que se presentaban [17].

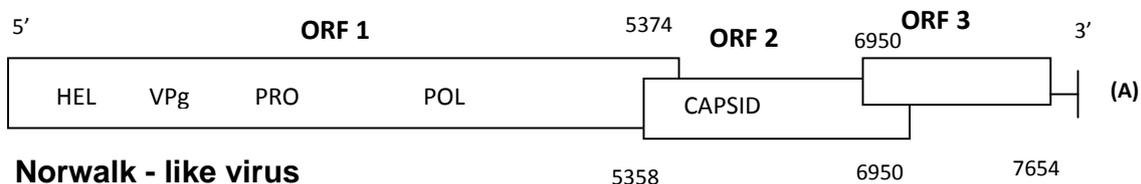
Las investigaciones sobre los NVs avanzaron significativamente en la pasada década como resultado de la introducción de nuevas tecnologías moleculares. La clonación y la secuenciación de un prototipo de virus Norwalk en los noventa permitieron la clasificación de los NVs dentro de la familia *Caliciviridae* el desarrollo de la RT-PCR para el diagnóstico de estos mismos. La aplicación de esta nueva tecnología en muchos laboratorios del mundo, permitió acumular rápidamente información sobre la variación genética, prevalencia, distribución e importancia de estos virus como agentes causantes de gastroenteritis [18].

3.2 CARACTERISTICAS DE NVs

Los NVs tienen un diámetro de 27-40 nm, no poseen envoltura [19] y tienen como genoma un RNA de cadena sencilla, polaridad positiva, 7.5 Kb, poliadenilado en su extremo 3', pero no está metilado en su extremo 5'. Tienen una proteína estructural única en la cápside y la apariencia de 32 depresiones en forma de taza sobre la superficie del virión. Su simetría es icosaédrica [20].

El genoma está organizado dentro de 3 marcos abiertos de lectura (ORFs). El ORF 1 codifica para una poliproteína no estructural de 200 kDa, que es clivada por una proteasa en 6 proteínas no estructurales, en donde está incluida la RNA-polimerasa. El ORF 2 codifica para una proteína estructural principal de cápside (VP1) de 60 kDa y el ORF 3 codifica para una proteína estructural menor de la cápside (VP2) [21].

La proteína VP1 forma dos dominios: P (sub dominios P1 y P2) y la S. Muchas de las interacciones celulares y del reconocimiento inmunológico parece estar localizado en el sub-dominio P2, el cual se extiende por encima de la superficie viral y tiene la mayor divergencia en cuanto a su secuencia en el genoma [22].



Norwalk - like virus

Fuente: (Green *et al.*, 2000)

FIGURA 1. Modelo del genoma de NVs.

3.3 PATOGENICIDAD Y PATOLOGÍA

El conocimiento sobre las características patológicas y las lesiones histológicas que ocasionan la gastroenteritis es uno de los puntos que más se han investigado desde el descubrimiento de los NVs como agentes etiológicos de dicha enfermedad. Una de las características principales ha sido la observación de lesiones de la mucosa del intestino delgado en las primeras 2 semanas después de la infección, sin embargo la mucosa gástrica y rectal permanecen histológicamente normales durante la enfermedad por NVs [23]. Por medio de microscopía electrónica, se pudo evidenciar que hay una disminución del tamaño en las microvellosidades intestinales, y por esto la enfermedad presenta una mala

absorción de grasas, D-xilosa y lactosa que puede persistir al menos por una semana, aunque los síntomas clínicos duren tan solo 1 o 2 días [24].

La infección por NVs afecta a personas de todos los grupos de edades, sin embargo, se ha encontrado que predomina en el grupo de los adultos mayores [25].

Los NVs son altamente infecciosos, se ha estimado que la dosis mínima infectante es de 10 a 100 partículas [26]. Después de la exposición inicial, los virus tienen un período de incubación de 12-48 horas y que puede durar hasta 60 horas. La excreción del virus en heces comienza unas pocas horas después del inicio de los síntomas y pueden continuar hasta el séptimo o décimo día [27][28].

La gastroenteritis por NVs se caracteriza por náuseas agudas, vómito, dolor abdominal (calambres) y diarrea, el vómito es más frecuente en niños, mientras que los adultos experimentan con mayor proporción diarrea. Algunos otros síntomas pueden ser dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, mialgias y en muy pocos casos puede llegar a producir deshidratación severa [29].

