

Virus en aguas de consumo

Miguel ESPIGARES GARCÍA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. España. Correo-e: mespigar@ugr.es

INTRODUCCIÓN

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

Seguramente el número de brotes y casos esporádicos de enfermedades causadas por virus transmitidos por el agua es mucho mayor que el de los asociados a bacterias y protozoos. Sin embargo, no se tiene información adecuada debido a varias causas:

- Los virus son más difíciles de detectar en todos los medios acuáticos.
- Son a menudo confundidos con infecciones no específicas.
- La epidemiología es usualmente difícil por la trivialidad de la mayoría de las infecciones virales, de modo que pocas veces llega la información a las autoridades sanitarias.

Estudios realizados en los años 40 demostraron que los poliovirus podían sobrevivir en las aguas residuales, contaminando los recursos hídricos que originarían infecciones.

Las principales áreas de interés de las infecciones virales transmitidas por el agua son la naturaleza de los brotes, el origen de los virus, los métodos de detección y la supervivencia en el medio ambiente acuático.

Las enfermedades virales transmitidas por el agua pueden ocurrir por consumo de agua de bebida, por contacto a través de la piel o por inhalación, cuando ocurre una contaminación fecal del agua con aguas residuales humanas.

Los brotes de infecciones asociados al agua de bebida son usualmente el resultado de uno de los siguientes eventos:

- Inadecuada eliminación de microorganismos durante el tratamiento.
- Fracaso en los procesos de tratamiento, especialmente en la cloración u otros sistemas de desinfección.
- Rotura de la integridad de la infraestructura de distribución o de eliminación de aguas residuales.

Ha sido más problemático determinar el uso recreativo del agua como causa de infección viral, siendo los riesgos más frecuentes asociados con piscinas y balnearios (conjuntivitis por adenovirus y transmisión de poliovirus y echovirus). Las infecciones virales transmitidas a través de las actividades recreativas en aguas de mar son particularmente difíciles de confirmar y cuantificar.

VIRUS TRANSMITIDOS POR EL AGUA

Adenovirus

El nombre de *adeno* hace referencia al tejido adenoide en el que se encontraban estos virus en infecciones persistentes

Son virus sin cubierta externa, de 70 a 100 nm de diámetro, de ADN lineal de doble cadena (36 kb), constituidos por una cápside proteica icosaédrica compuesta por capsómeros (240 hexonas y 12 pentonas que forman los vértices) y a partir de la base de las pentonas se proyectan fibras. Todos estos componentes tienen especificidad antigénica, siendo los anticuerpos neutralizantes los específicos de los antígenos de las hexonas. Además de estas proteínas estructurales existen al menos otras 10 proteínas (estabilizadoras del ADN y enzimáticas).

Los adenovirus constituyen una familia de virus de ADN (familia *Adenoviridae*) que infectan al hombre y a un amplio rango de especies animales. Los 47 serotipos de adenovirus humanos se clasifican

en siete subgéneros (A-F), en función de sus características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas.

Las infecciones por adenovirus humanos son omnipresentes. La infección primaria por un adenovirus ocurre en los primeros años de la vida, y en la primera década la mayor parte de la población ha experimentado infección. El periodo de incubación oscila entre 2 y 24 días, dependiendo de la localización de la infección viral. El síndrome clínico más frecuente producido por adenovirus es la infección respiratoria (la mitad de las infecciones producidas por adenovirus no ocasionan enfermedad clínicamente evidente, y alrededor del 10% de todas las enfermedades respiratorias en niños son producidas por adenovirus; producen tos, fiebre, angina y rinorrea, síntomas que duran 3-5 días). También producen fiebre faringoconjuntival (conjuntivitis, faringitis, adenitis cervical y fiebre), queratoconjuntivitis epidémica, y cistitis hemorrágica. En cuanto a la diarrea infantil, los adenovirus, junto a los rotavirus, son los patógenos más frecuentes de esta enfermedad. Se observan en grandes cantidades en las heces pero no son cultivables, por lo que han sido llamados *adenovirus entéricos* (tipos 40 y 41). La diarrea es acuosa, se asocia con fiebre y puede durar 1 a 2 semanas. Otro síndrome intestinal en niños es la intususcepción, que se acompaña de forma precedente o simultánea de una infección del tracto respiratorio (los serotipos predominantes son 1, 2, 3 y 5, y raramente producen un aumento de anticuerpos específicos de tipo).

El aumento de anticuerpos comienza aproximadamente una semana después de la infección. Los anticuerpos neutralizantes pueden persistir durante una década o más con títulos relativamente elevados.

También se puede producir transformación oncogénica. Se ha descrito un cierto potencial oncogénico demostrado en animales, cuando en la interacción virus-célula, el ADN se integra y se replica con el ADN de la célula, pero no se producen viriones infecciosos.

Los diferentes serotipos se han dividido en tres grupos en función de su capacidad oncogénica observada en animales de experimentación:

· *Altamente oncogénicos*: subgénero A, producen tumores en la mayoría de animales infectados en un plazo de 4 meses.

· *Débilmente oncogénicos*: subgénero B, producen tumores en algunos animales en un plazo de 4-18 meses.

· *No oncogénicos*: subgéneros C, D, E y F.

Los adenovirus pueden cultivarse a partir de la faringe, esputo, heces, raspados conjuntivales y orina, según los síndromes correspondientes. Son estables a pH 3, resistentes a los enzimas intestinales y capaces de replicarse en las células del epitelio intestinal. Puesto que no poseen cubierta externa no son inactivados por éter o cloroformo, pero sí por el cloro aunque no se sabe si son más o menos resistentes que

los enterovirus. Son más resistentes a la acción de la luz ultravioleta que los enterovirus, y en aguas residuales inoculadas con adenovirus (serotipos 40 y 41) se han detectado virus después de 60 días a 15° C y 4° C, más de lo que resisten los enterovirus.

El mecanismo de transmisión es fecal-oral para los serotipos 40 y 41, ya que son eliminados en gran número con las heces. Otros serotipos son transmitidos a través de los aerosoles de gotículas del tracto respiratorio, o mecánicamente en la conjuntiva de los ojos. El agua de las piscinas con inadecuada cloración se ha descrito como mecanismo de transmisión de los serotipos 3 y 7, produciendo infecciones oculares.

Las infecciones respiratorias por adenovirus son muy frecuentes, y las diarreas causadas por los serotipos 40 y 41 en niños producen inmunidad frente a estos serotipos que se detectan en más del 50 % a la edad de 4 años.

