

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

Cuantificación de colifagos somáticos (indicadores de contaminación fecal) y detección de virus de Hepatitis A y Enterovirus, en cinco plantas de tratamiento de aguas residuales del Área Metropolitana de Costa Rica.

Keylor Arroyo Gutiérrez B00653

Maylin Ledezma Castro A63124

Tutor:

M.Sc. Luz María Chacón Jiménez

Lectores:

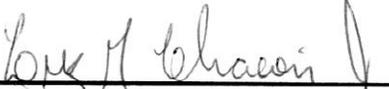
PhD. Gilbert David Loría Masís

Lic. Melisa Solano Barquero

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)
Laboratorio de Virología, Facultad de Microbiología

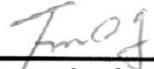
Julio-2015

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:


Dra. Luz María Chacón Jiménez
Tutor


Dr. David Loría Masís
Lector


Dra. Melissa Solano Barquero
Lector


Dra. Florencia Antillón Guerrero
Presidente del Tribunal


Dra. Rosario Achí Araya
Profesor designado

Índice

Lista de abreviaturas.....	4
Lista de cuadros.....	5
Lista de figuras.....	7
Resumen.....	8
Antecedentes.....	10
Manejo de las aguas residuales en Costa Rica.....	10
Colifagos como indicadores de contaminación fecal en agua.....	16
Familia Picornaviridae.....	16
Enterovirus.....	17
Virus de la Hepatitis A.....	18
Impacto de la presencia de virus entéricos en aguas residuales.....	19
Detección de virus en aguas residuales.....	20
Detección viral por Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivo General.....	25
Objetivos Específicos.....	25
Materiales y Métodos.....	26
Recolección de muestras.....	27
Pre tratamiento de la muestra: filtración y concentración.....	27
Recuento de Colifagos Somáticos.....	29
PCR Transcriptasa Reversa.....	30
Reacción en Cadena de la Polimerasa de Enterovirus y Hepatitis A.....	30
Electroforesis.....	32
Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	34
Discusión.....	50
Conclusiones.....	65
Recomendaciones.....	66
Agradecimientos.....	68
Referencias Bibliográficas.....	69

Lista de abreviaturas

PTAR 1 ACh: Planta de Tratamiento de Agua Residuales número uno*.

PTAR 2 M: Planta de Tratamiento de Agua Residuales número dos*.

PTAR 3 RV: Planta de Tratamiento de Agua Residuales número tres*.

PTAR 4 CC: Planta de Tratamiento de Agua Residuales número cuatro*.

PTAR 5 LR: Planta de Tratamiento de Agua Residuales número cinco*.

E: Entrada o afluente de agua a la planta de tratamiento (agua cruda proveniente de los hogares, sin tratar).

S: Salida o efluente de agua de la planta de tratamiento (agua post tratamiento).

*Por confidencialidad no se revelaran los nombres de las plantas de tratamiento de aguas residuales en estudio.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos establecidos por AyA en el Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales.

Cuadro 2. Plantas de tratamiento en estudio ubicadas en el Gran Área Metropolitana.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados en el PCR anidado para la detección de Enterovirus y porcentajes de identificación obtenidos mediante la técnica bioinformática BLAST.

Cuadro 4. Iniciadores utilizados en el PCR para la detección de Hepatitis A, sus valores E y porcentajes de identificación obtenidos mediante la técnica bioinformática BLAST.

Cuadro 5. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de marzo.

Cuadro 6. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de mayo.

Cuadro 7. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de octubre.

Cuadro 8. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de diciembre.

Cuadro 9. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho) calculado para determinar la correlación existente entre el recuento de colifagos con la presencia de Hepatitis A o Enterovirus según afluentes y efluentes de las PTAR en estudio.

Cuadro 10. Análisis de comparación de medias del recuento de colifagos somáticos en las entradas y las salidas de las plantas de tratamiento.

Cuadro 11. Evaluación de la influencia del agua llovida durante el periodo de muestreo, sobre el recuento de fagos de las entradas y salidas de las diferentes PTAR durante el mes de marzo (estación seca) y el mes de octubre (estación lluviosa).

Lista de figuras

Figura 1. Concentración de la cepa vacunal Sabin del virus Polio 1, utilizando PEG 8000 (8% del volumen total).

Figura 2. PCR anidado para la detección de Enterovirus del ensayo control con la cepa vacunal Sabin Polio 1.

Figura 3. Cuantificación de Colifagos Somáticos por el método de capa doble de agar obtenido para la PTAR 1 ACh, el día 07/01/2013.

Figura 4. PCR anidado para la detección de Enterovirus a partir de muestras de PTAR.

Figura 5. PCR para la detección de virus Hepatitis A en muestras de PTAR.

Resumen

Los virus entéricos potencialmente patógenos para el ser humano se pueden transmitir a través del agua, lo cual es un problema que compete tanto a países desarrollados como subdesarrollados. Las aguas residuales o aguas de desecho que muchas veces drenan a los ríos que son utilizados para el riego de cultivos y como aguas de recreación, e incluso, en los lugares más remotos, donde no se cuenta con agua potable, se utilizan como agua de consumo o para labores domésticas. Estas prácticas hacen que el agua residual sea una fuente de contaminación latente que puede generar problemas en la salud pública.