No hay disponible ningún tipo de tratamiento antiviral para curar la infección producida por NVs, los tratamientos se centran especialmente en la prevención de la deshidratación del paciente, ésta deshidratación es usualmente mantenida, usando sueros orales o sustancias isotónicas. El tratamiento sintomático de dolor de cabeza, mialgias y náuseas, se trata con ayuda de analgésicos y antieméticos [18].

3.4 PREVALENCIA

Estudios epidemiológicos han indicado que la infección por NVs ocurre a nivel mundial, de acuerdo con los reportes realizados por el centro de control y prevención de enfermedades (CDC), estos virus fueron responsables del 96% de brotes de gastroenteritis aguda reportados desde enero de 1996 hasta junio de 1997 en los Estados Unidos [18].

En Europa occidental entre las gastroenteritis virales, los NVs son unas de las causas más frecuentes; y se estima que en Inglaterra y Holanda, entre un 6% y 11% de todas las infecciones virales se deben a este virus [30].

En Colombia debido a la información tan limitada que hay sobre agentes etiológicos causantes de gastroenteritis, el Instituto Nacional de la Salud junto con

el Ministerio de Protección Social en el 2006, decidieron iniciar un monitoreo de agentes infecciosos causantes de diarreas en niños menores de 5 años [18].

Se han realizado estudios en algunos de los municipios de Cundinamarca debido al aumento de las enfermedades diarreicas en la población, en donde se ha buscado determinar la presencia de virus gastrointestinales en muestras fecales.

Los resultados han mostrado que la presencia de estos virus está relacionada con casos de enfermedades diarreicas que se han encontrado en la población [31]. En cuanto a la prevalencia de NVs en niños menores de 5 años se ha encontrado que ha alcanzado un 10% [32].

3.5 TRANSMISIÓN

Las principales formas de transmisión de NVs, son el consumo de aguas, y alimentos contaminados y el contacto persona a persona [33]; sin embargo, se conocen factores ambientales que pueden contribuir a la contaminación por estos virus, entre los que se encuentran lluvias, tipos de suelos de los alrededores de plantas de tratamientos de aguas, temperatura, la poca exposición a la luz del sol y vegetación [29].

La presencia de estos virus en las diferentes fuentes de agua está relacionada principalmente con la generación de desechos y su inadecuado manejo a causa de actividades humanas y animales. Además se encuentra atribuido a tratamientos insuficientes de aguas residuales que generalmente consisten en filtración y cloración, con los cuales no se puede garantizar la remoción de partículas virales [29].

3.5.1. BROTES OCACIONADOS POR NVs TRANSMITIDO POR AGUAS.

Los brotes epidémicos causados por el consumo de agua de suministro público tienen gran efecto sobre la salud pública debido al gran número de personas potencialmente expuestas. Las características y la etiología de estos brotes han variado con el tiempo. Coincidiendo con la mejora generalizada de los sistemas de control y desinfección del agua, se ha producido una disminución de los casos de etiología bacteriana y un incremento de los brotes ocasionados por otros agentes como virus [2].

Los virus entéricos son patógenos críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y la detección a nivel de laboratorio es relativamente difícil y costosa. Además no se

cuenta con información adecuada debido a que los virus son más difíciles de detectar en medios acuáticos, se confunden a menudo con infecciones no específicas y la epidemiología se hace difícil por la escasa cantidad de información que es reportada a las autoridades sanitarias [2].

Los brotes de infecciones asociados al agua de bebida son usualmente el resultado de una inadecuada eliminación de microorganismos durante el tratamiento y/o una contaminación cruzada, causada por la mala adecuación de redes de alcantarillado y por el alto contacto entre aguas servidas y aguas utilizadas para potabilización [5].

La presencia de NVs en agua, también ha estado ampliamente relacionado a temporadas invernales en donde se ha encontrado que las partículas virales son generalmente más prevalentes [34], ya que a pesar de que su concentración en aguas es baja, esta puede aumentar por el desbordamiento de aguas residuales y tanques sépticos debido a las fuertes lluvias [33].