Los adenovirus no forman placas en los cultivos celulares sólidos, y el efecto citopático es débil en los cultivos líquidos, por lo que el crecimiento debe ser confirmado mediante inmunoelectroforesis o ELISA, lo que hace que sea un método laborioso para ser usado rutinariamente. Generalmente son detectados mediante PCR, con cebadores (primers) de los genes que codifican las proteínas del hexón para todos los tipos en general, y de los genes de las fibras para los serotipos 40 y 41. La utilización del cultivo celular seguido de PCR constituye un método alternativo con objeto de aumentar la sensibilidad. Actualmente se han desarrollado pruebas rápidas que utilizan la inmunocromatografía para la detección cualitativa de adenovirus y rotavirus.

Astrovirus

Pertenecen a la familia *Astroviridae*. Son virus pequeños (28-30 nm), cuyo genoma es RNA de cadena simple positiva, sin envoltura, que muestran una simetría cúbica. Cuando se observan al microscopio electrónico aparecen con bordes romos y redondeados con muchas áreas electrolúcidas triangulares y un centro electrodenso, lo que produce el aspecto de estrella de 5 ó 6 puntas.

La principal técnica para la detección de astrovirus es la microscopía electrónica de muestras de heces de niños de hasta 5 años y en casos esporádicos en brotes en adultos. Esta técnica tiene la ventaja de que revela la presencia de un amplio rango de virus entéricos diferentes morfológicamente y que se encuentran en suficiente cantidad ($>10^6$ viriones/gramo). Sin embargo, su identificación puede resultar dificultosa ya que menos del 15% de las partículas virales muestran la morfología estrellada típica en muestras recientes y se reduce a menos del 5% en muestras no recientes o mal conservadas.

La inmunomicroscopía electrónica en fase sólida ofrece buenos resultados y además permite la diferenciación de serotipos. También se han desarrollado ensayos de EIA de alta sensibilidad, basados en anticuerpos monoclonales, pero no son ampliamente utilizados debido fundamentalmente al alto costo.

La técnica más usada actualmente es la RT-PCR, incluida la detección en muestras ambientales concentradas. Se ha utilizado a veces la formación de placas en cultivos celulares, por ejemplo, en células de carcinoma CaCo-2, o inmunofluorescencia en cultivos de 18-24 horas en esta misma línea celular.

La contaminación ambiental por astrovirus humanos se produce con las heces, siendo mecanismos de transmisión las aguas de consumo no desinfectadas, aguas residuales, fangos, sedimentos y fosas sépticas, según el ciclo de contaminación fecohídrica.

Los astrovirus infectan las células epiteliales de la mucosa del duodeno, y la excreción del virus puede ir acompañada de diarrea, menos intensa que en los rotavirus, y asintomática frecuentemente. También se puede presentar cefalea, malestar general y náuseas, mientras que los vómitos son menos comunes. Cuando se produce diarrea ocurre después de 2-3 días (periodo de incubación), y continúa durante una semana, con concentración de 10^{10} viriones/gramo durante la fase aguda.

Han sido detectados en las heces en el 2-9% de los niños con diarrea. La enfermedad es más frecuente en niños menores de 3 años, aunque también los brotes han sido descritos en adultos sanos y en ancianos. Se piensa que la respuesta inmunitaria en la infancia protege durante la edad adulta.

Los astrovirus son transmitidos de persona a persona por el mecanismo fecal-oral. Este tipo de contagio ocurre en ambientes cerrados (guarderías, escuelas, familia, cuarteles, residencias de ancianos, centros de día, etc.). Se ha comprobado que el 75% de los niños de entre 3 y 4 años tienen anticuerpos séricos detectables. En países subdesarrollados son el segundo patógeno viral más frecuente en diarreas infantiles, detrás de rotavirus, y más frecuentes que adenovirus.

Alimentos, agua y fómites también han sido indicados como mecanismo de transmisión, aunque no existen evidencias inequívocas de transmisión hídrica, por lo que se puede considerar un riesgo mínimo en las aguas de consumo público. La supervivencia en el agua de grifo no clorada a 4° C y aguas de mar a 20° C muestra una reducción de 2 y 3.6 unidades logarítmicas tras un periodo de 60 días, y de 3.3 y 4.3 respectivamente después de 90 días.

El cloro inactiva los astrovirus. Una concentración de 0.5 mg/L de CRL muestra una reducción logarítmica de 2.5 después de 1 hora de contacto, y si se aumenta la concentración a 1 mg/L la reducción logarítmica es 3. Las características de resistencia son similares a rotavirus y adenovirus.

Enterovirus

Son pequeños (*Picornaviridae*), icosaédricos, 27 nm, sin envuelta, RNA de cadena simple positiva (codifica directamente proteínas).

Son estables a pH 3-10, resistentes a los amonios cuaternarios, etanol al 70% y a muchos detergentes. Al no tener envuelta lipídica son resistentes al éter y cloroformo. Son sensibles al cloro, formaldehído, glutaraldehído y radiación UV.

En el género *Enterovirus* se incluyen las especies humanas de poliovirus, enterovirus humanos A, B, C, D, coxsackievirus y echovirus.

La vacuna Sabin de poliovirus se obtiene por pases de cepas de virus salvaje en células de riñón de mono, lo que produce cepas atenuadas que causan infección asintomática. La atenuación es producida por un pequeño número de mutaciones.

La procedencia de los virus humanos en las aguas residuales serían las heces humanas. Las infecciones por enterovirus pueden causar un amplio espectro de síntomas, pero comúnmente muchas infecciones son asintomáticas. Aproximadamente sólo 1% de los infectados muestran enfermedad clínica. Muchos serotipos, cuando producen síntomas, presentan un cuadro de tipo gripal que incluye fiebre, malestar, síntomas respiratorios, dolor de cabeza y dolor muscular. Ocasionalmente el virus es más neurotrópico y desarrolla una meningitis. La parálisis es una de las principales características de las infecciones sintomáticas de poliovirus y una característica temporal de algunas infecciones por coxsackievirus B. Las infecciones por coxsackievirus A pueden estar asociadas con parálisis de manos, piés y boca; coxsackievirus B con pericarditis y miocarditis; echovirus con encefalitis y síndrome de Guillain-Barré (polineuropatía desmielinizante), y enterovirus 70 con conjuntivitis hemorrágica.

