

HIGIENE Y SANIDAD AMBIENTAL

Hig. San. Amb. **1**: 8-18 (2001)

Dirección

Prof. Miguel Espigares García

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf. 958 243 169. Fax. 958 249 958. Email: mespigar@ugr.es

Comité de redacción

Prof. Milagros Fernández-Crehuet Navajas. E-mail: fcrehuet@ugr.es

Prof. Pablo Lardelli Claret. E-mail: lardelli@ugr.es

Prof. Obdulia Moreno Abril. E-mail: omoreno@ugr.es

Prof. José Antonio Pérez López. E-mail: japerez@ugr.es

Redacción

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada, España. Telf. 958 243 169. Fax. 958 249 958. Email: mespigar@ugr.es

Higiene y Sanidad Ambiental es una revista electrónica en español, de difusión gratuita, que publica trabajos de investigación originales, revisiones y procedimientos técnicos, con un contenido relativo al área científica de Higiene y Sanidad Ambiental: criterios de calidad ambiental; contaminación de agua, aire y suelo; análisis de riesgos y exposición ambiental, industrial y laboral; epidemiología ambiental; técnicas de saneamiento; higiene de los alimentos; higiene hospitalaria; antibióticos, desinfección y esterilización; tratamiento de aguas y residuos sólidos; etc. También podrán ser publicados artículos relativos a la docencia universitaria de estos contenidos.

Los artículos para la publicación en la revista *Higiene y Sanidad Ambiental*, deben ser enviados a la Dirección de la revista en soporte electrónico con formato de Microsoft Word (o compatible), con un estilo editorial internacionalmente aceptado en las publicaciones científicas (título, resumen, palabras clave, introducción, material y métodos, resultados, discusión, bibliografía, etc.).

Las suscripciones a la revista *Higiene y Sanidad Ambiental* son gratuitas y se pueden realizar mediante el envío de un correo electrónico dirigido a la Dirección o Comité de Redacción.

Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A

M. C. Fernández Molina, A. Álvarez Alcántara y M. Espigares García

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Avenida de Madrid, 11. 18012 Granada, España. Telf. 958 243 543. E-mail: mespigar@ugr.es

INTRODUCCIÓN

El agua se contamina por mediación de los excrementos humanos o animales y de las aguas residuales, de esta forma los agentes causales pueden llegar al agua de bebida y difundir la enfermedad, es lo que se denomina *ciclo de contaminación fecohídrica* (FIG. 1).

El agua debe reunir unas determinadas características de calidad para que no comporte riesgos para la salud. Su control y vigilancia debe realizarse continuamente y en todas las fases del saneamiento, por lo que frecuentemente resulta poco operativo la utilización simultánea de muchos parámetros para definir la calidad del agua. Estas razones han dado lugar a la definición de *indicadores*, sustancias o microorganismos cuya presencia informa acerca de un proceso complejo por el que se ven afectados múltiples parámetros del agua, o señala riesgos sanitarios mediante una fácil determinación (Craun *et al.*, 1997).

Los principales indicadores sanitarios del agua los podemos clasificar en los siguientes grupos:

- Indicadores de contaminación fecal:
 - Microbiológicos
 - Químicos indirectos
- Indicadores de contaminación química.
- Indicadores de procesos de tratamiento.

Como el agua no es un buen medio de cultivo y además se dan mecanismos naturales de autodepuración, las posibilidades de supervivencia y multiplicación de los microorganismos son escasas, lo que explica que, por lo general, las infecciones hídricas se producen cuando la transmisión es rápida, es decir, cuando no media mucho tiempo entre el momento de la contaminación del agua y su consumo.

Aunque son muchas las enfermedades en las que el agua participa como mecanismo de transmisión, existe un grupo de infecciones, normalmente denominadas *gastrointestinales* o de *transmisión fecohídrica*, en las que el agua es el principal mecanismo responsable, a través del *ciclo de contaminación fecohídrica*.

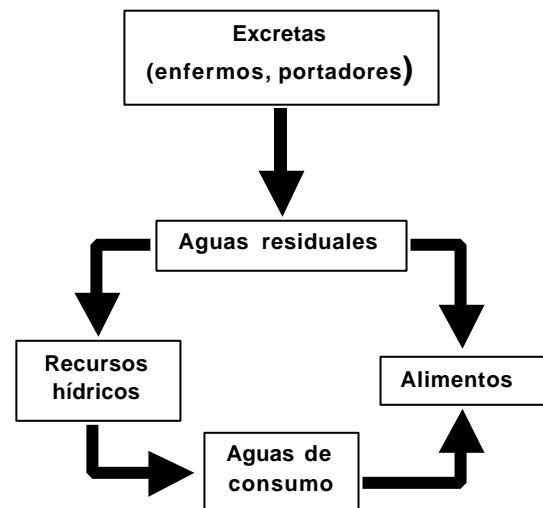


FIGURA 1. Ciclo de contaminación fecohídrica.

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE CONTAMINACIÓN FECAL

La contaminación fecal ha sido, y sigue siendo, el principal riesgo sanitario en el agua, ya que supone la incorporación de microorganismos pató-

genos procedentes de enfermos y portadores, y la transmisión hídrica a la población susceptible (Espigares García y Moreno Abril, 1999). Por ello, el control sanitario de riesgos microbiológicos es tan importante, y constituye una medida sanitaria básica para mantener un grado de salud adecuado en la población.

No obstante, es necesario señalar que, tanto para el control como para la vigilancia de la calidad microbiológica del agua, se disponen de métodos bien desarrollados y relativamente sencillos, ya que los riesgos microbiológicos, por el problema que han representado, vienen estudiándose desde hace muchos años.

La investigación directa en el agua de los distintos microorganismos patógenos es difícil de realizar en la práctica de forma sistemática, debido a que cada uno de ellos requiere técnicas específicas, lo que ha hecho imprescindible, desde los comienzos del control microbiológico del agua, la búsqueda y aplicación de indicadores microbiológicos de contaminación fecal, aceptándose de forma universal que deberían cumplir los siguientes criterios (Olivieri, 1982; Pierre y Franco, 1993; Jagals *et al.*, 1997; Espigares García y Moreno Abril, 1999):

1. Los indicadores deberán estar presentes siempre que lo estén los patógenos, y ausentes en aguas no contaminadas.
2. Deben encontrarse en número mucho mayor que los patógenos.
3. Deberían presentar un mayor grado de resistencia que los patógenos a las condiciones ambientales y procesos de tratamiento.
4. Su aislamiento, recuento e identificación debe ser fácil.

Teniendo en cuenta estos criterios, los indicadores microbiológicos de contaminación fecal clásicos han sido aquellos microorganismos de la flora saprofita del intestino, que se encuentran muy abundantes y en el mayor número de individuos de la población (Lippy y Waltrip, 1984; OMS, 1995).