3.6 TECNICAS DE DETECCIÓN VIRAL EN AGUA.

Después del muestreo y la concentración de virus, el aspecto importante a considerar es la detección y en algunos casos, el recuento de virus. De las técnicas más utilizadas en la actualidad para realizar la detección viral se encuentran la PCR, ELISA y Microscopia Electrónica. Estas técnicas requieren que el virus esté presente en una concentración de 10^4 - 10^5 partículas en el caso de ELISA, 10^2 para PCR [34].

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la presencia de material genómico fragmentado de *Norovirus* (NV) como posible contaminante de agua potable en una Institución de Educación Superior.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la presencia de material genómico fragmentado de *Norovirus* en 8 puntos específicos de agua potable dentro de una Institución de Educación Superior.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Lugar de Muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado en una zona periurbana, cercana a Bogotá donde se encuentra una Institución Universitaria, se tomaron las muestras en 8 puntos diferentes del predio, para un total de 64 muestras. Los lugares de recolección fueron tres cafeterías, dos baños y tres laboratorios de práctica agrícola y veterinaria.

Las muestras fueron colectadas en recipientes de polipropileno limpios y previamente desinfectados, un volumen de 5 litros de agua por punto durante ocho semanas, fueron llevadas al laboratorio de virología de la Universidad Javeriana donde se almacenaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento. A la totalidad de las muestras se les midió el pH a la hora de su recolección.

5.2 Clarificación del agua

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá, donde a partir de los 5 Litros adquiridos en cada uno de los puntos de muestreo, se les realizó una homogenización manual para posteriormente realizarse una clarificación del agua por medio de una filtración en dos filtros Millipore™ Opticap XL de membranas de celulosa con tamaños de poro de 0,45 µm y 0,22 µm respectivamente por un sistema de filtración frontal. Este proceso se realizó 3 veces por cada muestra para obtener un mejor resultado en el proceso, además se hizo un lavado con 500 mL de agua desionizada para los filtros entre muestra y muestra para evitar riesgos de contaminación cruzada. A partir de las filtraciones se obtuvo un volumen final de 1 litro, para llevarlos al proceso de concentración viral.

El filtro fue conectado a una bomba peristáltica Millipore 8200115. Esta conexión se realizó por medio de mangueras de silicona de alta presión de las cuales una de estas pasara la muestra a través del filtro por la presión ejercida por la bomba, la otra permitió la recirculación de la muestra que no atravesará la membrana. Donde las partículas de 1.000 a 1.000.000 Da de peso molecular fueron retenidas, mientras que las sales y el agua atravesaron la membrana.

5.3 Concentración viral

5.3.1 Ultrafiltración

Para la ultrafiltración se utilizó un sistema de filtración tangencial, por medio de un filtro Millipore™ Prep/Scale TFF con una membrana de celulosa con poro de 1000 daltons para poder lograr una concentración inicial del virus. En este sistema se sometió el litro obtenido de cada muestra después de la filtración para finalmente conseguir un volumen final de 13 a 15 mL por muestra donde el virus se encontrará más concentrado que en su condición inicial. El tratamiento del ultrafiltro se realizó utilizando un lavado con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y agua desionizada entre muestra y muestra para asegurar la limpieza del filtro y no generar contaminaciones cruzadas por las muestras procesadas.

5.3.2. Centriprep

A partir del volumen final obtenido en el proceso de ultrafiltración (13-15mL) para cada muestra se llevó al recipiente especial de Centriprep Ultracel-10 de Millipore™ y se completará el volumen con agua desionizada estéril para tener el mismo volumen en todas las muestras y así poder realizar la segunda fase de concentración viral, llevada a cabo por medio de un sistema de filtración inversa. El volumen final del concentrado obtenido fué de 2 a 3 mL para realizar las pruebas moleculares para la detección del virus.