Ninguna de las infecciones sintomáticas por enterovirus están asociadas con diarrea y vómitos, salvo como parte de los síntomas de una enfermedad más amplia.

El conducto gastrointestinal y el sistema respiratorio son los principales sitios de multiplicación para los enterovirus con entrada por la boca; la replicación puede ocurrir en el tejido linfoide de la faringe. El periodo de incubación puede ser 2-30 días, generalmente 5-14 días. Los virus son eliminados, en infecciones sintomáticas y asintomáticas a partir de los 7 días después de la infección a través de las heces y las secreciones orales.

Para la detección de enterovirus se utilizan diversos cultivos de células humanas y de mono, en medio líquido y bajo agar. Más recientemente RT-PCR, RT-PCR en tiempo real, y cultivo seguido de RT-PCR son los métodos más utilizados y de mayor sensibilidad. Los enterovirus son detectables durante todo el año, aunque se produce un aumento de aislamientos en verano y otoño.

En muchos países del mundo sólo se aíslan las cepas de la vacuna, debido al Programa de Erradicación de la Polio mielitis de la OMS.

Numerosos virus entéricos humanos están potencialmente presentes en todos los tipos de aguas contaminadas con heces o aguas residuales no tratadas. El tratamiento convencional de aguas residuales disminuye el número de virus presentes, pero en el efluente persisten un cierto número de virus. Se han detectado en aguas residuales brutas y en el efluente después del tratamiento. También en aguas de baño, especialmente aguas de mar. Los sedimentos también contienen enterovirus que son movilizados por el agua de lluvia durante las tormentas. También son detectados ocasionalmente en aguas subterráneas.

Aunque pueden estar presentes en el agua de piscinas, no parece conocerse bien el papel real de la transmisión hídrica, mientras que parece ser más frecuente la transmisión de persona a persona en comunidades más o menos cerradas.

La transmisión de los enterovirus es principalmente de persona a persona por el mecanismo fecal-oral y por gotículas secretadas desde la nasofaringe. La materia fecal contiene grandes cantidades de virus que se incorporan a las aguas residuales.

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*. Es un virus pequeño, esférico, de 27 nm de diámetro y carente de envoltura. Mediante microscopía electrónica se ha visto que posee una estructura de simetría icosaédrica, con 12 pentámeros, y contiene un genoma de una hebra de RNA positivo, es decir, el RNA viral actúa como mensajero.

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. Las proteínas más superficiales VP1 y VP3 son las que presentan una mayor afinidad por los anticuerpos.

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. El VHA no presenta antígenos comunes con otros virus hepatotropos, por lo que no existen reacciones

cruzadas que dificulten el diagnóstico ante un cuadro clínico.

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 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, cloroformo y detergentes no-iónicos. 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.

Los viriones son relativamente resistentes a los desinfectantes comunes. 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, betapropiolactona, 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.

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 poco después del inicio de la enfermedad clínica, los niveles aumentan lentamente y persisten años.

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 vacunas. 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, y se ha secuenciado la totalidad del genoma.

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 éstas, 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. 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 %.

En España, según datos del Boletín Epidemiológico Semanal, en 2001 se notificaron 899 casos de hepatitis A, 620 casos en 2002, 753 casos en 2003, y 796 casos en 2004.

La prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis A, 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.

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

El reservorio es exclusivamente humano. Son los individuos infectados por el virus que excretan partículas virales 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.

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 endemidad, 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.

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:

- 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.

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.

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 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 antígeno VHA en heces disminuyen rápidamente con el inicio de los síntomas. Para su determinación se utilizan

técnicas de ELISA o RIA, pero tienen escasa sensibilidad, que además, en 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.

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.). 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.

4) Técnicas de biología molecular, tales como hibridación y PCR

Virus de la hepatitis E

Virus RNA de cadena sencilla y sentido positivo, de aproximadamente 7.2 kilobases. Es estable a pH ácido (pasa la barrera del estómago), y al no tener envuelta es resistente al éter y cloroformo. El origen de las cepas en el medio ambiente es las aguas residuales humanas.

La hepatitis E tiene una gran importancia clínica en países en desarrollo: Asia, Medio Oriente, y África del Norte; también en Méjico. En ocasiones aparecen casos esporádicos en países industrializados, incluido Estados Unidos. En cada región las cepas tienen sus rasgos genéticos característicos, pero las diferencias no son tan grandes, por lo que se considera hasta ahora un solo serotipo.

Las características clínicas son similares a las de la hepatitis A. El periodo de incubación es de 28-40 días. Aunque se ha conseguido la replicación de VHE en cultivos celulares, ésta no es buena, por lo que no se conocen adecuadamente los mecanismos de multiplicación viral. Después de la replicación intestinal los virus alcanzan el hígado a través de la vena porta y se multiplican en los hepatocitos.

La transmisión de este virus puede ser fecal-oral, pero el agua y los alimentos constituyen el principal mecanismo de transmisión. Casi todas las epidemias de hepatitis E han sido producidas por el agua contaminada, aunque se han descrito brotes transmitidos por alimentos, algunos de ellos debidos al consumo de mariscos crudos o poco cocidos. La transmisión persona-persona de los enfermos a sus contactos es relativamente infrecuente.

En los pacientes, el principal medio de diagnóstico es la determinación de anticuerpos IgM

circulantes en suero, detectables durante 3 meses después del inicio de los síntomas. Los viriones están presentes en las heces durante una semana o más después del inicio de los síntomas. El virus se detecta mediante inmunoelectromicroscopía, inmunofluorescencia, ELISA y Western blot.

Teniendo en cuenta la prevalencia en países desarrollados y en desarrollo, es lógico concluir que una de las bases de la prevención es la mejora de las condiciones de salubridad e higiene pública.

Norovirus y Sapovirus

Ambos se encuentran dentro de la familia *Caliciviridae*. Norovirus es el nombre del género que reemplaza los términos de virus Norwalk, NLV (Norwalk-like virus) y SRSV (small round structured virus). Sapovirus es el nombre del género que reemplaza a virus Sapor, calicivirus clásico, calicivirus humano o SLV (Saporo-like virus). El género incluye los virus Sapor y Manchester.

Estos calicivirus tienen un diámetro de 27-30 nm con un contorno irregular, siendo el genoma RNA de cadena simple. No crecen en cultivos celulares, por lo que se utilizan modelos animales y se conoce poco de los mecanismos de replicación *in vivo*.