Los grupos de microorganismos más habituales encontrados en heces humanas son *Bacteroides fragilis*, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* y estreptococos fecales. Muchos de estos microorganismos no son exclusivos del intestino humano, sino que forman parte también de la flora intestinal de diversos animales de sangre caliente. Esto es importante, ya que la contaminación fecal causada por animales puede entrañar riesgos sanitarios, por lo que hay que considerar los microorganismos más abundantes y frecuentes en las heces de los animales, sobre todo en los de producción (vaca, cerdo, oveja, caballo, gallina, pato y pavo). En todos ellos encontramos coliformes y estreptococos fecales, aunque su abundancia relativa es mayor en los estreptococos fecales.

Otro aspecto interesante es la capacidad de supervivencia, que al depender de las características del medio, no se podrá establecer como períodos de

tiempo exactos para las distintas especies, pero sí que es de gran importancia la resistencia relativa (Davies *et al.*, 1995; Hof y Akin, 1986). Las esporas de *Clostridium perfringens* presentan mayor resistencia a diversos procesos físico-químicos que otros indicadores bacteriológicos fecales, (Bezirtoglou *et al.*, 1996; Edberg *et al.*, 1997). *Cryptosporidium* se inactiva rápidamente a temperaturas extremas, sin embargo, sus ooquistes dan lugar a numerosas epidemias, ya que en ausencia de desecación, los ooquistes prolongan su viabilidad en el medio ambiente (Rose, 1997).

La viabilidad en el medioambiente de las bacterias presentes en las heces humanas, y durante los procesos de tratamiento de aguas, es muy similar a la de las bacterias patógenas. No obstante, virus, quistes de protozoos y parásitos son considerados más resistentes (Olivieri, 1982).

A la hora de elegir un microorganismo como indicador de contaminación fecal también hay que tener en cuenta la facilidad de su cultivo. Esto nos hace descartar a *B. fragilis*, que aún siendo el microorganismo más abundante, ya que se encuentra en casi el 100 % de la población, su cultivo entraña cierta dificultad. Otros grupos de microorganismos, también abundantes en las heces, son de fácil cultivo e identificación, lo que explica la elección de *coliformes totales* (CT), *fecales* (CF), y *estreptococos fecales* (EF) como indicadores microbiológicos de contaminación fecal (Godfree *et al.*, 1997). No obstante, algunos enterovirus muestran una mayor resistencia que estos indicadores en determinados ambientes acuáticos, así como en los procesos convencionales de tratamiento, incluida la desinfección (Gerba *et al.*, 1996). Esta razón ha determinado el empleo de microorganismos más resistentes, incluyéndose como indicadores los *colifagos* y *clostridios sulfito-reductores*.

| Grupo | Coliformes fecales | Estreptococos fecales | CF/EF |
|--------|--------------------|-----------------------|-------|
| Vaca | 230.000 | 1.300.000 | 0,18 |
| Cerdo | 3.300.000 | 84.000.000 | 0,04 |
| Oveja | 16.000.000 | 38.000.000 | 0,42 |
| Pollo | 1.300.000 | 3.400.000 | 0,38 |
| Pavo | 290.000 | 2.800.000 | 0,10 |
| Gato | 7.900.000 | 27.000.000 | 0,29 |
| Perro | 23.000.000 | 980.000.000 | 0,02 |
| Ratón | 330.000 | 7.700.000 | 0,04 |
| Conejo | 20 | 47.000 | 0,00 |
| Hombre | 13.000.000 | 3.000.000 | 4,33 |

A pesar de que muchos virus entéricos y quistes de protozoos patógenos sobreviven más que los coliformes, y que estos son más sensibles a la desinfección, el grupo de coliformes sigue siendo considerado como el más importante criterio sanitario

de calidad microbiológica para todo tipo de recursos acuáticos (Olivieri, 1982; Craun *et al.*, 1997; Rose, 1997; Steiner *et al.*, 1997).

El empleo de la relación CF/EF puede ser de gran utilidad para la determinación del origen humano o animal de la contaminación. Cuando el cociente CF/EF es mayor de 4 se trataría de una contaminación fecal de origen humano; cuando CF/EF es menor de 0.7 la contaminación es de origen animal; y en el intervalo entre 4 y 0.7 no se puede interpretar el origen de la contaminación, e incluso puede tratarse de una contaminación mixta humana-animal.

Los clostridios sulfito-reductores, al ser formadores de esporas, tienen una mayor resistencia a las condiciones ambientales y a la desinfección, por lo que se utilizan como indicadores de contaminación fecal antigua (Edberg *et al.*, 1997).

También se han utilizado otras especies o grupos como indicadores microbiológicos de contaminación fecal, pero no ofrecen suficientes ventajas para la sustitución de los comentados anteriormente. Así, se han realizado estudios para la utilización de *Bifidobacterium*, levaduras, *Aeromonas*, etc. (Olivieri, 1982; Araujo *et al.*, 1991; Stelzer *et al.*, 1992). Sin embargo, hay dos grupos que tienen una gran utilidad en el control sanitario: bacterias aerobias heterótrofas y bacteriófagos.

Las bacterias aerobias heterótrofas, no representan a ningún grupo de bacterias en particular pero tienen una gran utilidad para evaluar la calidad de las aguas, ya que reflejan la carga total microbiana. Se utilizan los recuentos a 22 y 37 °C, aunque este último tiene mayor interés sanitario (Pérez López y Espigares García, 1999).

Los bacteriófagos, especialmente los colifagos, se han evaluado como indicadores de virus entéricos, ya que son más resistentes que éstos; el inconveniente que tienen es la escasa prevalencia de individuos con colifagos en heces (<2 %), por lo que se requieren estudios que permitan su valoración (Bull y Kopyler, 1991).

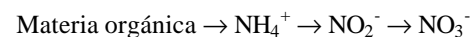
INDICADORES QUÍMICOS INDIRECTOS DE CONTAMINACIÓN FECAL

La contaminación fecal del agua produce dos hechos notables desde un punto de vista sanitario: a) la incorporación de gran número de microorganismos pertenecientes a la flora fecal, y b) incorporación de materias orgánicas fecales. El primero de ellos justifica, como se ha expuesto, el empleo de indicadores microbiológicos, mientras que la incorporación de materias fecales deberá condicionar el tipo de indicadores químicos (OMS, 1995).

Los indicadores químicos de contaminación fecal que han sido considerados clásicamente son (Fernández-Crehuet Navajas *et al.*, 1991; Espigares García y Fernández-Crehuet Navajas, 1999): Materia orgánica, cloruros, nitratos, nitritos y amonio.

A los cloruros se les ha dado el carácter de indicador debido a que se encuentran en gran cantidad en la orina del hombre y animales. No obstante, han perdido valor como indicador de contaminación fecal debido a que se encuentran presentes en todo tipo de aguas, a veces en concentraciones excesivas, debido a la sobreexplotación de acuíferos e intrusiones de aguas marinas.

Nitratos, nitritos y amonio se producen en los procesos de desaminación y nitrificación que sufre la materia orgánica tras la contaminación fecal, a expensas de la propia flora microbiana de las heces:



El amonio, al producirse en el primer paso de la mineralización, constituye probablemente el mejor indicador químico indirecto de contaminación fecal en las aguas. Los nitritos, en cambio, constituyen un paso intermedio en el proceso de oxidación, por lo que el contenido es variable, y no muestra buena correlación con el grado o la antigüedad de la contaminación fecal. En cuanto a los nitratos, debido a su amplia utilización como abono agrícola, también se pueden encontrar, sobre todo en las aguas subterráneas, en concentraciones excesivas, por lo que han perdido gran parte de su valor como indicadores.