En la actualidad, en Costa Rica no se realizan análisis virológicos en aguas residuales y, por esta razón, es de importancia implementar metodologías en esta área. El Decimonoveno Informe del Estado de la Nación del Desarrollo Humano Sostenible en Costa Rica indica que el saneamiento de aguas residuales ordinarias en plantas centralizadas corresponde a solamente el 3,6% del total generado. La mayoría de aguas residuales se trata bajo el sistema de lodos activados con aireación extendida o anaerobiosis.

Los virus entéricos cobran importancia al considerar las aguas residuales como fuente de infección debido a que resisten por largos periodos en el ambiente manteniendo su infectividad, son resistentes a procesos de tratamiento convencionales y su dosis infectante es bastante baja, en consecuencia se considera relevante su determinación.

En este proyecto se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de enterovirus y virus de la Hepatitis A

presentes en muestras de afluentes y efluentes recolectados en cinco plantas de tratamiento, ubicadas en el gran Área Metropolitana de Costa Rica, para un total de 118 muestras de las cuales 21 fueron positivas para enterovirus y 6 para Hepatitis A.

Además, se evaluó colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal, tanto en las entradas como en las salidas y se observó que no existe diferencia significativa entre ambas ($p > 0,05$) para la prueba estadística "t student", solamente para la PTAR 1 ACh el valor de p fue inferior a 0,05. También se evaluó la influencia de la estacionalidad sobre el recuento de éstos y tampoco se observó diferencia significativa, ya que nuevamente se obtuvo un valor de p ($> 0,05$); por lo tanto no se logró detectar efectos directos en el recuento de colifagos somáticos a consecuencia de la cantidad de lluvia caída.

Por último, se planteó el establecer una posible correlación entre los colifagos somáticos y la presencia de los virus patógenos en estudio, de tal forma se observó según los análisis estadísticos que no existe dicha asociación, dado que el valor de Rho obtenido fue inferior a 0,6.

Antecedentes

Manejo de Aguas Residuales en Costa Rica

Ante la premisa de la posible transmisión de agentes causantes de enfermedades, en particular virus entéricos potencialmente patógenos por medio de aguas residuales, surge la necesidad de estudiar y evaluar las condiciones de algunas de las plantas de tratamiento de nuestro país. Específicamente, al conocer que los efluentes pueden ser reutilizados en actividades que involucran contacto directo e indirecto con los virus, poniendo a la comunidad en una situación vulnerable, lo cual hace que sea un tema de importancia en salud pública que se traduce en un reto para las diferentes entidades encargadas de garantizar el adecuado tratamiento de las aguas residuales (Okoh, 2010).

La implementación de técnicas de tratamiento de aguas residuales, es considerada una práctica relativamente reciente, ya que su uso se remonta a principios del siglo pasado, específicamente a finales de 1800 (Rojas, 2002). La aplicación de estas metodologías surge como consecuencia de la relación anteriormente mencionada entre aguas contaminadas y las enfermedades de origen hídrico (Redondo, 2012).

Se define como *agua residual* aquella que ha sido utilizada y se le han agregado desechos, ya sean excretas humanas o de animales, diferentes compuestos químicos y material sólido suspendido, lo que altera su calidad dando origen a un agua contaminada (Argaw, 2004; Decreto No 33601-MINAE-S, 200).

El agua residual se puede caracterizar de cuatro formas diferentes, entre ellas las pluviales, las infiltraciones, aguas residuales domésticas y las industriales. La primera hace referencia al agua proveniente de las precipitaciones e incluye fertilizantes, plaguicidas, compuestos químicos y biológicos que pueda acarrear. Las infiltraciones son consideradas aguas de carácter desconocido o no controlado. Las aguas residuales domésticas, son las que se originan en los hogares, establecimientos comerciales y las zonas públicas. Las aguas industriales son todas aquellas provenientes de diversos procesos industriales (Ángulo, 2013; Valverde, 2012).

Además, según lo establecido por Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales, las aguas residuales se pueden clasificar en aguas residuales de tipo ordinario, siendo las originadas por las actividades domésticas, y las de tipo especial que abarcan las demás acciones diferentes a las ordinarias (Decreto No 33601-MINAE-S, 2007).

El objetivo principal del tratamiento de las aguas residuales es la “conversión del agua residual proveniente del uso de las aguas de abastecimiento, en un efluente final aceptable a las condiciones del ambiente (estético, organoléptico y de salud pública) y la disposición adecuada de los sólidos (lodos) obtenidos durante el proceso de purificación”; es decir, el someter aguas residuales a un tratamiento que procura la remoción de contaminantes químicos y biológicos, de tal forma que disminuya la posibilidad y el impacto sobre el ecosistema y los seres humanos (Rojas, 2002; Okoh, 2010).