No son inactivados a pH 3, 60° C 30 minutos, éter o cloroformo, y sólo son parcialmente inactivados con alcohol al 70%. Sin embargo, son inactivados por el cloro a >10 mg/L, aunque no por 0.5-1.0 mg/L de CRL. Los pocos datos que se tienen parecen indicar que son más resistentes que los enterovirus.

El origen de norovirus y sapovirus en las aguas residuales son las heces humanas.

Diarreas y vómitos son los síntomas predominantes de la infección por norovirus, que pueden ser acompañados por dolor de cabeza y mialgias. Los vómitos están a menudo presentes en más del 50% de los casos en adultos y es una de las características que indican que un brote puede ser debido a norovirus. Rara vez ocurren infecciones asintomáticas, resolviéndose la enfermedad en 2-3 días sin complicaciones.

La infección se produce cuando los virus entran por la boca, atraviesan sin ser afectados la barrera ácida del estómago, y se replican en la mucosa epitelial del intestino delgado, siendo el periodo de incubación de 24 horas. Los virus son expulsados con las heces durante 1 semana, a veces 2 semanas, pero raramente más.

La transmisión de norovirus es principalmente directa de persona a persona por la vía fecal-oral o por ingestión de partículas líquidas del vómito. Los norovirus son la causa más común de gastroenteritis en adultos. El CDC estima que el 50% de todos los brotes alimentarios de gastroenteritis están causados por norovirus. De los 232 brotes de infección por norovirus declarados al CDC entre julio de 1997 a junio de 2000, 57% eran de origen alimentario, 16% mediante transmisión persona a persona, 3%

transmitidos por el agua, y 23% de origen desconocido.

La detección de norovirus humanos en las heces se puede realizar mediante microscopía electrónica, aunque no se detectan a concentraciones inferiores a 10⁶ partículas/mL. Actualmente se realiza también la detección mediante PCR o mediante kits ELISA comercializados.

La transmisión y epidemiología de los sapovirus son peor conocidas. La transmisión directa persona a persona es asumida como la más común.

Los norovirus han sido recientemente identificados en ambientes acuáticos, tales como aguas residuales, efluentes, ríos, aguas de mar, e incluso aguas subterráneas, siendo efectivos los mismos procedimientos de concentración que los utilizados para enterovirus. Bivalvos tales como almejas, mejillones y ostras constituyen el más importante mecanismo de transmisión. Se han descrito numerosos brotes transmitidos mediante el agua de consumo en los que se han visto afectadas muchas de las personas de la población suministrada. También se han descrito brotes causados por alimentos, cubitos de hielo hechos con agua contaminada, y por aguas de baño.

Rotavirus

Se han establecido 6 serogrupos, denominados A-F, no existiendo reacciones cruzadas entre los antígenos capsulares VP6. El grupo A es la más común infección por rotavirus humano.

Los rotavirus tienen 75 nm de diámetro y estructura icosaédrica con triple capa de proteína. El genoma está constituido por 10-12 segmentos de RNA de doble cadena. Al microscopio electrónico tienen apariencia de rueda, por lo que se denominan rotavirus.

La infectividad desaparece cuando la cápsula es alterada por la acción de agentes quelantes tales como el EDTA. Son resistentes al éter y cloroformo, son estables a pH 3-9. Los virus son inactivados por fenol, formalina, cloro y etanol.

Se ha estimado que en los países en vías de desarrollo más del 10% de las infecciones por rotavirus son graves, produciendo una mortalidad superior al 0.6 % de los casos. La diarrea es el síntoma predominante en la infección por rotavirus. En los países desarrollados, en los niños menores de 5 años ingresados en el hospital con gastroenteritis, rotavirus es el patógeno más comúnmente aislado, y los estudios inmunitarios indican que a los 3 años el 90% de los niños han tenido una infección por rotavirus. El origen de los virus humanos en las aguas residuales son las heces. La diarrea es el principal síntoma de la primoinfección. El periodo de incubación y el comienzo de la eliminación de partículas virales en las heces ocurre a las 48 horas. Se ha sugerido la transmisión respiratoria pero no existen evidencias de esta teoría.

Además del diagnóstico mediante microscopía electrónica, un ELISA está disponible desde hace años y es ampliamente utilizado para el diagnóstico. Los rotavirus sólo crecen en ciertos tipos de cultivos celulares y no es un método apropiado para el diagnóstico. También se utiliza la técnica de PCR.

Actualmente se encuentra comercializado un test basado en la inmuno-cromatografía para la doble detección cualitativa de rotavirus y adenovirus en heces. El cultivo de rotavirus y adenovirus es difícil, lo que explica la utilización preferencial de las técnicas inmunológicas.

Se ha descrito la presencia de rotavirus en aguas residuales, agua de río, efluentes, sedimentos y bivalvos. Sin embargo, la concentración y detección no se puede realizar adecuadamente por métodos convencionales de filtración en membrana, inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS TRANSMITIDOS POR EL AGUA

La detección de virus es más compleja que la de otros microorganismos por las dificultades que entraña la concentración y detección, ya sea mediante cultivo o técnicas de biología molecular.

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.

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

En las aguas residuales la cantidad de virus presentes puede ser suficiente para permitir la detección sin concentración previa. Sin embargo, en la mayoría de las aguas se encuentran demasiado diluidos como para poder realizar un análisis directo, por lo que se llegan a concentrar hasta 1000 L de agua. Las aguas subterráneas y las de consumo contienen muy pocos virus, por lo que sería necesario procesar 100 L de agua o más, mientras que para las aguas de baño y de mar pueden contener muchos más virus, por lo que serían suficientes 10 L.

Por lo tanto, la detección de virus se realizaría en dos etapas:

- 1) Concentración de los virus en un pequeño volumen.
- 2) Detección de los virus en el concentrado.

El concentrado puede ser inoculado en cultivos celulares para detectar las partículas virales infecciosas, y si se hace de forma cuantitativa se puede hacer el recuento que será expresado como

unidades formadoras de placas (ufp), dosis infecciosa para el cultivo de tejido (DICT₅₀), o número más probable de unidades (NMP).

La DICT₅₀ expresa el logaritmo de la dilución de virus que produce efecto citopático en el 50% de los cultivos. Se ha calculado estadísticamente que $1 \text{ DICT}_{50} = 0,69 \text{ ufp}$.

MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN

Los virus actúan como partículas coloidales. Presentan polaridad y pueden ser adsorbidos a una gran cantidad de matrices cargadas (membranas, vidrio, resinas, etc.), por lo que pueden ser concentrados de esta forma. Por otra parte, consideradas como proteínas, las partículas virales tienen una masa molecular relativamente alta ($>10^6$), así que pueden ser sometidos a ultracentrifugación y ultrafiltración.

Basándose en estas propiedades se han desarrollado numerosos métodos para la concentración de virus. Un método óptimo de concentración debería cumplir los siguientes criterios:

- Técnicamente sencillo y breve.
- Tasa de recogida alta
- Amplia variedad de virus retenidos
- Volumen del concentrado pequeño
- Económico
- Capaz de procesar grandes volúmenes de agua
- Reproducibilidad

Existen técnicas que se acercan a estos requerimientos, basadas en diferentes propiedades de las partículas virales, con numerosas variaciones y a veces con dos técnicas diferentes de concentración en dos etapas.

Adsorción – elución

Los virus contenidos en la muestra se ponen en contacto con una matriz en la que serán adsorbidos en unas condiciones específicas de pH y fuerza iónica. Una vez adsorbidos, se descarta el agua en la que estaban suspendidos originariamente, y a continuación son eluidos de la matriz en un pequeño volumen.

La elección de la matriz adsorbente, líquido eluyente y condiciones del proceso dependerán de la naturaleza de la muestra y de la experiencia, pero es muy frecuente utilizar soluciones que contienen extracto de carne o leche desnatada a pH elevado, que desplazan los virus de la matriz. También se usan soluciones de glicina/NaOH.

A veces la concentración alcanzada no es suficiente para su inoculación, en cuyo caso se requiere una concentración secundaria. Se puede hacer mediante coagulación-floculación, en la que el virus es adsorbido a los flóculos, que se obtienen mediante centrifugación y se disuelven en 5-10 mL de buffer fosfato neutro.

Otros protocolos utilizan la filtración a través de membranas cargadas positivamente y a continuación, una ultrafiltración o una elución con solución de extracto de carne y precipitación con polietilenglicol.

a) *Adsorción a membranas electronegativas*

La concentración de virus en aguas utilizando filtros de microporos cargados negativamente (p. ej. Millipore, Sartorius), es utilizada desde hace tiempo. Las membranas, hechas de acetato o nitrato de celulosa, están disponibles en varios tamaños de poro, configuraciones y composición, de forma que combinando acertadamente prefiltros y filtros adsorbentes es posible obtener buenos rendimientos con flujos altos y mínima obturación de los filtros, incluso en aguas con turbidez, y con la ventaja adicional de que muchos virus unidos a partículas sólidas, son también retenidos. Los virus se unen al filtro mediante fuerzas atractivas electrostáticas opuestas y no por quedar atrapados en el filtro, por lo que se utilizan diámetros de poro de 0.45, 1.2 ó 5 μm . En las aguas que contienen material particulado se usa un prefiltro para evitar la obturación del filtro. Los virus son eluidos utilizando una solución de extracto de carne o leche desnatada.

Puesto que los virus y los filtros están cargados negativamente a pH neutro, la muestra de agua debe ser acondicionada para que pueda ocurrir la unión electrostática, por lo que se ajusta a pH 3.5 y se añade ión Al^{3+} en forma de AlCl_3 hasta una concentración final de 5×10^{-4} M.

También se utilizan filtros de carga negativa en forma de tubo, pero se obturan más fácilmente y no pueden ser usados con buenos flujos.

b) *Adsorción a membranas electropositivas*

Estas membranas adsorben los virus del agua, sin necesidad de acondicionamiento previo de las muestras, a pH 3-6. Con valores de pH por encima de 7 decae rápidamente la adsorción, por lo que es necesario controlar cuidadosamente el pH.

Además de la ventaja de no tener que acondicionar la muestra, tienen la ventaja de que se pueden utilizar para concentrar virus tales como rotavirus, poliovirus y colifagos, que son sensibles a las condiciones de bajo pH requeridas en la adsorción a membranas electronegativas.

Los rendimientos de los filtros electropositivos son similares a los electronegativos.

c) *Adsorción en lana de vidrio*

Se utiliza en columnas rellenas de este material, uniformemente empaquetadas a densidad adecuada (0.5 g/cm^3), resultando una alternativa económica frente a los filtros, siendo similar la eficacia de adsorción de enterovirus. Una ventaja de este método es que los virus se adsorben a pH cercano a la neutralidad, por lo que no se verían afectados los que son sensibles a pH ácido, ni se requiere la adición de cationes; la elución se hace a pH alcalino.

d) *Adsorción en polvo de vidrio*

Vidrio de borosilicato en polvo, con tamaño de partícula de 100-200 μm , es un buen adsorbente de virus en condiciones similares a las fibras de vidrio. El polvo de vidrio forma un lecho fluidificado, lo que ofrece la ventaja de una menor capacidad de oclusión. Para volúmenes menores de 100 L el volumen de elución es pequeño, por lo que no se necesita una concentración secundaria. Sin embargo, la recuperación de partículas virales es variable en función del tipo de muestra, desde 60% en muestras de agua potable, hasta 20% en residuales urbanas.

Ultrafiltración

Las muestras de agua se hacen pasar a través de filtros con tamaño de poro menor que los virus, por lo que son retenidos.

Actualmente se utilizan membranas con un tamaño de poro que permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular, pero excluye virus y macromoléculas que se concentran en la membrana. Muchos laboratorios utilizan ahora membranas o cartuchos de filtración con un tamaño de exclusión de 30-100 kDa.

En estos sistemas en que el agua pasa directamente a través del filtro, los componentes no filtrables ocluyen la superficie del filtro, por lo que sólo son útiles para pequeños volúmenes de muestra (< 1000 mL), por lo que se han desarrollado modificaciones tales como la filtración con flujo tangencial o la ultrafiltración-vortex.

Las ventajas de la ultrafiltración son que la muestra no requiere preacondicionamiento, y por lo tanto, una amplia variedad de virus pueden ser concentrados, incluidos los bacteriófagos.

En aguas superficiales con turbidez el proceso puede durar mucho tiempo (40-72 horas para la filtración de 50 L).

Ultracentrifugación

Es un método poco selectivo, capaz de concentrar todos los virus aplicando suficiente fuerza de gravedad y tiempo. Sin embargo, el volumen que puede ser procesado es relativamente pequeño, por lo que su utilización para la concentración directa de virus en aguas naturales está limitada. Sin embargo, es útil como método de concentración secundaria.