Con frecuencia también se utilizan diversas sustancias tales como fosfatos, clorofila, turbidez, etc. (Pipes, 1982). El coprostanol, uno de los esteroides más abundantes en heces humanas, se ha utilizado también como indicador químico de contaminación fecal específico de heces humanas (Hoskin, 1987; Hoskin y Bandler, 1987; Leeming *et al.*, 1996; Elhmmali *et al.*, 1997; Leeming *et al.*, 1997), obteniéndose buenas correlaciones con coliformes fecales y clostridios sulfito-reductores (Nichols *et al.*, 1993). La medida de coprostanol ofrece varios diagnósticos y avances cuantitativos sobre las técnicas tradicionales para detectar contaminación humana frente a la debida a fuentes animales, pero no se ha generalizado por su dificultad de determinación (Sherblom, 1997).

Los indicadores microbiológicos y químicos se correlacionan aceptablemente, aunque a veces esta correlación depende del tipo de muestras y condiciones de las aguas, por lo que los parámetros químicos facilitan el control de la contaminación fecal, ya que su determinación requiere un menor tiempo (OMS, 1995).

EL VIRUS DE LA HEPATITIS A

El VHA se clasifica en función de sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas, como género *Hepatovirus*, dentro de la familia *Picornaviridae* (Murphy, 1995; Melnick, 1999; Prescott *et al.*, 1999). Es un virus pequeño, esférico, de 27 nm de diámetro y carente de envoltura, y con microscopía electrónica mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico, se ha visto que posee una

estructura fina de simetría icosaédrica, con 12 pentámeros, compuesto por un genoma de una hebra de RNA positivo, es decir, el RNA viral actúa como mensajero (Coppola *et al.*, 1996; Ginsberg, 1996).

Este ácido nucleico es capaz de generar un total de 11 proteínas distintas, de las que 4 darán lugar a la cápside que envuelve el genoma. Estas cuatro proteínas se denominan VP1, VP2, VP3 y VP4, con peso molecular de 33, 27 y 29 kd las tres primeras; la última, VP4, consta solamente de 17 aminoácidos y su función no está claramente definida. Mientras que el sistema inmune del hombre infectado responde con la formación de anticuerpos frente a las tres primeras proteínas, no responde frente a la cuarta, probablemente debido a su pequeño tamaño. VP1, es la de mayor tamaño, y es la que origina una mayor formación de anticuerpos neutralizantes (Picazo de la Garza y Romero Vivas, 1991). Las proteínas más superficiales VP1 y VP3 son las que presentan una mayor afinidad por los anticuerpos.

El genoma del VHA, como ya hemos dicho, está formado por una única cadena de RNA lineal, de polaridad positiva, en el sentido del mensaje, es infeccioso aún desprovisto de la cápside y tiene una secuencia de 7478 bases y tres regiones (Maroto Vela y Piédrola Angulo, 1996):

- a) Una región 5' no codificante o 5'NTR, muy constante, con homología entre las distintas cepas aisladas de cerca del 95 por 100. Tiene funciones reguladoras. A ella se encuentra unida, de forma covalente, una proteína denominada Vpg.
- b) Una región 3' no codificante o 3'NTR, seguida de una secuencia poly-A.
- c) Una región de lectura abierta (ORF), en la que se diferencian tres regiones P1, P2 y P3. P1 es capaz de dar lugar a las proteínas estructurales del virión, identificadas y separadas en VP1, VP2, VP3 y, probablemente, VP4, de existencia no clara. Las regiones P2 y P3 originan proteínas no estructurales cuyas acciones son de carácter enzimático (capacidad de actuación en la transcripción, RNA polimerasa, etc.).

El genoma del VHA presenta una gran estabilidad genética en todas las cepas aisladas, por lo que parece ser que existe un solo tipo antigénico. La zona más constante sería la correspondiente al extremo 5', y la más variable se encontraría en la región VP1/2A. El VHA no presenta antígenos comunes con otros virus hepatotropos, por lo que no existen actividades cruzadas que dificulten el diagnóstico ante un cuadro clínico (Maroto Vela y Piédrola Angulo, 1996).

Hay tres genotipos de VHA, basados en la diversidad que presenta el 15 % de la secuencia de nucleótidos de la VP1, y sólo se conoce un serotipo (Coppola *et al.*, 1996).

Debido a sus características estructurales, es un virus muy estable y resistente a los agentes físicos y

químicos, lo que explica su gran facilidad para transmitirse a través del agua y de alimentos en condiciones teóricamente adversas para el virus; no se afecta por agentes que inhiben normalmente a otros picornavirus, y en condiciones de humedad del 42 % aproximadamente, es estable a temperaturas de 60 °C durante una hora, 25 °C durante un mes, 5 °C durante tres meses, o durante años cuando se mantiene en congelación a -20 °C. Resiste igualmente altos grados de acidez (pH 2), y la acción del éter, del cloroformo y detergentes no-iónicos (Siegl *et al.*, 1984; Forbes y Willians, 1991). También puede sobrevivir durante días o meses y por períodos más largos que los poliovirus en agua dulce, agua salada, suelo y sedimentos marinos, así como en heces desecadas o en superficies de poliestireno.

El VHA no se inactiva por cloraminas o por ácido percloroacético, pero sí en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, por radiaciones ultravioleta, glutaraldehído, formalina, beta-propiolactona, permanganato potásico, yodo, cloro o compuestos clorados, y con formol diluido 1:400 durante 3 días a 37 °C, o durante 5 minutos a 100 °C (Thraenhart, 1991; Ayliffe y Babb, 1999). Los viriones son relativamente resistentes a los desinfectantes comunes.

Estudios de transmisión y abundantes datos epidemiológicos indican que el virus existe en un solo tipo inmunológico y que a la infección sigue una inmunidad duradera. Los anticuerpos aparecen al poco del inicio de la enfermedad clínica, los niveles de anticuerpos aumentan lentamente y persisten años (Ginsberg, 1996).

La replicación *in vitro* de cepas obtenidas de muestras clínicas ha encontrado todo tipo de dificultades, aunque se han establecido algunas líneas celulares de probada sensibilidad, lo que ha permitido la elaboración de una vacuna. La multiplicación del virus se puede llevar a cabo en células de mono verde africano, células fetales del mono rhesus, células Vero, células pulmonares diploides humanas y en línea celular de carcinoma hepático humano. Se ha secuenciado la totalidad del genoma a partir de DNA_c clonados, y está organizado como el de otros picornavirus.

El virus penetra por vía oral, sospechándose un posible proceso replicativo en orofaringe, e incluso en la mucosa del intestino delgado. A partir de dicha mucosa se produce una fase de viremia, y por la circulación portal es transportado al hígado donde se replica, observándose la formación de vesículas citoplasmáticas. Posteriormente se elimina del hígado y se excreta por las heces, pudiéndose detectar en las heces, contenido duodenal, sangre y orina durante la fase preictérica y el inicio de las fases ictericas.