El tratamiento que reciben las aguas residuales en nuestro país consta de varios procesos. Primero se realiza un tratamiento preliminar cuyo objetivo consiste

en retirar la materia flotante de mayor tamaño, así como sólidos gruesos, aceites y grasas empleando para ello rejillas gruesas, medias y finas. Luego se aplica el tratamiento primario donde se emplean sedimentadores para remover una parte de la materia orgánica y los sólidos finos suspendidos, esto se puede realizar mediante procesos físicos o mecánicos como floculación, coagulación, sedimentación o filtración (AyA, 2009). Se ha documentado que este paso en el procedimiento es crucial en la eliminación de partículas virales, alcanzando porcentajes que van desde un 90% hasta un 99% de eliminación (Okoh, 2010).

Posteriormente, se continúa con el tratamiento secundario, etapa en la cual se utilizan sistemas biológicos aerobios o anaerobios para eliminar tanto los sólidos suspendidos como la materia orgánica biodegradable que esté en suspensión o disuelta. Por último, se efectúa el proceso de desinfección usualmente con hipoclorito de sodio a una concentración que oscila entre 5 mg/l y 20 mg/l, aunque ésta puede variar según las características de la planta de tratamiento (AyA, 2009; Marín, 2013).

Entre los sistemas de tratamiento secundarios aerobios más utilizados se destaca los lodos activados, que consiste en un micro-ecosistema compuesto por bacterias formadoras de flóculos específicamente del género *Zoogloea*, así como la presencia de otros géneros como *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Alcaligenes*; también contiene microorganismos filamentosos como *Sphaerotilus*, *Thiothrix*, *Bacillus* y *Beggiatoa*, y algunos protozoarios ciliados y flagelados.

El principio del tratamiento secundario se define por medio de la interacción de los microorganismos con el material orgánico, que al unirse forman flóculos naturales que van sedimentando según su tamaño en el tanque de aeración. Por

último, los lodos precipitados pueden llevar un tratamiento de deshidratación y ser reutilizados por su riqueza micro-orgánica (Comisión Nacional del Agua, 2007).

Existe una tercera parte del proceso, denominada tratamiento terciario que no es empleada por las plantas de tratamiento de nuestro país, en el cual se da la filtración con tamices para remover sólidos residuales suspendidos, y posterior a ello, la desinfección del agua. Para finalizar este procedimiento, se emplea un tratamiento avanzado, con el propósito de eliminar los remanentes de materiales ya sea disueltos o diluidos que han quedado a lo largo del proceso. Esta etapa se lleva a cabo cuando se requiere reutilizar las aguas residuales tratadas (AyA, 2009). Una vez que las aguas residuales son tratadas, deben cumplir con una serie de parámetros (físicos y químicos) y límites establecidos para poder verterlas en cuerpos receptores (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Parámetros y límites establecidos por AyA en el Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales.

Parámetro	Límite máximo
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO _{5,20})	50 mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO)	150 mg/L
Sólidos suspendidos	50 mg/L
Grasas/Aceites	30 mg/L
pH	5 a 9
Temperatura	15°C < T < 40°C
Sólidos sedimentables	1 mL/L
Sustancias activas al azul de metileno	5 mg/L

Fuente: Decreto No 33601-MINAE-S, 2007.

Además de estos requisitos de carácter fisicoquímico, también se establecen parámetros microbiológicos, los cuales dejan de lado los análisis de tipo virológico para los que no se han diseñado técnicas de estudio ni se ha implementado entre los requisitos de eliminación de los efluentes, a pesar del alto riesgo conocido como fuentes de propagación y diseminación de los agentes virales (Decreto No 33601-MINAE-S, 2007; Okoh, 2010).

Por otra parte, el manejo del recurso hídrico en Costa Rica, se ha distribuido entre diferentes organismos, siendo el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), quien tiene a cargo el mantenimiento de la mayor parte. Además, se encuentra la Empresa de Servicios Públicos de Heredia (ESPH), las Asociaciones Administradoras de Acueductos y Alcantarillados Comunales (ASADAS), las municipalidades y algunas organizaciones privadas. Sin embargo, el AyA es la organización que brinda la mayor parte del servicio de tratamiento de las aguas residuales, a pesar de que solo cubrió un 3,6% al año 2007 y se estima que para el año 2015 aumente a un 27%. (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Según lo planteado por el Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica (MIDEPLAN), el sistema de saneamiento de aguas cubre un total del 50% de la población en el Gran Área Metropolitana y un 25% de todo el país. Sin embargo, únicamente un 4% de éstas aguas tienen algún tipo de tratamiento, el 96% restante se disponen en los ríos sin ningún tratamiento, aspecto que puede repercutir de forma negativa en la salud pública, ya que esta disposición eleva el riesgo de propagación y diseminación agentes patógenos a través de estos medios (Mideplan, 2010).

Colifagos como indicadores de contaminación fecal en agua

Para evaluar la calidad microbiológica de los efluentes de las aguas residuales, se utilizan tradicionalmente microorganismos indicadores como *Escherichia coli* o Enterococos, sin embargo, éstos no reflejan el riesgo de la presencia de otros grupos de microorganismos patógenos para el ser humano como virus y protozoarios. La premisa parte de que se desconoce la correlación entre la supervivencia en agua de indicadores bacterianos con la presencia de virus entéricos (Fong & Lipp, 2005; Maunula *et al*, 2007).