Otros métodos de concentración

Hidroextracción: separación de los virus del agua utilizando un sólido higroscópico, de los que habitualmente se utilizan polietilenglicol (polímero de rango 6000-20000) o sacarosa. La muestra se introduce en una bolsa de membrana de diálisis (peso molar de corte, 12000), y se sumerge en el sólido

durante varias horas a 4° C, reduciéndose el volumen. Su uso está limitado por el volumen de muestra.

Floculación: los virus son adsorbidos a los flóculos formados con sales de hierro o aluminio, separados por centrifugación y suspendidos en un pequeño volumen de extracto de carne. La adsorción-precipitación con hidróxido de aluminio es uno de los métodos más fáciles de realizar. 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 $Al(OH)_3$ y se recogen las partículas que los contienen mediante centrifugación.

Adsorción a talco-celita: el talco (silicato magnésico) mezclado con celita (tierra de diatomeas) forma una buena mezcla adsorbente.

Adsorción a carbón activo: generalmente en forma granular como concentración primaria.

Separación con dos fases: los virus y macromoléculas pueden ser concentrados entre las dos fases inmiscibles que se producen cuando dos polímeros orgánicos diferentes son disueltos en agua. Se ha utilizado una mezcla de sulfato de dextrano y polietilenglicol 6000. Este método está limitado por la posible toxicidad de los polímeros para los cultivos celulares, y por el volumen de muestra (alrededor de 10 L como máximo).

Columnas de inmunoafinidad y separación inmunomagnética: son técnicas de captura ya que las partículas virales se unen específicamente a anticuerpos fijados en el relleno de la columna o en partículas coloidales magnéticas.

Concentración mediante desecación por vacío.

DETECCIÓN Y RECUENTO

Después del muestreo y la concentración de virus, el tercer aspecto importante a considerar es la detección y recuento de virus. En términos generales, los métodos se pueden clasificar de la siguiente forma:

a) *Métodos basados en la infectividad*

Se pueden inocular animales de experimentación, aunque es una técnica costosa y lenta, por lo que sólo se utiliza en casos en que se hace absolutamente imprescindible.

Se inoculan cultivos celulares observándose el efecto citopático. Generalmente se utilizan líneas celulares, especialmente BGM, HEp-2, HeLa y VERO. Existen dos formas de recuento de partículas infectivas:

- Ensayos de formación de *placas de lisis*: la movilidad de las células y los virus se reduce mediante la adición de agar al cultivo celular, de forma que las partículas virales

infectan y destruyen a las células contiguas, produciendo una zona de lisis (placa). El recuento corresponde al número de placas observadas tras la incubación durante varios días (p. ej. 3 días en el caso de los enterovirus).

- Ensayos con *cultivos líquidos*: las muestras concentradas se añaden en diversas porciones de cultivos celulares en medio de cultivo líquido y se determina el NMPUC (número más probable de unidades citopáticas) o el TCID₅₀ (dosis infectiva para el 50% de los cultivos de tejido).

El aislamiento de un tipo específico de virus se realiza picando una placa de lisis e inoculando un medio de cultivo nuevo.

La identificación se puede hacer mediante el test de neutralización, en el que se mezclan alícuotas de suspensiones virales con diferentes antiseros específicos, y cada una de éstas se inocula en un cultivo nuevo. También se utilizan técnicas de inmunofluorescencia y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay).

b) *Métodos no basados en la infectividad*

Se utilizan generalmente técnicas de biología molecular: hibridación, ensayo inmunoenzimático y PCR.

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 desnaturizarse 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 desnaturizada 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.

La mayoría de los protocolos para realizar una reacción de hibridación emplean un isótopo radiactivo para marcar la sonda, generalmente el ³²P y más raramente ³⁵S 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 poli(acrilamida) 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.

Las técnicas de hibridación, por su menor sensibilidad, han sido desplazadas por nuevas técnicas como PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real.

El paso previo a la amplificación, requiere la extracción del ácido nucleico del virus.

Esta técnica permite aplicar las ventajas de la tecnología de PCR a la detección de RNA, para lo cual, en el caso de los virus RNA, 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 éste se utiliza como base para una posterior PCR. El ARN 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. Una fuente importante de RNAsas es el sudor de las manos, por lo que el uso de guantes es imprescindible para trabajar con RNA. Por este motivo el material de laboratorio debe ser tratado con dietilpírocarbonato, 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. 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. 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.

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*, cebadores 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 termo estable que promueve la síntesis de DNA. Esta enzima fue aislada del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*, microorganismo que es capaz de

crecer 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' hacia 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 constituye 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.

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.

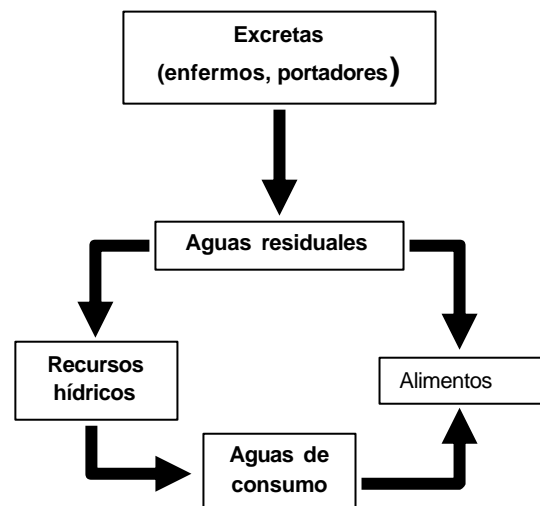
El revelado del producto amplificado es el paso final del método y puede realizarse de diversas maneras. El camino más fácil es visualizar el DNA después de la electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida mediante el revelado con bromuro de etidio, procedimiento que requiere la existencia de, 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*, y PCR en tiempo real.

En la *nested-PCR* y *seminested-PCR* 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. 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.

Una modificación de esta técnica es la *seminested-PCR* que utiliza un primer nuevo, para amplificar una secuencia interna del producto de PCR.

La PCR en tiempo real difiere en que mediante fluorescencia se va determinando en tiempo real la cantidad de ADN amplificado, por lo que es una medida cinética que, comparando con una curva patrón, nos permite cuantificar la cantidad inicial de



Ciclo de contaminación fecohídrica.