El comienzo de la ictericia suele anunciar la próxima terminación de la eliminación del virus. Estudios sobre la transmisión humana señalan que los virus pueden eliminarse de las heces durante períodos algo más largos. Cuando existen virus en heces también existen en células hepáticas y bilis. Los

anticuerpos aparecen cuando el título de virus disminuye y el daño hepático se hace manifiesto, lo que hace pensar que el daño hepático puede ser debido a mecanismos inmunológicos.

Tras un período de incubación que oscila entre los 10 y 50 días, con una media aproximada de 28 días, el cuadro comienza bruscamente con una serie de síntomas comunes al de todas las hepatitis víricas, tanto de carácter inespecífico (fiebre, malestar, náuseas, vómitos, astenia), como específicos de alteración hepática. Puede cursar de forma subclínica, o siguiendo las tres fases típicas: estadio preictérico (con los síntomas generales ya descritos), icterico (que puede mantenerse un tiempo medio de 1-3 semanas), y de convalecencia (que permanece hasta la normalización de las enzimas séricas). Las transaminasas pueden permanecer positivas hasta varias semanas o meses, dependiendo de la gravedad del cuadro. En general es un proceso benigno (sobre todo en niños), siendo rara la aparición de hepatitis fulminante. No se relaciona con cirrosis ni con carcinoma hepático.

La hepatitis A es una enfermedad distribuida de forma universal, si bien, factores como el nivel socioeconómico y las condiciones higiénico-sanitarias hacen variar el grado de endemismo entre unas zonas y otras. La prevalencia de anticuerpos anti-VHA totales en una población nos indica el grado de endemidad de ésta (Rodés Teixidor y Ampurdánés i Mingall, 1993). En los países subdesarrollados, la práctica totalidad de la población se encuentra inmunizada tras haberse infectado, casi siempre de forma asintomática, durante la infancia. Por el contrario, en los países industrializados, mejores hábitos higiénicos dificultan la inmunización infantil apareciendo casos clínicamente más aparentes en edades tardías.

La frecuencia de la enfermedad en el mundo no se conoce con exactitud, dado que un elevado porcentaje de casos son asintomáticos y los que se manifiestan clínicamente no siempre son declarados.

Los estudios seroepidemiológicos han permitido saber que aproximadamente el 50 % de la población adulta de Estados Unidos presenta anticuerpos frente al VHA; en Francia, estas cifras llegan al 76 %; en Australia, al 55 %, aumentando hasta el 100 % en ancianos mayores de 70 años; en Suecia, al 13 %, y en Yugoslavia, al 97 %.

Estudios realizados en Israel sobre personas procedentes de distintos continentes han mostrado que el porcentaje de personas con anticuerpos era el 41 % para los procedentes de América y Europa y el 88 % para los procedentes de África y Asia, en personas entre 25 y 29 años, pero en personas mayores de 40 años las diferencias desaparecían de unos continentes a otros (Sáenz González y González Celador, 1991).

En España, la notificación de los casos de hepatitis se hacía de forma conjunta, sin diferenciar entre los distintos tipos existentes, bajo la denominación de hepatitis vírica. A partir de 1997,

con la nueva lista de enfermedades, pasaron a notificarse individualizadamente, y de forma independiente, los casos de hepatitis A, hepatitis B y otras hepatitis víricas. Según datos del Boletín Epidemiológico Semanal, en conjunto, en 1996 se notificaron 7.533 casos, 5.627 casos (14,11 por 100.000 habitantes) en 1997, 2041 casos en 1998, 1452 casos en 1999, y 972 casos en 2000, datos que demuestran una tendencia descendente de la incidencia de hepatitis A.

La prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis A (AcVHA), va aumentando con la edad: en España es del 5 % a los 7 años, 18 % a los 13, 40 % entre los 20-29 años y más del 80 % en los mayores de 30 años, si bien estos valores están en descenso. Es habitual la presentación en forma de brotes:

- Por transmisión directa en colectivos: guarderías.
- Por consumo de productos contaminados (agua, moluscos).

La mortalidad por hepatitis A es baja, oscilando entre 0,1 y 0,2 %.

En Bélgica, un estudio realizado por la red centinela de médicos generalistas de Bélgica, durante los años 1991 y 1992, determinaron una incidencia anual de la hepatitis A de 23 casos por 100.000 habitantes. La edad del 63 % de los pacientes oscilaba entre los 20-49 años, el 23 % era menor de 20 años y el 59 % eran hombres. El contacto no profesional con pacientes de hepatitis fue el factor de riesgo más importante (27 %), seguido de visitas a regiones endémicas (12 %), consumo de alimentos contaminados (12 %), e intervenciones quirúrgicas (12 %). Entre 1993 y 1997, se observa cada año un máximo en el mes de octubre seguido de una disminución gradual hasta el otoño siguiente, demostrándose que todos los picos otoñales estaban relacionados con infecciones inicialmente contraídas en países extranjeros, especialmente Marruecos y Turquía (Devroey *et al.*, 1997).

A escala mundial, anualmente se declaran 1,4 millones de casos de hepatitis A en todo el mundo, pero se estima que las cifras reales son 3 a 10 veces mayores. La mayoría de casos ocurren en Asia y África (Forbes y Williams, 1991).

En Europa se dan unos 278.000 casos al año, y aunque la incidencia de hepatitis A está disminuyendo, el riesgo de infección es aún alto en la región Mediterránea debido a la comida y agua contaminadas (Graff *et al.*, 1993).

El reservorio es exclusivamente humano. Son los individuos infectados por el virus que excretan el virus o partículas de éste por las heces. En pacientes asintomáticos, el período de eliminación es variable. El período de incubación es de 15-50 días (media 28). El período de máxima transmisibilidad comprende las dos semanas anteriores al inicio de la clínica (ictericia). No se ha demostrado la existencia de portadores crónicos.

La población susceptible la constituyen todos los individuos no inmunizados. El contacto con el

virus genera una inmunización permanente. Cuando los factores ambientales favorecen la amplia transmisión feco-oral, y la infección se produce en los más pequeños, se presenta como enfermedad endémica. En estas condiciones, la enfermedad en adultos es infrecuente y las epidemias son raras.

Bajo buenas condiciones sanitarias, la propagación del virus está restringida y frecuentemente se llega a la edad adulta sin inmunidad. En estas poblaciones no inmunes son probables las epidemias, siendo normalmente consecuencia de la contaminación del agua o de los alimentos (Ginsberg, 1996).

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS

La transmisión se realiza por vía feco-oral, ya que al mantenerse poco tiempo la viremia, la transmisión sanguínea es mínima. Por ello, el contagio se hace fundamentalmente por agua o productos alimenticios contaminados (epidémico), o por contacto persona a persona, preferentemente en niños (esporádico). Es una enfermedad de distribución mundial, aunque con diferentes grados de endemicidad, en la que influyen mucho las condiciones higiénico-sanitarias, así como el nivel económico y cultural.

Como ya se ha mencionado, en muy raras ocasiones puede producirse transmisión sexual, y también puede existir transmisión parenteral pero es muy poco frecuente.