5.4 Detección de Norovirus

En primer lugar para poder hacer la detección viral a partir de las muestras, se debe realizar la extracción del material genético; ésta se realizó por medio de la técnica Trizol modificada utilizando TRIzol® LS Reagent de InVitrogen™. Durante el proceso actuaron reactivos importantes como el cloroformo, el isopropanol y el etanol que ayudaron a la obtención del RNA puro. A partir de este extracto de RNA se procedió a detectar la presencia del material genómico de *Norovirus*, utilizando la técnica rt-PCR (reverse transcripte-polymerase chain reaction) en dos pasos; donde inicialmente se realizó una transcripción reversa utilizando iniciadores en una concentración de 1000 ng/μL en una relación de 2 μL de iniciadores para 5 μL de RNA extraído, los cuales generaron cadenas de DNAC junto con la enzima SuperScript® III RT de InVitrogen™, utilizando una proporción de enzima 0,3 μL por muestra, que junto con los otros componentes para este

primer master mix, en total se obtuvo un volumen final de 20 μ L donde se realizó una primera etapa en el termociclador para poder realizar la PCR en un segundo paso con iniciadores específicos para *Norovirus* utilizando un volumen cada uno de 1 μ L para 1 μ L de DNAc, siendo estos MON 431 (TGGACIAGRGGICCYAAYCA), MON 432 (TGGACICGYGGICCYAAYCA), MON 433 (GAAYCTCATCCAYCTGAACAT) y MON 434 (GAASCGCATCCARCGGAACAT)[37]; que reconocen una región de 213 pb conservada dentro del ORF 1 que codifica para 1 segmento de la cápside de los 2 genogrupos, adicionalmente se utilizó la enzima *Taq* polimerasa recombinante de InVitrogen® en una proporción de 0,3 μ L de la enzima para 1 μ L de DNAc. El volumen total de este segundo master mix para la ejecución de la PCR fué de 24 μ L con 1 μ L de DNAc. Al llevarlo al termociclador se realizó una primera etapa de denaturación a 94°C por 2 minutos y se sometió a 40 ciclos para el proceso de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94°C/2 minutos, 52°C/30segundos y 72°C/30segundos.

Para completar el proceso se colocó a 72°C por 7 minutos. La lectura de los resultados obtenidos se llevó a cabo; por medio de un gel de agarosa al 2% con adición de bromuro de etidio, a través de una electroforesis para poder visualizar la presencia del virus (fragmentos genoma viral) para las muestras positivas.

El control positivo para la PCR correspondió a muestras de materia fecal provenientes del laboratorio de virología de la Pontificia Universidad Javeriana, como control negativo se utilizó agua cristal y como control del procedimiento de clarificación y concentración se adicionó una muestra positiva de Norovirus obtenida del laboratorio de Virología en 1 litro de agua cristal. Estos controles se utilizaron también para comprobar la ausencia de inhibidores de reacción que pudieran generar resultados falsos negativos en los ensayos.

5.5 Obtención de datos de los factores ambientales

Para obtener el registro de los factores ambientales (temperatura, precipitación y humedad) en cada fecha de muestreo, se solicitó la información al Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM).

6. RESULTADOS

Detección de virus en las muestras de agua

Durante las ocho semanas de muestreo, la presencia de genoma viral se evidenció desde la cuarta semana, encontrándose Norovirus en 4 lugares, dos cafeterías y dos laboratorios. La tabla N°1 presenta la presencia de genoma viral por semanas y por lugares.

Presencia de material genómico (Norovirus) en la Universidad en cada sitio y semana de muestreo.

SITIO DE MUESTREO	SEMANA DE MUESTREO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Baño 1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cafetería 1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Laboratorio 1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cafetería 2	Neg.	Neg.	Neg.	Positivo NV	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Laboratorio 2	Neg.	Neg.	Neg.	Positivo NV	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Baño 2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Laboratorio 3	Neg.	Neg.	Neg.	Positivo NV	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Cafetería 3	Neg.	Neg.	Neg.	Positivo NV	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Tabla 1. Resultados de la presencia viral en cada sitio de muestreo por semana.

A partir de los datos entregados por el IDEAM se determinaron los valores medios obtenidos para las variables temperatura, humedad y precipitación durante el estudio según las fechas de muestreo, los cuales se pueden observar a continuación en la tabla N°2 y tabla N°3 los valores promedio para el pH en cada sitio de muestreo.

Valores Promedio de los factores ambientales por semana de muestreo.