ADN presente en la muestra, es decir, es una técnica cuantitativa.

La limitación de la PCR es que detecta ADN viral, pero no nos indica la presencia de partículas virales infectivas.

DETECCIÓN INDIRECTA: INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

El agua se contamina con excrementos humanos o animales y 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*.

El agua debe reunir unas determinadas características de calidad para que no comporte ries-

gos 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, o la investigación directa de microorganismos patógenos. 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.

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

- Indicadores de contaminación fecal: Microbiológicos y 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.

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, incluso especialmente complejas en el caso de los virus de transmisión hídrica, 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 varios:

- Los indicadores deberán estar presentes siempre que lo estén los patógenos, y ausentes en aguas no contaminadas.
- Deben encontrarse en número mucho mayor y presentar un mayor grado de resistencia que los patógenos.
- 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.

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.

TABLA 1. Densidad/gramo de coliformes y estreptococos fecales en las heces de animales y hombre

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

Otro aspecto interesante es la capacidad de supervivencia. Las esporas de *Clostridium perfringens* presentan mayor resistencia a diversos procesos físico-químicos y condiciones ambientales que otros indicadores bacteriológicos fecales. *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.

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. 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. Esta razón ha determinado el empleo de microorganismos más resistentes, incluyéndose como indicadores los colifagos y clostridios sulfito-reductores.

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.

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.

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. 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.

También se utilizan indicadores víricos. La mayoría de los virus transmitidos por vía hídrica son excepcionalmente resistentes a la inactivación natural, a los procesos de tratamiento del agua y desinfección que eliminan o inactivan los patógenos más sensibles y los indicadores bacterianos, por lo que son más persistentes en el medio. Estos virus se excretan por periodos de tiempo cortos en cantidades que pueden llegar a 10^{12} por gramo de heces.

Se han estudiado varios grupos de bacteriófagos de bacterias entéricas (colifagos somáticos, colifagos F-específicos, fagos de *Bacteroides fragilis*) y de virus de origen humano (enterovirus y adenovirus humanos). Todos ellos presentan buenas posibilidades pero también inconvenientes para realizar su función como indicador.

Los colifagos somáticos son aquellos que se adsorben sobre los receptores situados en la pared bacteriana de cepas de *E. coli*. Constituyen un grupo de morfología heterogénea, que están presentes en las heces humanas y en la mayoría de las especies animales en concentraciones de $<10^4$ UFC/g. Son los más abundantes en aguas residuales donde se han encontrado valores de 10^5 UFC/ml. Excepcionalmente los colifagos somáticos pueden multiplicarse en aguas no contaminadas utilizando como huésped especies bacterianas. Desde el punto de vista metodológico son los más fáciles de detectar y enumerar. Su persistencia en el medio es similar a la de los virus humanos, aunque son más sensibles a procesos de tratamiento de aguas.

Los colifagos F-específicos se adsorben específicamente sobre los pelos sexuales codificados por plásmidos del grupo F de incompatibilidad de la cepa huésped. Son poco frecuentes en las heces

humanas y animales, aunque las concentraciones en aguas residuales pueden llegar a 10^5 UFC/ml, lo que sugiere la posibilidad de que se multipliquen en ambientes que reciben un aporte directo de material fecal. Su persistencia en el medio y su resistencia a procesos de desinfección son comparables con las de los enterovirus y reovirus.

Los fagos de *Bacteroides fragilis* se excretan en concentraciones de hasta 100 UFC/g en el 10% de la población, aunque se encuentran en bajas concentraciones en las aguas residuales ($<10^3$ UFC/ml). No se multiplican en el medio debido a la baja estabilidad de la bacteria huésped y a sus características anaerobias. Su resistencia a diferentes tratamientos y a la inactivación natural es superior a la de los otros grupos de bacteriófagos, similar a la de poliovirus, e inferior que el virus de la hepatitis A, por lo que se han evaluado como un índice de contaminación fecal.

El recuento de enterovirus infecciosos sobre líneas celulares ha sido un parámetro de control considerado durante mucho tiempo, aún con las dificultades de trabajo que esta metodología implica. Los enterovirus no son excretados de forma regular por la población, y en ausencia de brotes la mayoría de los enterovirus presentes en el ambiente eran poliovirus de origen vacunal. En la actualidad, en los países desarrollados la vacuna oral contra la poliomielitis se administra a edades muy tempranas. Los virus que se multiplican en el intestino se excretan en las heces y se eliminan en los pañales que son tratados como residuos sólidos, lo que limita la difusión al medio acuático. Las dosis vacunales posteriores producen una baja tasa de multiplicación en el intestino. Por este motivo en los países desarrollados ha ido disminuyendo la prevalencia de poliovirus vacunales en el medio.

Los adenovirus humanos se excretan en grandes cantidades a través de las heces y orina de individuos infectados, a veces sin que presenten síntomas de enfermedad. Muchos serotipos son difíciles de cultivar sobre líneas celulares, por lo que durante mucho tiempo pueden haber estado infravalorados en muestras ambientales. El desarrollo de técnicas de detección molecular han permitido documentar una mayor prevalencia de adenovirus humanos en aguas residuales, naturales y moluscos bivalvos, en comparación con los enterovirus, aunque se requieren más estudios para dilucidar la posible utilidad del test de detección molecular de adenovirus como modelo.

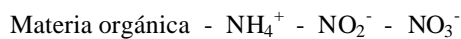
INDICADORES QUÍMICOS INDIRECTOS DE CONTAMINACIÓN FECAL

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.

Los indicadores químicos de contaminación fecal considerados de valor actualmente son: Materia orgánica, cloruros, nitratos, nitritos y amonio.

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, oxidándose de acuerdo con la siguiente secuencia:



El amonio, al producirse en el primer paso de la mineralización, constituye probablemente el mejor indicador químico indirecto de contaminación fecal en las aguas, junto a la materia orgánica. 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 su valor como indicador.

SUPERVIVENCIA Y ELIMINACIÓN DE LOS VIRUS EN EL AGUA: DESINFECCIÓN

El término *supervivencia* en este contexto mide la capacidad de una unidad de virus de permanecer infecciosa en el agua durante un tiempo determinado.

Puesto que los virus son parásitos intracelulares obligados, incapaces de multiplicarse fuera del huésped, el número de partículas infecciosas sólo decae en el medio ambiente. Sin embargo, los virus entéricos son resistentes y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales.