La *población susceptible* son los individuos no inmunizados. Existe una serie de personas que, bien por su lugar geográfico, nivel cultural, trabajo que desempeñan, etc., presentan un mayor riesgo de contraer la infección, siendo algunos de ellos (American Liver Foundation, 1997):

- a) Personas que viven en áreas de alta incidencia de infecciones de hepatitis A.
- b) Niños de más de dos años que van a centros de cuidado diurno y el personal de los mismos.
- c) Personas que manipulan comida.
- d) Pacientes enfermos crónicos del hígado.
- e) Algunas poblaciones de alto riesgo como las poblaciones indígenas.
- f) Usuarios de drogas intravenosas.
- g) Viajeros a países con índices de sanidad deficientes y altas incidencias de infección de hepatitis A.

El VHA se propaga de persona a persona, por el mecanismo directo ano-manos-boca y por la contaminación fecal de alimentos y agua. Las personas infectadas que manipulan alimentos pueden transmitir el virus si no se lavan las manos con agua y jabón después de cada evacuación. También se transmite al comer mariscos crudos o parcialmente cocinados que se han recolectado en aguas que contienen aguas residuales sin tratamiento, o al beber agua o usar hielo contaminado con VHA. Las frutas, verduras y otros alimentos crudos que han sido

contaminados con VHA durante la manipulación también pueden facilitar la propagación del VHA si no se limpian apropiadamente. El virus también es comúnmente transmitido en centros de cuidado diurno para niños por contaminación fecal-oral en el momento del cambio de pañales. Además, la posibilidad de transmisión aumenta cuando la persona tiene una pobre higiene personal.

Es probable que a diferencia de la ebullición, que inactiva el VHA, el vapor que sirve únicamente para abrir las valvas de los moluscos no inactiva el virus. La contaminación en el momento de la recolección o del envasado de alimentos refrigerados que no son cocidos, una vez descongelados, ha sido reconocida como otra fuente de infección.

La transmisión de la hepatitis A por otros mecanismos ha aumentado en los países desarrollados, encontrándose una fuerte asociación entre infección aguda por VHA y drogadicción por vía endovenosa. También existen estudios que relacionan la hepatitis A con las transfusiones sanguíneas. El suero y la saliva, en la fase aguda, son mucho menos infecciosos que las heces. La orina y el semen son solo ocasionalmente responsables de la transmisión de la infección. La transmisión por actividad sexual oro-anal presumiblemente se produce, pero es poco probable que tenga significación epidemiológica (Forbes y Williams, 1991).

Es bien conocido que el contacto con niños infectados pero asintomáticos, en especial en edad preescolar, representa un riesgo de infección por VHA. Los hospitales de día y las unidades de cuidados intensivos neonatales parecen ser puntos epidemiológicamente favorables para los brotes de VHA (Forbes y Williams, 1991).

TECNICAS DE DETECCIÓN DEL VHA

Diagnóstico en el enfermo

El diagnóstico de la enfermedad en el laboratorio puede realizarse con tres tipos distintos de pruebas:

1) *Pruebas de lesión hepática*, comunes a todas las hepatitis víricas, tales como determinación de enzimas séricas o pruebas histopatológicas. Sólo indican alteración del hígado.

2) *Diagnóstico directo*, en el que podemos comprobar:

- a) Determinación de partículas víricas a partir de las heces, dentro de los 10 días previos al comienzo de la ictericia, persisten hasta los 3 meses, incluso después de que los niveles de alanino-aminotransferasa (ALT) vuelvan a la normalidad. La microscopía electrónica puede identificar partículas víricas en las heces, pero normalmente las concentraciones son bajas, e incluso con métodos inmunes se requieren concentraciones de al menos 10^6 partículas/ml.

- b) El antígeno VHA (AgVHA) puede ser detectado más fácilmente en las heces al inicio de la evolución de la enfermedad, y el inmunoensayo puede proveer un diagnóstico específico de infección aguda. Sin embargo, los niveles de AgVHA en heces disminuyen rápidamente con el inicio de los síntomas. Para su determinación se utilizan técnicas de ELISA o RIA, pero tienen escasa sensibilidad (Maroto Vela y Piédrola Angulo, 1996). La sensibilidad de todas las pruebas para examinar la presencia de virus o de componentes virales en las heces disminuye rápidamente con el transcurso del tiempo tras la inoculación (Forbes y Williams, 1991; Xiang y Stapleton, 1999).
- c) El cultivo de las heces se puede llevar a cabo en líneas celulares.

3) *Diagnóstico serológico (indirecto)*: El diagnóstico de infección por VHA se sustenta en el hallazgo de los marcadores específicos de dicho virus en el suero del paciente afecto. Fundamentalmente se determinan los anticuerpos anti-VHA ya sea en su fracción IgM o en su totalidad. También se utiliza el antígeno y el RNA del VHA, que es útil en la investigación de posibles fuentes de contagio (agua, alimentos, etc.).

La prueba más sensible y específica para el diagnóstico de la hepatitis A es el radioinmunoanálisis (RIA), que permite asegurar el diagnóstico entre el 90 y el 100 % de los casos. Las IgM tienen una vida muy corta, por lo que su detección es indicativa de infección aguda, mientras que las IgG tienen una vida más larga y son predominantes en la fase de convalecencia. Otra técnica muy utilizada es ELISA. Ambas tienen capacidad para diferenciar IgM e IgG.

Para la detección de anticuerpos totales se han utilizado, además, hemaglutinación inmunoadherente, inmunoanálisis enzimático e inmunofluorescencia (Sáenz González y González Celador, 1991).

INVESTIGACIÓN DEL VHA EN AGUAS

Avances en biología molecular en los últimos años han abierto nuevas fronteras en la identificación y caracterización de microorganismos. Las nuevas técnicas nos permiten detectar microorganismos presentes en muestras de distintas procedencias, aunque su presencia sea mínima, ya que podemos amplificar el material genético y obtener millones de copias.

Concentración de virus en aguas

La densidad de los virus entéricos en las aguas limpias y residuales suele ser tan baja que se hace necesaria la concentración de los mismos,

excepto tal vez en las aguas fecales de determinadas áreas o estaciones (Dahling *et al.*, 1974).

Los métodos de concentración de los virus son, a menudo, capaces de procesar tan sólo volúmenes limitados de agua de una calidad determinada. A la hora de elegir el método de concentración habrá de tenerse en cuenta la probable densidad del virus, las limitaciones de volumen de un determinado tipo de agua y la existencia de componentes susceptibles de interferir en el proceso.

Entre las distintas técnicas de concentración de virus en el agua podemos señalar: absorción y elución de filtros de microporo, hidroextracción-dialisis con polietilenglicol (PEG), y la adsorción-precipitación con hidróxido de aluminio, siendo este último método el más fácil de realizar (Espigares *et al.*, 1999). Con este método se pueden concentrar los virus de pequeños volúmenes de aguas limpias y residuales. Se basa en interacciones electrostáticas entre la superficie vírica de carga negativa y la carga positiva del hidróxido de aluminio, así como la coordinación de la superficie del virus por los complejos de hidroxialuminio (coagulación-floculación). Los virus son adsorbidos a un precipitado de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y se recogen las partículas que los contienen mediante centrifugación (A.P.H.A., 1992).