En general, los virus entéricos son mucho más estables en el ambiente que los indicadores de contaminación bacteriana utilizados actualmente, ya que se ha visto que los indicadores virales se mantienen viables por largos periodos de tiempo, principalmente aquellos que se encuentran asociados a superficies sólidas. Es por esto que se plantea la posibilidad del análisis cuantitativo de la presencia de bacteriófagos (colifagos), como indicadores alternativos, aunque no se conoce muy bien la existencia de correlación entre su presencia en altas concentraciones con respecto a virus patógenos para el ser humano (Girones, 2006).

Los colifagos son virus que infectan de manera específica la bacteria *Escherichia coli* y han sido ampliamente utilizados como indicadores de contaminación fecal. La base de esta aplicación se debe a que la presencia de un colifago en agua implica un proceso de replicación anterior, el cual debió ocurrir en una célula de *E. coli* que se encontrara dentro de un intestino de un mamífero de sangre caliente; además los fagos presentan un comportamiento semejante a los virus entéricos en aguas residuales (Pillai, 2004).

Familia Picornaviridae

Los virus pertenecientes a la familia Picornaviridae son virus no envueltos con un genoma ARN banda positiva de unos 7,500 nucleótidos, cubierto con una cápside icosaédrica. Este genoma codifica por 4 proteínas estructurales, de VP1 a VP4, y siete proteínas no estructurales que participan en replicación viral. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se localizan en la superficie de la cápside y son las que contienen los epitopos que reconoce el sistema inmunológico (Nasri *et al.*, 2007).

A los virus que integran esta familia se les conoce como virus entéricos, debido a que su principal vía de transmisión es fecal-oral. Estos virus son parásitos obligados del ser humano que infectan y replican en el tracto gastrointestinal de sus hospederos.

Una persona infectada con estos virus excreta aproximadamente 10^5 a 10^{11} partículas virales por gramo de heces, por lo tanto las aguas residuales contaminadas con materia fecal están sometidas a altas concentraciones de virus que mantienen la capacidad de causar enfermedad cuando son ingeridos vía oral (Bosch, 1998; Li *et al.*, 1998).

El tratamiento de aguas residuales por el método de lodos activados solamente elimina cerca del 90% o incluso menos, de los virus presentes en el agua, permitiendo así la salida en el efluente de una carga viral significativa que luego acaba en el medio ambiente contaminado fuentes naturales de agua que ordinariamente son utilizadas como aguas recreacionales e incluso de consumo por ejemplo los ríos (Cloette *et al.*, 1998, Karmakar *et al.*, 2008).

Además, estos virus son resistentes por largos periodos de tiempo en el ambiente, por lo que son capaces de mantener su infectividad, aunque se someten a procedimientos de cloración del agua y se ven expuestos a químicos de tratamiento como desinfectantes, jabón, entre otros. Debido a esto y aunado a su dosis infectante bastante baja, de unas 10 a 100 partículas virales, se consideran un problema de salud pública (Miagostovich *et al.*, 2008; Ikner *et al.*, 2001).

Dentro de los virus entéricos relacionados con agua residuales se encuentran los virus de la Hepatitis A, Hepatitis E, Enterovirus (Coxsackie A, Coxsackie B, Echovirus, Enterovirus y Polio), además de aquellos causantes de cuadros diarreicos como Rotavirus y Norovirus (Haramoto *et al.*, 2004).

Enterovirus

Los enterovirus humanos se clasifican según serotipo en cuatro grandes grupos: 31 serotipos de Echovirus, 23 serotipos de Coxsackie A virus y 6 serotipos de Coxsackie B virus, 3 serotipos de Poliovirus y 4 serotipos de Enterovirus. Estos virus son citopáticos causando destrucción de las células infectadas (Palacios & Oberst, 2005).

Estos virus se transmiten por ingesta oral y por secreciones de vías aéreas, se pueden diseminar por contaminación de alimentos, aguas, manos y utensilios (Romero, 2007). Su patología está mediada por un motivo de Arg-Gly-Asp localizado en las proteínas de cápside de la familia Picornaviridae. El sitio primario de infección son las células epiteliales del tracto respiratorio o gastrointestinal, la replicación en este sitio no genera una patología detectable. De este primer sitio de infección el virus se puede propagar a nódulos linfáticos cervicales y mesentéricos y de aquí pasa a sangre generando una viremia transitoria, la mayoría de

infecciones acaban en este punto generando una sintomatología inespecífica o incluso cursa como un cuadro asintomático. Sin embargo, sin la respuesta inmune del hospedero, el virus podría diseminarse a un sitio secundario de infección como el sistema nervioso central y generar una patología mucho más grave como conjuntivitis hemorrágica, meningitis aséptica, rash, parálisis flácida, miocarditis y/o sepsis neonatal (Williams *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2000; Racaniello, 2006).

A pesar de que a los enterovirus se les consideraba responsables de infecciones esporádicas con diferentes manifestaciones clínicas inespecíficas o asintomáticas, se sabe que algunos de ellos han sido responsables de epidemias como la poliomielitis (Poliovirus), con sintomatología específica y que han generado grandes pérdidas humanas, marcando un papel relevante en la historia de la humanidad (Romero, 2007).