SEMANAS DE MUESTREO	PRESENCIA	FACTORES AMBIENTALES		
	VIRAL	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Precipitación (mm ³)
1	NEGATIVA	14.27	71.75	0.15
2	NEGATIVA	14.86	77.37	0.56
3	NEGATIVA	13.65	82.37	0.67

4	NOROVIRUS	14.42	73.00	0
5	NEGATIVA	14.17	71.37	0
6	NEGATIVA	13.01	70.00	0
7	NEGATIVA	13.81	70.87	0
8	NEGATIVA	15.06	82.50	0

Tabla 2. Valores promedio de los factores ambientales suministrados por el IDEAM.

Valores Promedio de pH por sitio de muestreo

SITIO DE MUESTREO	PRESENCIA VIRAL	pH
Baño 1	NEGATIVA	7.03
Cafetería 1	NEGATIVA	7.07
Laboratorio 1	NEGATIVA	6.78
Cafetería 2	POSITIVANVs	7.01
Laboratorio 2	POSITIVANVs	6.85
Baño 2	NEGATIVA	6.88
Laboratorio 3	POSITIVA NVs	6.61
Cafetería3	POSITIVA NVs	7.06

Tabla 3. Valores promedio del pH para los sitios de muestreo

Electroforesis

En la figura 2 se puede evidenciar el corrido electroforético en gel de agarosa al 2 % obtenido con las muestras positivas para *Norovirus* junto con los controles positivos utilizados, suministrados por el Laboratorio de Virología.

Corrido electroforético en gel de agarosa para *Norovirus*

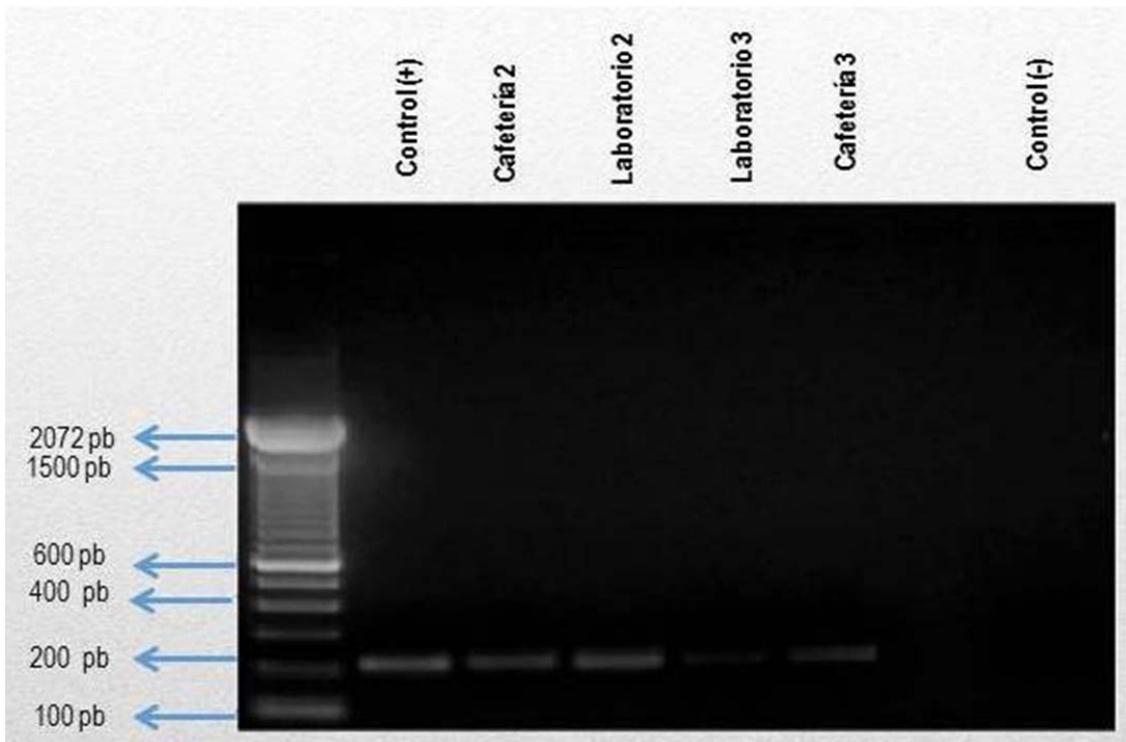


Figura 2. Gel de agarosa al 2% con las muestras positivas para *Norovirus*.