Extracción de RNA

El paso previo a la amplificación, requiere la extracción del RNA. El RNA es fácilmente degradable por su propia naturaleza, así como por la acción de enzimas RNAsas, lo que se evita mediante la congelación de la muestra. Otra fuente importante de RNAsas es el sudor de las manos (Maniatis *et al.*, 1989), por lo que el uso de guantes es imprescindible para trabajar con RNA. Por este motivo el material de laboratorio debe ser tratado con dietilpirocarbonato, que es un potente inhibidor de RNAsas, además de las medidas habituales de esterilización.

En cuanto al proceso de extracción del RNA, se han descrito varios métodos. El más utilizado es la digestión en frío (4 °C) con isotiocianato de guanidina (Chomczynsky y Sacchi, 1987). La guanidina es un agente caotrópico que disocia las nucleoproteínas de los ácidos nucleicos e inactiva las RNAsas sin interferir con otras actividades enzimáticas que se utilizarán posteriormente (Kawasaki, 1990). Del homogenado resultante una vez digerido con la guanidina se extrae el RNA mediante fenol ácido, cloroformo y alcohol isoamílico, y se precipita con isopropanol a -70 °C. Es importante tener en cuenta que el RNA extraído mediante este proceso es de tipo total.

Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Hasta hace poco tiempo la única forma de amplificar el DNA era mediante proliferación

biológica, es decir, previa inserción del fragmento de DNA en una bacteria o vector viral y multiplicación en el interior celular. Este método presenta todavía varios problemas asociados al mantenimiento y uso de líneas celulares o a las mutaciones *de novo* en el vector y en el genoma de la célula huésped. Además el DNA diana debe ser puro y no puede estar mezclado con otras secuencias de DNA u otros componentes orgánicos. Todos estos problemas se solucionan gracias al desarrollo del método de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR: polymerase chain reaction), cuya importancia radica en la posibilidad de amplificar un determinado fragmento de DNA mediante una reacción química. El método de la PCR fue desarrollado en 1987 por un equipo de técnicos de Cetus Corporation y permite la amplificación de fragmentos de DNA longitudinales comprendidas entre cien y varios miles de pares de bases mediante ciclos repetitivos de tres reacciones simples, las cuales sólo varían en la temperatura de incubación. Por tanto, toda la reacción se produce en el mismo medio y el proceso es totalmente automatizado.

Los reactivos empleados son:

- Dos fragmentos de DNA, generalmente de 20-40 pares de bases, que se llaman *primers* o iniciadores, y que son complementarios cada uno de ellos a los extremos 5' de la secuencia de DNA de interés.
- Desoxirribonucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) en exceso, pero entre ellos en la misma proporción.
- Taq polimerasa, enzima termoestable que promueve la síntesis de DNA. Esta enzima fue aislada del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*, microorganismo que prospera a 75 °C, temperatura a la que la enzima tiene gran actividad a lo que se une la resistencia a las altas temperaturas (95 °C) requeridas para la desnaturalización y separación de ambas cadenas de DNA.

La reacción es llevada a cabo mediante diferentes pasos que a su vez son repetidos cíclicamente hasta un total de 30-35 ciclos en un termociclador, que permite reproducir los ciclos con gran exactitud. El primer paso, de la reacción, conduce a la desnaturalización mediante temperaturas lo suficientemente elevadas (90-95 °C) para romper los puentes de hidrógeno de la doble cadena de DNA. El segundo paso conduce, a un enfriamiento de la mezcla para permitir la hibridación de los primers a las secuencias complementarias. En el tercer paso, se eleva la temperatura hasta 72 °C, donde es máxima la actividad de la Taq polimerasa, que empieza a sintetizar nuevo DNA, empezando por las regiones en que el DNA está en forma de doble banda (primers-DNA), debido a que cada uno de los primers se han unido a la región complementaria del DNA. Esta síntesis se produce en el sentido 5' → 3' a lo largo de la cadena y a una velocidad de 120 nucleótidos por

segundo. El producto de la reacción es de nuevo calentado a 95 °C, con lo cual se vuelven a separar todas las cadenas de DNA, que actuarán de nuevo como diana. El hecho esencial de la PCR lo constituyen el que cada uno de los productos de cada ciclo actúa como diana en el siguiente ciclo de síntesis de DNA y el resultado de esta reacción en cadena es la amplificación geométrica del mismo (Quirós y García, 1992).

La PCR es un método muy específico debido a la precisión del acoplamiento primer-DNA que acontece en el segundo paso de cada ciclo, que permite una identificación altamente sensible del genoma viral. Además, la especificidad del test es garantizada mediante la visualización por medio de la electroforesis, de una banda correspondiente al peso molecular de la secuencia amplificada, junto al uso de una sonda con secuencia complementaria a la región comprendida entre los primers, evitando así la aparición de falsos positivos debido a la hibridación de éstos. La sensibilidad del método viene determinada por el aumento geométrico de la cadena del DNA diana. La técnica PCR puede detectar la presencia de una sola copia en la muestra original.

El revelado del producto amplificado es el paso final del método y puede realizarse de diversas maneras. El camino más fácil es visualizar el DNA después de la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida mediante el revelado con bromuro de etidio, procedimiento que requiere la existencia de, al menos, 1 a 10 ng de DNA amplificado. Para una mayor sensibilidad se puede proceder a la hibridación en medio sólido o líquido por distintos métodos.

Hoy día, han aparecido modificaciones a la técnica PCR e incluso nuevas técnicas para amplificar ácidos nucleicos, como son: doble PCR o *nested*-PCR, reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena del promotor T (TCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción y el sistema de la Q-β-replicasa. Estos sistemas están aún en fase de experimentación y, salvo la *nested*-PCR, tienen por el momento poca aplicación práctica.

Transcriptasa reversa para la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Esta técnica permite aplicar las ventajas de la tecnología de PCR a la detección de RNA. Para esto se realiza un paso anterior a la PCR en el que, usando una enzima transcriptasa inversa, se transcribe el RNA a su correspondiente DNA complementario (DNAC) y ésta se utiliza como base para una posterior PCR.

NESTED-PCR Y SEMINESTED-PCR

En este caso se pretende realizar una doble amplificación con dos parejas de primers, de tal forma que la segunda pareja reconoce y amplifica una región interna del primer amplificado (Haqqi *et al.*, 1988). Así se consigue aumentar la sensibilidad y la

especificidad, por lo que es muy útil si la concentración del DNA diana es baja. Para evitar las posibles contaminaciones causadas al cambiar el producto de PCR de tubo para una segunda amplificación se ha desarrollado la técnica de la nested-PCR en un solo tubo, en la que se añade sobre el mismo tubo la segunda pareja de primers, en una concentración 50 veces mayor que la de la primera, con lo cual se asegura que la reacción ocurre con estos (TAng y Persing, 1999).

Una modificación de esta técnica es la seminested-PCR que utiliza un primer nuevo, para amplificar una secuencia interna del producto de PCR (Apaire-Marchais *et al.*, 1994; Le Guyader *et al.*, 1994).

Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos

Una reacción de hibridación es el proceso por el cual dos monocadenas de DNA, RNA o una de DNA y otra de RNA, de distinto origen y que muestran complementariedad de bases, se unen formando una molécula estable que recibe la denominación de híbrido. Cuanto mayor sea la proporción de bases complementarias y la longitud de las secuencias complementarias variables no necesariamente relacionadas, mayor será la estabilidad del híbrido formado. La técnica de hibridación se basa en el apareamiento del ácido nucleico a estudiar con una molécula de DNA o RNA conocida y llamada sonda, reacción que puede ponerse de manifiesto gracias a la incorporación de un sistema indicador bien radiactivo o no radiactivo, colorimétrico o fluorimétrico.

La estrategia de una reacción de hibridación es sencilla: el DNA de doble cadena presenta la característica de desnaturalizarse por la acción del calor, a una temperatura característica de cada molécula que recibe el nombre de temperatura de disociación, y es aquella temperatura a la que una molécula se encuentra disociada en un 50 %. Una molécula de DNA desnaturalizada mediante la acción del calor puede volver a formar la doble hélice cuando la temperatura desciende. Cuando este apareamiento se produce entre ácidos nucleicos de diferentes fuentes que tienen en común secuencias complementarias se forma una molécula híbrida de doble cadena mediante la reacción de hibridación (Goldford, 1986; Meinkoth, 1989).

La mayoría de los protocolos para realizar una reacción de hibridación emplean un isótopo radiactivo para marcar la sonda, generalmente el ^{32}P y más raramente ^{35}S o ^3H ; o se emplean nucleótidos marcados con moléculas más grandes como biotina, digoxigenina o enzimas. Para detectar la hibridación se recurre a la autorradiografía en el caso de las sondas radiactivas, avidina o anticuerpos antidigoxigenina ligados a una enzima que al actuar sobre un sustrato específico originan productos coloreados, o

bien este sustrato directamente si se trata de sondas enzimáticas.

Existen varios formatos o técnicas para llevar a cabo la hibridación:

- Hibridación en filtro o *dot-blot*. La muestra se fija sobre membranas de nitrocelulosa o nylon mediante calor o luz ultravioleta, y sobre este soporte sólido se añade la sonda que se va a utilizar.
- Hibridación por *southern-blot*. Permite analizar fragmentos de DNA de una muestra separados por la acción de la corriente eléctrica.
- Hibridación por *northern-blot*. Es una técnica equivalente al Southern pero referida al RNA.
- Hibridación en solución. No se usa soporte sólido. Al ponerse en contacto el DNA diana y la sonda en un sistema disperso solución, el híbrido, si se ha formado, puede detectarse por centelleo o fluorimetría, o bien separarlo en un gel de poliacrilamida y realizar una autorradiografía.
- Hibridación *in situ*. Se emplea para analizar la existencia de una determinada secuencia de bases en un tejido fijado con formalina y montado con parafina. Se suele emplear como indicador la molécula de biotina que se detecta con avidina y fosfatasa alcalina o peroxidasa conjugada.
- Detección con anticuerpos. La estrategia consiste en obtener anticuerpos monoclonales anti doble cadena de DNA, realizando posteriormente un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Las técnicas de hibridación se están introduciendo poco a poco en la rutina de los grandes laboratorios de control microbiológico de aguas. Así, existen en el mercado sondas y reactivos para la detección de un gran número de microorganismos. Para aumentar su sensibilidad se puede combinar con los métodos de amplificación de ácidos nucleicos tratados anteriormente.

BIBLIOGRAFÍA

- A.P.H.A. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. (1992). American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation (eds.), 17ª edición, Ediciones Díaz de Santos, S. A., Madrid.
- Apaire-Marchais V., Ferre-Auvineau V., Colonna F., Dubois F., Ponge A. y Billaudel S. (1994). Development of RT-semi-nested PCR for detection of hepatitis A virus in stool in epidemic conditions. *Mol. Cell. Probe.* 8, 117-124.
- American Liver Foundation, (1997). Datos importantes sobre la Hepatitis A. 1-800-Go Liver (465-4837).
- Araujo R.M., Arribas R.M. y Pares R. (1991). Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 182-186.

- Ayliffe G.A.J. y Babb J.R. (1999). Decontamination of the Environment and Medical Equipment in Hospitals. In: *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, Russell A.D., Hugo W. B. y Ayliffe G.A.J. (eds.), 3ª edición, Blackwell Science, Oxford, pp. 395-415.
- Bezirtzoglou E., Dimitriou D. y Panagiou A. (1996). Occurrence of *Clostridium perfringens* in river water by using a new procedure. *Anaerobe*, **2**, 169-173.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (1982). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Coppola R., Rizzeto M. y Sorin D.W. (1996). Viral Hepatitis Handbook. Crivelli O. (ed.), Biomedica Diagnostics. S.P.A. Saluggia, Italy.
- Craun G.F., Berger P. S. y Calderon R.L. (1997). Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *J. Am. Water Works Ass.*, **89**, 96-104.
- Dahling D.R., Berg G. y Berman D. (1974). BGM: A continuous cell line more sensitive than primary rhesus and African green kidney cells for the recovery of viruses from water. *Health Lab. Sci.*, **11**, 275.
- Davies C.M., Long J.A.H., Donald M. y Ashbolt N.J. (1995). Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microb.*, **61**, 1888-1896.
- Devroey D., Van Casteren V. y Vranckx R. (1997). Cambios en el patrón de las hepatitis víricas agudas encontrados por médicos generales belgas. *Eurosurveillance, Informe de vigilancia*, **2**, 1-6.
- Edberg S.C., LeClerc H. y Robertson J. (1997). Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites. *Crit. Rev. Microbiol.*, **23**, 179-206.
- Elhmmali M.M, Roberts D.J. y Evershed R.P. (1997). Bile-acids as a new class of sewage pollution indicator. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3669-3668.
- Espigares M., Coca C., Fernández-Crehuet M., Moreno O. y Gálvez R. (1996). Chemical and microbiologic indicators of faecal contamination in the Guadalquivir (Spain). *Eur. Water Pollution Control*, **6**, 7-13.
- Espigares M., García F., Fernández-Crehuet M., Álvarez A. y Gálvez R. (1999). Detection of Hepatitis A Virus in Wastewater. *Environ. Toxicol.*, **14**, 391-396.
- Espigares García M. y Fernández-Crehuet Navajas M. (1999). Calidad del agua para consumo público. Caracteres físico-químicos. In: *Estudio Sanitario del Agua*, J.A. Pérez López y M. Espigares García (eds.), 2ª edición, Editorial Universidad de Granada, Granada, pp. 85-114.
- Espigares García M. y Moreno Abril O. (1999). Caracteres Microbiológicos. Aguas envasadas. Usos recreativos del agua. In: *Estudio Sanitario del Agua*, J.A. Pérez López y M. Espigares García (eds.), 2ª edición, Editorial Universidad de Granada, Granada, pp. 115-127.
- Forbes A. y Williams R. (1991). Epidemiología cambiante y aspectos clínicos de la hepatitis A. In: *Hepatitis Vírica*, A. J. Zuckerman (ed.), Edika-Med S.A., Barcelona, pp. 3-19.
- Ginsberg H.S. (1996). Virus de la hepatitis. In: *Tratado de Microbiología*, Bernard D. Davis, Renato Dulbecco, Herman N. Eisen and Harold S. Ginsberg (eds.), 4ª edición, Masson S.A., Barcelona, pp. 1037-1049.
- Godfree A.F., Kay D. y Wyer M.D. (1997). Fecal streptococci as indicators of fecal contamination in water. *J. Appl. Microbiol.*, **83**, S110-S119.
- Goldford P. (1986). Application of recombinant DNA technology to diagnostic. *J. Chem. Technol. Biot.*, **36**, 389-394.
- Graff J., Ticehurst J. y Bertram F. (1993). Detection of Hepatitis A Virus in Sewage Sludge by Antigen Capture Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microb.*, **59**, 3165-3170.
- Haqqi T.M., Sarkar G., David C.S. y Sommer S.S. (1988). Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Rev.*, **16**, 11844.
- Hoff J.C. y Akin E.W. (1986). Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environ. Health Persp.*, **69**, 7-13.
- Hoskin G.P. (1987). Identification of mammalian feces by thin layer chromatography of coprostanol: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 499-501.
- Hoskin G.P. y Bandler R. (1987). Identification of mammalian feces by coprostanol thin layer chromatography: method development. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 496-498.
- Jagals P., Grabow W.O.K. y Williams E. (1997). The effects of supplied water-quality on human health in an urban-development with limited basic subsistence facilities. *Water, S.A.*, **23**, 373-378.
- Kawasaki E.S. (1990). Amplification of RNA. In: *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (eds.), Academic Press Inc., New York, pp. 21-88.
- Leeming R., Ball A. Ashobolt N. y Nichols P. (1996). Using fecal sterols from humans and animals to distinguish fecal pollution in receiving waters. *Water Res.*, **30**, 2893-2900.
- Leeming R., Latham V., Rayner M. y Nichols P. (1997). Detecting and distinguishing sources of sewage pollution in Australian island and coastal waters and sediments. *ACS Sym. Ser.*, **671**, 306-319.
- Le Guyader F., Dubois E., Menard D. y Pommepuy M. (1994). Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus, and Enterovirus in Naturally Contaminated Shellfish and Sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. *Appl. Environ Microb.*, **60**, 3665-3671.
- Lippy E.C. y Waltrip S.C (1984). Waterborne disease outbreaks – 1946-1980: a thirty-five year perspective. *J. Am. Water Works Ass.*, **76**, 60-67.

- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories, New York.
- Maroto Vela M.C. y Piédrola Angulo G. (1996). Virus de las hepatitis. In: *Microbiología Médica general*, García Rodríguez J.A. y Picazo J.J. (eds.), vol 1, Mosby/Doyma Libros, S.A., Madrid, pp. 557-578.
- Meinkoth J. y Wahl G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, **267**-284.
- Melnick J. L. (1999). Taxonomy and Classification of Viruses. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover and Robert H. Yolken (eds.), 7ª edición, American Society for Microbiology, Washington, pp. 835-842.
- Murphy F.A. (1995). Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo y M.D. Summers (eds.), Springer-Verlag Wien, New York.
- Nichols P.D., Leeming R., Rayner M.S., Latham V., Ashbolt N.J. y Turner C. (1993). Comparison of the abundance of the fecal sterol coprostanol and fecal bacterial groups in innershelf waters and sediments near Sydney, Australia. *J. Chomatogr.*, **643**, 189-195.
- Olivieri V.P. (1982). Bacterial indicators of pollution. In: *Bacterial Indicators of Pollution*, W.O. Pipes (ed.), CRP. Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 21-41.
- OMS (1995). Aspectos microbiológicos. In: *OMS. Guías para la calidad del agua potable*, OMS (ed.), vol. 1, 2ª edición, Ginebra, pp. 8-30.
- Pérez López J.A. y Espigares García M. (1999): El agua en la naturaleza. Recursos de agua. In: *Estudio sanitario del agua*, J.A. Pérez López y M. Espigares García (eds.), 2ª edición, Editorial Universidad de Granada, Granada, pp. 33-51.
- Picazo de la Garza Juan J. y Romero Vivas José (1991). Hepatitis y Sida. Gráficas LAGA, S.L., España.
- Picazo J.J. (1999). Vacunas. In: *Guía práctica de Vacunaciones*, J.J. Picazo (ed.), 2ª edición, Artes Gráficas Llorens, Madrid, pp. 133-139.
- Pierre P. y Franco E. (1993). *Clostridium perfringens* and Somatic Coliphages as Indicators of the Efficiency of Drinking Water Treatment for Viruses and Protozoan Cysts. *Appl. Environ. Microb.*, **59**, 2418-2424.
- Pipes W.O. (1982). Indicators and water quality. In: *Bacterial indicators of pollution*, Pipes W.O. (ed.), CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, pp. 83-95.
- Prescott L.M., Harley, J.P. y Klein D. (1999). Microbiología. 4ª edición, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.
- Quirós E. y García F. (1992). Utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la detección y confirmación de infección por virus de transmisión hepática. *Lab 2000*, **36**, 33-35.
- Rodés Teixidor J. y Ampurdanés i Mingall S. (1993). Hepatitis víricas de transmisión no parenteral. Hepatitis A y E: su prevención. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, **17**, 197-203.
- Rose J.B. (1997). Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Publ. Health*, **18**, 135-161.
- Sáenz González M.C. y González Celador R. (1991). Infecciones por enterovirus, poliomielitis, hepatitis A y hepatitis E. In: *Medicina Preventiva y Salud Pública*, Piédrola Gil G. et al. (eds.), 9ª edición, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona, pp. 451-472.
- Sherblom P.M., Henry M.S. y Kelly D. (1997). Questions remain in the use of coprostanol and epicoprostanol as domestic waste markers. Examples from coastal Florida. *ACS Sym. Ser.*, **671**, 320-331.
- Siegl G., Weitz M. y Kronauer G. (1984). Stability of hepatitis A virus. *Intervirology*, **22**, 218-226.
- Steiner T.S, Thielman N.M. y Guerrant R.L. (1997). Protozoal agents. What are the dangers for the public water-supply. *Annu. Rev. Med.*, **48**, 329-340.
- Stelzer W., Jacob J. Feuerpfeil Y. y Schulze E. (1992). The occurrence of aeromonads in a drinking water supply system. *Zentralbl. Microbiol.*, **147**, 321-325.
- Tang Yi-Wei y Persing D. H. (1999). Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In: *Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Yolken (eds.), 7ª edición, American Society for Microbiology, Washington, pp. 215-244.
- Thraenhart O (1991). Measures for Disinfection and Control of Viral Hepatitis. In: *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Block Seymour S. (ed.), 4ª edición, Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, pp.445-471.
- Xiang J. y Stapleton J. T. (1999). Hepatitis A virus. In: *Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Yolken (eds.), 7ª edición, American Society for Microbiology, Washington, pp. 1014-1024.