Virus de la Hepatitis A

El virus de Hepatitis A, es un virus ARN que también pertenece a la familia Picornaviridae del cual solo se ha descrito un serotipo. Es un virus pequeño (27 nm de diámetro), desnudo, cuya cápside es resistente a los detergentes y a los ácidos biliares y se mantiene estable incluso en el tracto gastrointestinal. El virus también mantiene su infectividad durante largos períodos en los pozos de aguas residuales y en el agua depurada inadecuadamente (Negroni, 2009).

El virus de la Hepatitis A se adquiere por la ingesta de alimentos o de aguas contaminadas con materia fecal humana. La infección con este virus es generalmente auto limitada y las características clínicas van desde ausencia de síntomas hasta muerte por hepatitis fulminante. El ser humano es el hospedero

natural de este virus, sin embargo, otros primates (entre ellos los chimpancés y los monos tití) son susceptibles a la infección experimental.

En niños menores de 6 años más del 70% son asintomáticos; en niños mayores y adultos, usualmente se presenta fiebre, malestar, anorexia, náuseas, malestar abdominal, orina oscura, con o sin ictericia. El período de incubación varía desde 15 a 50 días y los síntomas usualmente permanecen por menos de 2 meses.

No existe evidencia de enfermedad hepática crónica seguida de la infección. La Hepatitis A es común en muchos países en desarrollo e incluso se han reportado brotes y casos de muerte en países desarrollados. (Cao *et al.*, 2009; Abd *et al.*, 2004).

Impacto de la presencia de virus entéricos en aguas residuales

En la actualidad, un 19% de las muertes por enfermedades infecciosas han sido transmitidas por vía hídrica, lo que equivale a 3,4 millones de muertes por año a nivel global (OMS, 2012). Ante este panorama, se considera la presencia de virus entéricos potencialmente patógenos en aguas residuales como uno de los principales agentes implicados en la transmisión de enfermedades infecciosas, lo cual es corroborado con algunas de sus propiedades, ya que dentro de sus principales características se encuentran la resistencia a procesos de tratamiento comunes en aguas residuales y la estabilidad ambiental, gracias a la resistencia a cambios en la temperatura y el pH, es decir, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos por un largo período (en aguas residuales hasta 120 días), aumentando así la posibilidad de entrar en contacto con el ser humano y con esto

justificar una gran cantidad de brotes en los que no se ha logrado encontrar el agente causal (Connelly *et al.*, 2011; Tree, 2003).

La ingestión de virus entéricos en una dosis infecciosa baja puede llegar a causar enfermedad, que puede ser adquirida al consumir algún tipo de alimento de origen marino cultivado en aguas contaminadas por aguas residuales, al ingerir agua contaminada o al entrar en contacto con ésta en diferentes actividades que pueden ser de tipo recreativo (Ye *et al.*, 2012).

En los últimos años, debido a la creciente escasez de agua, la necesidad de proteger el medio ambiente y aprovechar económicamente las aguas residuales se ha promovido internacionalmente el reúso controlado de efluentes, lo cual conlleva a una mayor exposición con agentes virales infecciosos. Por ello, se presenta la necesidad de reducir considerablemente la carga contaminante que se dispone en los cuerpos receptores superficiales, subterráneos y zonas costeras mediante vías simples, efectivas y de menor costo e incrementar el potencial aprovechable de los recursos hídricos, así como su mejor manejo al liberar grandes cantidades de agua de mejor calidad para otros usos (Veliz, 2009).

Detección de virus en aguas residuales

Para lograr la detección de virus en aguas residuales es necesario aplicar una serie de pasos dentro los que se encuentran la centrifugación, filtración, adsorción y elución. Dichos pasos tienen como finalidad concentrar los virus, ya que estos suelen encontrarse en bajas concentraciones en el agua y limpiar las muestras que suelen contener otras sustancias interferentes para el análisis por método molecular (Karim *et al.*, 2009).

En ambiente natural, los virus se encuentran cargados negativamente lo que permite su adsorción en membranas o filtros con carga positiva, o bien es posible repelerlos al usar filtros cargados negativamente mediante interacciones electroestáticas e hidrofóbicas (Karim *et al.*, 2009).

En el caso de los filtros cargados negativamente, es necesaria la acidificación del agua con o sin la adición de cationes multivalentes. Por su parte, los filtros electropositivos necesitan el acondicionamiento del agua. Para llevar a cabo el proceso de elusión se pueden emplear sustancias como extracto de carne, buffer glicina, entre otros (Karim *et al.*, 2009). Además, es necesaria la acidificación para eliminar iones magnesio y sustancias inhibitorias que podrían afectar la elusión del filtrado (Haramoto *et al.*, 2004).

Detección viral por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa se emplea para realizar una detección rápida, sensible y específica de pequeñas concentraciones virales, por lo que permite estimar en cierta medida el riesgo de salud pública causado por la presencia de virus entéricos en aguas. El uso de iniciadores específicos para cada virus posibilita detectar distintos virus entéricos.

Dentro de las desventajas del uso de técnicas moleculares para detección viral es que no permite determinar si la partícula es infectante o no por lo que un resultado positivo o negativo por esta técnica solamente determina la presencia o ausencia de los virus en cuestión. Además, esta técnica de detección puede verse afectada por sustancias interferentes presentes en la matriz de la muestra, por esto,

para disminuir la posibilidad de error esta técnica utiliza bajos volúmenes de muestra, de 10 a 100 μ L (Miagostovich *et al.*, 2008).