7. DISCUSIÓN

Debido a la importancia que tiene la calidad del agua como elemento fundamental para la vida, encontrar poblaciones de microorganismos como virus causantes de gastroenteritis, se vuelve relevante. En este caso, se quiso evaluar la presencia de material genético de *Norovirus* que sugiere contaminación del agua de consumo en la Institución, por medio de una técnica sensible como lo es RT-PCR. Los resultados registrados en la tabla 1 muestra que se logró encontrar en cuatro lugares de la Universidad en la cuarta semana, sin embargo en las demás no se encontró, evidenciándose esto en la ausencia de algún fragmento de genoma viral.

El riesgo de transmisión viral a través de agua contaminada puede depender de varios factores tales como la cantidad de virus presente en el agua y la capacidad que tiene el virus de sobrevivir por medianos períodos de tiempo de manera infecciosa en el agua [37].

Por lo tanto, lo que comparando con otros estudios en el 2007, Gutiérrez, *et al.*, discutieron que la detección tanto de la proteína viral como del ácido nucleico en el agua son indicadores de presencia viral en esta [37], ya que ni la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) ni la prueba ELISA suministran información suficiente para confirmar la presencia de partículas virales infecciosas.

La simple presencia de componentes virales implica que la partícula estuvo completa en algún momento dentro de la muestra. Esto puede ser debido a que los virus RNA como *Norovirus*, no están en los individuos como saprófitos o portadores sanos. Estos virus siempre que se encuentran en un hospedero, están realizando ciclos virales, replicándose y comportándose de manera infecciosa.

Norovirus y en general los virus entéricos no realizan ciclo viral en el agua debido a que está no posee células donde permita la replicación viral, pero sin embargo la llegada del virus al agua, involucra contaminación por materia fecal de un hospedero susceptible, quien es el responsable de depositar el virus en el agua permitiendo así la diseminación a través de esta, además si se atribuye que las condiciones medio ambientales tales como; temperatura, pH, metales pesados etc. son factores que influyen considerablemente en el tiempo de duración de las partículas virales en el agua, tanto así que los virus entéricos resisten temperaturas menores de 20°C por meses y son capaces de permanecer a temperaturas menores de 0°C por años, en cuanto el pH ácido, éste inactiva su actividad y finalmente la presencia de metales pesados pueden afectar de alguna forma su capacidad infectiva y estabilidad viral. Ya que podría presentarse una inactivación por ligación de grupos donadores de electrones sobre proteínas o ácidos nucleicos, reacción en la cual se producen radicales hidroxilo [40].

Sin embargo existen casos en que los virus adsorbidos en pequeños sólidos pueden contribuir a su supervivencia, puesto que tienden a permanecer a flote durante largos períodos de tiempo, lo que logra que se proteja de procesos de cloración durante el tratamiento de agua, por esta razón pueden conservar así por más tiempo su capacidad infecciosa que un virus libre [40].

En Bogotá cuando el agua es sometida a los procesos de potabilización se le considera como apta para consumo humano, lo que hace suponer una baja cantidad de sólidos y de metales, un pH entre 6 y 7 y una concentración de cloro apta para consumo humano. Todas estas condiciones favorecen la presencia viral.

El agua evaluada presentó (tabla 2) una temperatura 14.42, y humedad 73, siendo condiciones óptimas para la supervivencia de virus.

Sin embargo como se podría explicar de dónde llega un virus entérico al agua de consumo, puede ser que estos virus llegaron al agua antes del proceso de potabilización y que este sistema de purificación del agua no logra eliminar en su totalidad a los virus.[40][14].

El pH de 6 o 7, como los reportados en este trabajo (tabla3), no alteran la estructura viral, lo cual lleva a explicar la presencia de genoma viral o inclusive el virus completo.

Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son un grupo de microorganismos patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja,[2] son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es difícil y costoso.

Los resultados obtenidos indican contaminación del agua potable ya que hay una cantidad suficiente de partículas virales para aceptar que se ve afectada la calidad del agua.

Vale la pena discutir si el agua analizada podría estar asociada con los brotes de diarrea presentes en la población, para esto tendría que confirmarse la capacidad infecciosa de los virus y habría que saber si el serotipo viral presente en la muestra pertenece a un virus con tropismo humano, lo cual no se ha confirmado en este estudio. Para corroborar esto, deberían incluirse, técnicas de amplificación y secuenciación de segmentos virales trabajadas con herramientas filogenéticas.