Se tienen escasos datos sobre las características de supervivencia de diversos tipos de virus. Son protegidos por la materia orgánica fecal, y destruidos por desecación, radiación UV, calor por encima de 56° C, digestión por microorganismos y depredación. En el suelo a baja temperatura y en los sedimentos de los ambientes acuáticos tienen una gran supervivencia, pudiendo ser detectados durante meses o años.

Las aguas residuales contienen los virus entéricos humanos que circulan en la población. Durante el tratamiento de aguas residuales, el material sólido que contienen pasa a la forma de fango y, cuando las partículas virales se agrupan y se unen a los restos orgánicos, los viriones se encuentran en los fangos con mayor probabilidad. El tratamiento secundario de aguas residuales mediante fangos activados puede llegar a reducir el número de

partículas virales en un 90 %, como consecuencia de la depredación microbiológica, además de que la descarga del efluente en aguas continentales o marinas reduciría el número de virus por la actividad microbiana, acción de la luz y dispersión.

Los procesos de tratamiento para reducir el número de microorganismos en los fangos reduce el número de partículas infecciosas presentes. Sin embargo, se ha observado que los enterovirus pueden sobrevivir más de 38 días en fangos con aireación a 5° C y pH 6-8. Durante la digestión anaerobia mesofílica de los fangos, que se realiza durante un mes aproximadamente a 42° C, las partículas virales pueden ser degradadas o consumidas por otros microorganismos. Con la digestión anaerobia o el compostaje, y el secado de los fangos se podría conseguir llegar a la eliminación de todas las partículas virales infecciosas. Entre los virus entéricos, el VHA y los enterovirus han sido los más ampliamente estudiados con respecto a su supervivencia.

Los virus son generalmente menos numerosos que las bacterias en las aguas residuales. Mientras que las heces pueden contener 10^6 - 10^7 coliformes/gramo, los virus sólo pueden estar presentes ocasionalmente. Las aguas residuales crudas (influyente) contienen aproximadamente 10^8 coliformes/100 mL y 10^3 - 10^4 ufp/L de enterovirus.

Los estudios realizados para determinar la resistencia de los virus parecen llevar al consenso general de que los virus presentan una mayor supervivencia que las bacterias, incluso se han realizado estudios de campo en los que se ha comprobado que los enterovirus son más resistentes que los coliformes e igual de resistentes que los enterococos.

Se han realizado estudios en aguas residuales comparando la supervivencia de distintos tipos de virus. Después de 90 días a 10° C, poliovirus y VHA se reducen 1-2 \log_{10} y el título de fagos F⁺ permanece inalterado.

También se han realizado estudios en agua de mar. A 25° C, los fagos F son inactivados más rápidamente que poliovirus, VHA y rotavirus. Se ha observado que después de 60 días, se produce una reducción de 2 unidades \log_{10} en el título de astrovirus infecciosos a 4° C y de 3.2 unidades \log_{10} a 20° C. En aguas de mar y diferentes condiciones ambientales, el orden de supervivencia (de mayor a menor) en condiciones de iluminación solar era *Cryptosporidium*, poliovirus, *Giardia* y *S. typhimurium*, aunque poliovirus sobrevive peor en la oscuridad.

La adsorción de virus a los sedimentos debe ser considerada también al considerar la supervivencia. También la turbidez influye en la supervivencia: atenúa la penetración de la luz, y el material que produce la turbidez puede alterar marcadamente la supervivencia (los virus pueden ser adsorbidos a algunos materiales tales como las arcillas).

Ya se han señalado anteriormente algunos datos sobre la supervivencia de los virus que se pueden encontrar en el agua. En general se puede decir que la cinética de inactivación de los virus es de primer orden.

En el espectro de actividad de los desinfectantes interviene el tipo de estructura viral, ya sean virus con cubierta o virus desnudos.

La concentración mínima viricida (en 10 minutos) de hipoclorito sódico es de 200 mg/L para polio I, coxsackie B y adenovirus 2; y de yodóforos (expresados como I₂) de 150 mg/L. Una distribución de microorganismos en función de la resistencia a desinfectantes (de menor a mayor resistencia), puede ser la siguiente:

1. Bacilos gramnegativos, algunos cocos grampositivos, retrovirus (HIV), paramyxovirus, herpes, otros virus con envuelta, algunos hongos filamentosos.
2. Algunos bacilos gramnegativos, *Staphylococcus aureus*, algunas levaduras y algas.
3. Adenovirus.
4. Rotavirus, reovirus, *Mycobacterium tuberculosis*.
5. Picornavirus (polio), parvovirus, hepatitis A.
6. Endosporas de bacterias (*Bacillus*, *Clostridium*).
7. Priones, virus lentos.

En la práctica de la desinfección del agua es mucho más adecuado referirnos al producto concentración tiempo, ya que el desinfectante actúa en el agua durante tiempos de contacto largos, al menos 30 minutos en los ensayos de laboratorios y de horas a escala real. Por esta razón las concentraciones efectivas son muy inferiores a las concentraciones mínimas bactericidas en 10 minutos. Así, por ejemplo, el producto C-t para el cloro libre (ClO, pH 6-7) es aproximadamente de 1.7 mg·min/L para poliovirus, y 0.03 mg·min/L para rotavirus. Para el ozono, el producto C-t es 0.15 mg·min/L para poliovirus, y 0.03 mg·min/L para rotavirus.

De estos datos se deduce que, para realizar una adecuada desinfección del agua para consumo, no sólo es necesario adicionar la concentración adecuada de desinfectante, sino que también es muy importante que el tiempo de contacto durante el cual está actuando sea suficiente para que se produzca la desinfección antes de que el agua llegue al consumidor.

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.
- American Liver Foundation, (1997). Datos importantes sobre la Hepatitis A. 1-800-Go Liver (465-4837).
- 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.
- 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.
- 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 emvasadas. 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.
- 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.
- Hoff J.C. y Akin E.W. (1986). Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environ. Health Persp.*, **69**, 7-13.
- 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., Shinsky J.J. y White T.J. (eds.), Academic Press Inc., New York, pp. 21-88.
- 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.
- 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.
- Percival S., Chalmers R., Embrey M., Hunter P., Sellwood J., Wyn-Jones P. (2004): Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Academic Press. London.
- 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.
- 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 Raton, Florida, pp. 83-95.
- Prescott L.M., Harley, J.P. y Klein D. (1999). Microbiología. 4ª edición, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.
- 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.
- 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.
- 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.