Para detectar virus cuyo material genético es el ácido ribonucleico (ARN) es necesario una retrotranscripción del ARN a una banda de ADN copia antes de realizar la amplificación, para esto es necesario emplear una reacción previa con una transcriptasa reversa. La región 5' no codificante del genoma de los enterovirus es usado para su detección, el amplicón generado tras la amplificación puede ser analizado por electroforesis en gel de agarosa, aunque se pueden utilizar otros métodos de detección como la secuenciación (Rodríguez *et al.*, 2009).

Justificación

Este trabajo pretende llenar un vacío de información y contribuir a la implementación de técnicas para la detección de virus entéricos potencialmente patógenos y para la cuantificación de colifagos indicadores de contaminación fecal, lo cual es un tema del cual no se tiene experiencia en nuestro país.

Con ello se pretende establecer una plataforma que permita el análisis de aguas residuales no únicamente en las plantas de tratamiento en estudio, sino en cualquier planta a nivel nacional perteneciente tanto al sector público como privado, para tomar medidas preventivas a nivel de salud pública, y evitar así posibles brotes que puedan estar asociados de forma directa o indirecta con los efluentes de las PTAR.

Hipótesis

Cinco plantas de tratamiento de aguas residuales del Gran Área Metropolitana, no son capaces de eliminar colifagos somáticos (indicadores de contaminación fecal) ni virus entéricos potencialmente patógenos, como enterovirus y Hepatitis A.

Objetivo General

Detectar virus de familia Picornaviridae, género Enterovirus y Hepatitis A; y cuantificar la concentración de colifagos somáticos indicadores de contaminación fecal, en aguas residuales entrantes y salientes de cinco plantas de tratamiento ubicadas en el Gran Área Metropolitana de Costa Rica, durante el 2013, para evaluar su efectividad en la eliminación de virus.

Objetivos Específicos

1. Cuantificar la concentración de colifagos somáticos en los efluentes y afluentes de las cinco plantas de tratamiento de aguas residuales, para evaluar la efectividad de la planta de tratamiento en su eliminación.
2. Evaluar la presencia de Hepatitis A y Enterovirus en afluentes y efluentes de las aguas residuales en estudio mediante una reacción en cadena de la polimerasa, con el fin de valorar la efectividad de la planta en tratamiento en su eliminación.
3. Correlacionar los resultados de cuantificación de colifagos somáticos y detección de Hepatitis A y Enterovirus, con el fin de evaluar la posible asociación entre ambos.

Materiales y Métodos

Para este estudio se utilizó un muestreo no probabilístico a juicio, se definió como unidad de muestreo la planta de tratamiento y se estableció realizar cuatro muestreos distribuidos en los meses de marzo, mayo, octubre y diciembre del año 2013. Se tomaron muestras de los afluentes y efluentes en la estación seca (marzo), lluviosa (octubre) y en las transiciones entre ambas (mayo y diciembre) para incluir en el estudio posibles patrones de estacionalidad. Para hacer el análisis más robusto se recolectaron muestras por triplicado en cada punto, es decir se tomaron muestras de cada planta de tratamiento en tres días diferentes de cada estación, excluyendo el día de limpieza. Cuadro 2.

Cuadro 2. Plantas de tratamiento en estudio ubicadas en el Gran Área Metropolitana

Planta de tratamiento	Ubicación	Tipo de tratamiento
PTAR 1 ACh	Moravia	Lodos activados comunes aireación externa.
PTAR 2 M	Moravia	
PTAR 3 RV	Heredia	
PTAR 4 CC	Ciudad Colón	
PTAR 5 LR	Guácima	

En cada muestreo se tomaron 1,5L en la entrada (afluente) y 1,5L en la salida (efluente) de las PTAR, en botellas previamente esterilizadas. Se colectó un total de doce muestras entrantes y doce salientes en cada planta por cada periodo analizado.

A. Recolección de muestras

El agua obtenida fue depositada y trasladada en botellas ámbar, estériles, de 1 galón, pretratadas con tiosulfato de sodio y EDTA. Las salidas se procesaron de inmediato, las entradas se congelaron a -70°C en botellas plásticas de 1,5 L debidamente rotuladas.

B. Pre tratamiento de la muestra: filtración y concentración

Para el pretratamiento se utilizó el método descrito por Despande *et al.*, 2003, donde se separaron las partículas virales por centrifugación y los precipitados fueron tratados adicionalmente con extracto de carne. Las muestras se distribuyeron en alícuotas de 250mL en tubos de centrifuga de 500mL, fueron centrifugadas en una centrífuga Eppendorf 5810R a 4000 rpm por 60min, con el fin de obtener un sobrenadante.

El precipitado se trató con extracto de carne al 3% pH 7,5 y cloroformo 20% v/v, y se centrifugó durante media hora para extraer las partículas virales que se encontraban adheridas a los sólidos. Se obtuvo tres capas: precipitado, cloroformo, sobrenadante, este último se mezcló con el sobrenadante obtenidos anteriormente.