8. CONCLUSIONES

- Se evaluó la presencia de material genómico de *Norovirus*(NVs) en cuatro de las 64 muestras analizadas en aguas de la Institución Universitaria, obteniéndose un porcentaje de 6,3% lo que significa aceptar la presencia de fragmentos de material genómico del virus en el agua potable de la Institución.

9. RECOMENDACIONES

Evaluar el tratamiento de agua realizado en la planta de acueducto y alcantarillado de Bogotá, con el fin de evidenciar si los métodos utilizados son efectivos o no para la eliminación de NVs y de otros virus entéricos.

Se propondría trabajar para mejores resultados con PCR en tiempo real, la cual además de ser más sensible, ha sido propuesta como alternativa para trabajar virus no cultivables en células, como *Norovirus* [39][40]. Ya que en ésta investigación no se utilizó. Puede ser probable que se hayan presentado falsos

negativos, pues la cantidad de virus no alcanzó a ser detectada con las pruebas utilizadas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. DeZuang J. Handbook of drinking water quality. Segunda edición. JhonWiley, New York, USA. 1997, 100-101p.
2. Espigares, M. Virus en aguas de consumo. Hig. Sanid. Ambient. Higiene y Sanidad Ambiental 2006; 6, 173-189.
3. Espinosa García A, Arias O, Mazari M, Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en la salud pública. Hidrobiología 2004; 14(2):166-178.
4. OMS. Guías para la calidad del agua potable Segunda edición, Vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad 1995.
5. Borchardt, M.; Haas, N. y Hunt, R. Vulnerability of drinking water wells in lacrosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contribution. Environ. Microbiol, 2004;(70):5937 – 5946.
6. Anderson A, Heryford G, Sarisky J, Higgins C, Monroe S, Beard S. A waterborne outbreak of Norwalk like virus among Nowmobiliers, Wyoming J Infect Dis. 2001; 187, 303.
7. Beuret C, Kolher D, Baumgartner A, Norwalk like virus sequences in mineral waters: one year monitoring of three brands. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4):1925-1931.
8. Peláez D. Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud. MVZ-Córdoba 2004; 9(2):470.
9. Deetz, T.R., Smith, E.M., Goyal, S.M., Gerba, C.P., Vollet, J.J., Tsai, L., DuPont, H.L., Kewwisk, B.H., *Occurrence of Rota-and Enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation.* Wat Res. 1984; 18(5): 567-571.
10. Smith EM, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. Appl Environ Microbiol. 1982; (43): 1440.
11. Abarca K, Dabanch J, Jofré L et al. Tenencia de mascotas en población sana e inmunodeprimida de Santiago. Comité de Infecciones Emergentes, Sociedad Chilena de Infectología. Libro de Resúmenes. XIX Congreso Chileno de Infectología, Santiago, 2002.
12. Cheetham, S., M. Souza, T. Meulia, S. Grimes, M. G. Han, and L. J. Saif. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. J. Virol. 2006; (80):10372-10381.
13. Worobey, M. & Holmes, E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 1999;(80): 2535–2543.