Para concentrar los virus presentes en el sobrenadante se realizó una serie de filtraciones consecutivas en el Sistemas de Filtración Sartorius 16828 y 16831 estéril, de la siguiente forma: se prefiltró con el fin de eliminar los sólidos de mayor tamaño (se recomienda repetir la operación dos veces). Ese filtrado se refiltró con una membrana de poro $1,2\ \mu\text{m}$ que se cargó negativamente con extracto de carne a pH de 9, para que los virus no se adhieran a la membrana.

Se tomó una alícuota de 100 ml para análisis por capa simple y 50 ml para análisis por capa doble, posteriormente se filtró en una membrana de poro 0,2 μm , que se cargó con extracto de carne, y del filtrado se realizó el recuento de colifagos somáticos.

El resto del filtrado (filtración con membranas de 1,2 μm), se destinó para el análisis de virus patógenos. Para esto se le cambió el pH a 3,5 y se filtró una vez más a través de una membrana de 0,2 μm sin cargar, de manera que los virus de interés queden adheridos. Para liberar los virus de la membrana se agregó 15 mL de extracto de carne pH 9 y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó una filtración para recuperar los virus en el eluido final.

Todas las filtraciones se realizaron con un kitasato de 2000 mL, y para las centrifugaciones se utilizaron tubos cónicos de 15 y 50mL, además se emplearon prefiltros y filtros MFMillipore™ (Este procedimiento fue descrito por la APHA, y fue adaptado por el INISA).

Para completar la concentración viral se utilizó el método descrito por Schwab *et al.*, 1995, para el cual se procedió a medir el volumen obtenido de eluido, se le agregó el 15% de su volumen con polietilenglicol (PEG) 6000, o el 8% de su volumen con PEG 8000.

Además, se le agregó cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración de 0,2 M. Estas soluciones se dejaron durante una noche en agitación con agitador Corning a 4°C. Posteriormente, las soluciones se centrifugaron una hora a 4°C a 4000rpm, se resuspendieron los precipitados en un volumen entre 200 y 500 μL de buffer PBS 1X y se congelaron en tubos eppendorf de 1,5mL a -70°C.

Debido a limitaciones de reactivo PEG 6000 se realizó un ensayo adicional de idoneidad del PEG 8000. Este ensayo consistió en inocular 2 mL de la semilla viral cepa vacunal Polio Sabin 10^{-7} UFP/mL titulada en el laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología (10/02/06), en una muestra piloto de 2L de agua residual previamente autoclavada. Se le realizó el procedimiento de concentración viral descrito anteriormente con ambos reactivos (PEG 6000 y 8000), tanto para el eluido recuperado, como para la muestra sin concentrar, y la muestra sin inocular (control negativo) se diluyó en forma seriada hasta una dilución de 10^5 , cada dilución fue inoculada por duplicado en una placa de Dulbecco de la línea celular Hep-2 facilitada por el mismo laboratorio y se determinó la concentración expresada como UFP/mL. Los resultados obtenidos se detallan en el apartado correspondiente.

C. Método de Recuento de Colifagos Somáticos

A partir del filtrado obtenido en el procedimiento de pre tratamiento de las muestras, se siguió el método descrito por Solano *et al.*, 2012 de recuento en placa capa doble y capa simple de agar, de colifagos somáticos, para lo cual se empleó la bacteria *Escherichia coli* cepa 13706 ATCC de la bacterioteca del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), a una densidad óptica de 0.300 ($3,1 \times 10^8$ UFC/ mL). Para los efluentes se utilizó el método de recuento en placa capa simple (1,2% agar tripticasa soya) y para los afluentes el método de recuento en placa capa doble (1,2% y 0,7% agar tripticasa soya), en donde la máxima dilución seriada aplicada fue de 10^{-5} , las diferentes placas se incubaron a 37°C por 24 horas (Solano *et al.*, 2012).

Para la cuantificación de los colifagos somáticos se siguió el criterio de APHA para ámbitos contables de recuentos en placa, en este caso unidades formadoras de placas (UFP), definidas como aquellos espacios o zonas de aclaramiento en forma circular que se aprecien en la capa bacteriana, como consecuencia de la destrucción de la bacteria *Escherichia coli* al ser infectada por los colifagos) (Solano *et al.*, 2012). El intervalo contable fue de 30-300 UFP por placa de Petri, ya que solo datos que se encuentren dentro de este intervalo son representativos de la cantidad real de fagos presentes en la muestra inoculada (APHA, 2012).

D. Extracción de ARN viral y retrotranscripción

Se realizó una extracción del genoma viral utilizando el kit NucleoSpin® RNA Virus de Machere y Nagel para el aislamiento de ARN viral, según las instrucciones del fabricante y se obtuvo 50µL de ARN en agua libre de ARNasa. Para la obtención de ADNc se utilizó el kit RevertAid™HMinus FirstStrandcDNASynthesis (Fermentas®) siguiendo las instrucciones del fabricante, dicha reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2700.