14. Glass, R. I. Noel, J. Ando, T. Frankhauser, R. Belliot, G. Mounts. Epidemiologic of enteric calicivirus from humans: a reassessment using diagnostics. *J Appl Microbiol.* 1995; 2000; (3): 536-544.
15. Kapikian, A. Z. Wyatt, R. G. Doblin, R. Thornhill, T. S. Kalica, A. R. Chanock, R. M. Visualization by immune Electron Microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; (10): 1075 – 1081
16. Thornton, A. C. Jennings-Conklin, K. S. McCormick, M. I. Noroviruses: Agents in Outbreaks of Acute gastroenteritis. *Disaster Management & Response.* 2004; 2 (1): 4 – 9.
17. Moreno S, Farkas T, Jiang X, Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis, seminars in pediatric infectious diseases. 2004; (15): 237-245.
18. Haramoto, E. Katayama, H. Ohgaki, S. Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. *App Environ Microbiol.* 2005; 71 (5): 2403 – 2411.
19. Stephen A, Oshiro R, Public Health Concerns about Caliciviruses as waterborne contaminants *J Infect Dis* 2000;(181): 374-380.
20. Chakravarty, S. Hutson, A. M. Estes, M. K. Venkataram B. V. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. *J Virol.* 2005; 79 (1): 554– 568.
21. Zheng D, Ando T, Frankhauser R, Beard R, Glass R, Monroe S. Norovirus Classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2005.
22. Green K, Ando T, Balayan M, Berke, Taxonomy of the Caliciviruses, *J Infect Dis.* 2000;(181):322-3330.
23. Cukor G, Blacklow N, Human viral Gastroenteritis, *Microbiol rev.* 1984; (48): 166-169.
24. Fields B, Knipe D, Howley P. *Fields Virology vol.1 tercera edición* Lippincott Raven Publishers Philadelphia, USA 1996; 784-785.
25. Schmid, D. Lederer, I. Pichler, A. M. Berghold, C. Schreier, E. Allerberger, F. An outbreak of Norovirus infection affecting an Austrian nursing home and a Hospital. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; (23): 802 – 808.
26. Jeffrey, P. Koplan, H. J. M. Le Due, J. W. Thacker, S. B. Ward, J. W. Hewitt, S. M. “Norwalk-like Viruses:” public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50.
27. Fernandez, H. Blanco, S. Leibovish, A., J. Conti, H. D., Gonzalez, G., Kishner, N. *Boletín epidemiológico Periodico. Argentina* 2004; (11): 1-3.

28. Gutierrez, M.F. Matiz, A. Trespacios, A. Parra, M. Riaño, M. Mercado, M. .Virus diversity of acutediarrhea in tropical highlands. *Rev. Latinoam. De Microbiol.* 2006; 48 (1): 17 – 23.
29. Farkas, T. Berke, T. Jiang, X. Matson, D. o. Szucs, G. Molecular epidemiology of human Calicivirus gastroenteritis outbreaks un Hungary, 1998 to 2000; (68): 390 – 398.
30. Mounts A,. Ando, M. Koopmans, J. S. Bresee, J. Noel& R. I. Glass. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181(Suppl 2): 284-287.
31. Roda-Husman, A. M. Bijkerk, P. Lodder, W. Van den Berg, H. Pribil, W. Cabaj, A. Gehringer, P. Sommer, R. Duizer, E. Calicivirus inactivation by Nonionizing 253.7-Nanometer-Wavelength (UV) AND IONIZING (Gamma) Radiation. *App Environ Microbiol.* 2004;70 (9):5089-5093.
32. Rivera, M. , Vial p .;Potin, M ; Prado, P ; Amarales, P. Evaluacion de cuatro metodos para deteccion de Rotavirus en deposiciones de niños chileno. *Rev. Chil.Pediatr.*1995;.66(3):150-155.
33. Lodder, W. J. Husman, A. M. Presence of Noroviruses and other Enteric Viruses in Sewage and surface Waters in the Netherlands. *ApplEnvironMicrobiol.* 2005; 71 (3): 1453 – 1461.
34. Chaparro, A. Matiz, A. Mercado, M. Trespacios, A. A.Ajami , N. Gutierrez, M.F. Estimacion de la prevalencia de Rotavirus A en población infantil de Facatativá Cundinamarca . *UniversitasScientiarum.* 2002; (9): 15 – 22.
35. Frankhouser R. Molecular epidemiology of Norwalk-like viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J InfectDis.* 1998;178:1571-8.
36. Espinosa, A., et al., Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Wat. Res.* 2008;(42): 2618-2628.
37. Gutierrez, M., et al., *Presence of viral proteins in drinkable water—Sufficient condition to consider water a vector of viral transmission?* *Wat. Res.* 2007; (41):373-378.
38. Abad F, Pinto R, Diez J, Bosch A. Desinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination of low levels of chlorine. *Appl Environ Mircobiol.* 1994;(60):2377-83.
39. Lenis C, Lopez J, Ulloa J, Olaya N. Genomas virales fragmentados sugieren contaminación para aguas de consumo humano, Departamento de Microbiología; Pontificia Universidad Javeriana *Asociación Colombiana de infectología* 2012;16(2): 104-111.
40. Gregory J. Improved detection and quantitation of norovirus from water. *Journal of Virological Methods.* 2011; (172):38-45.