E. Reacción en Cadena de la Polimerasa de Enterovirus y Hepatitis A

E.1. Controles

Para la detección de enterovirus se utilizó como control la cepa vacunal polio cepa Sabin I (NIBSC 1/528) a una concentración de 160ng/µL de ADNc y para la detección de hepatitis A se empleó con la cepa de este mismo virus obtenida del banco de virus de la Sección de Virología HAX-70 a una concentración de 15ng/µL de

ADNc. La cuantificación de ADN se determinó por fotometría, con el Biophotometer Plus Eppendorf AG 6132.

E.2. PCR para la detección de Enterovirus

Se utilizó el protocolo de amplificación descrito por Schwab *et. al* 1995 optimizado por Alguera, 2012. El protocolo consistió en un PCR anidado con iniciadores específicos para sitios conservados de la región 5' no codificante de los enterovirus (Sarmiento *et al.*, 2001). Los iniciadores empleados fueron el EV1 y EV2 (ver cuadro 3) para el PCR I descrito por Capaul & Gorgievski-Hrisoho 2005; EV3 y EV4 para un PCR II a una concentración final de 0,04 µg/µL. La mezcla para PCR se ajustó a un volumen final de 25µL utilizando el reactivo Master Mix 2X de Fermentas®. Se estableció para cada PCR (I y II) un total de 30 ciclos, cada uno constituido por una fase de desnaturalización de 45 segundos a 95°C, una fase de hibridación de 45 segundos a 55°C y una fase de elongación de 45 segundos a 70°C (Sarmiento *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados en el PCR anidado para la detección de Enterovirus y porcentajes de identificación obtenidos mediante la técnica bioinformática BLAST.

Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Valor E	Identificación %
EV/PCR-1	5'577ATTGTCACCA TAAGCAGCCA596 3'	0.11	100%
EV/PCR-2	5'444TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCC468 3'	3e04	100%
EV/PCR-3	5'531ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC557 3'	3e05	100%
EV/PCR-4	5'444TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCC468 3'	3e04	100%

E: Probabilidad de que la igualdad de la comparación ocurra al azar.

E.3. PCR para la detección de Hepatitis A

Se siguió el procedimiento descrito en la sección anterior, con la diferencia de los iniciadores, ya que para este proceso se usaron el HA1 y HA3 (ver cuadro 4), los cuales amplifican una sección del genoma que abarca los codones 12 al 122 del gen que codifica por la proteína capsular VP1 del virus Hepatitis A. Ambos iniciadores se emplearon a una concentración final de 0,05µg/µL. La mezcla para PCR se ajustó a un volumen final de 25µL y se utilizó el Master Mix2X de Fermentas®. Se realizaron 40 ciclos, cada uno constituido por una fase de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una fase de hibridación de 30 segundos a 46°C y una fase de elongación de 30 segundos a 70°C (Arauz *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Iniciadores utilizados en el PCR para la detección de Hepatitis A, sus valores E y porcentajes de identificación obtenidos mediante la técnica bioinformática BLAST.

Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Valor E	Identificación %
HA1	5´TTGCTCCTCTTTATCATGCTATG 3´	0.004	100%
HA3	5´TGGTTAAATCTAATGGTCCTCTATA 3´	0.280	100%

E: Probabilidad de que la igualdad de la comparación ocurra al azar.

F. Electroforesis

Los productos obtenidos en los diferentes PCR se analizaron mediante una corrida electroforética empleando un gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con el reactivo Gel Red; pasado el periodo respectivo de corrida, cada gel se reveló con luz ultravioleta en el trans-iluminador Ultra-VioletProducts de BioDoc-It® Imaging System.

Además, se estableció como un resultado positivo aquellas bandas que presenten una masa molecular de 113pb y 266pb para Enterovirus y Hepatitis A, respectivamente.

G. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de correlación mediante el método estadístico de Spearman, entre la concentración de colifagos somáticos y virus potencialmente patógenos, en cada una de las 5 plantas en estudio.

También se evaluó la efectividad en la reducción de los colifagos somáticos en las diferentes plantas de tratamiento, con el empleo del método estadístico t-student, esto para comparar si existe diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de concentración encontrados en los efluentes y los efluentes.

Utilizando la prueba T-student también se comparó los promedios de colifagos somáticos obtenidos en la estación seca y la estación lluviosa, para valorar si se presenta alguna influencia del estado meteorológico sobre la concentración de los virus.

Resultados

A. Implementación de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) para la concentración de las partículas virales.

Ante la limitante de reactivo de polietilenglicol 6000 (PEG 6000) utilizado en el proceso de concentración de las partículas virales, fue necesario la utilización de un reactivo PEG 8000.

Para evaluar la idoneidad de éste nuevo reactivo se desarrolló un ensayo de comparación entre el PEG 6000 y el PEG 8000 utilizando placas de Dulbecco. Se utilizó la cepa vacunal Sabin del virus Polio 1, aportada por Departamento de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, dicha cepa fue preparada el día 10 de febrero del año 2006.

El título de la semilla viral inoculada en la muestra de agua fue de $4,0 \times 10^7$ UFP/mL, sin embargo previo a someterse al proceso de concentración el título resultante fue de $3,5 \times 10^3$ UFP/mL, por el efecto de la dilución en el litro de agua, y para la concentración con PEG 6000 y con PEG 8000 se obtuvo un título final igual para ambos de $3,0 \times 10^4$ UFP/mL (ensayo realizado por duplicado).

En la figura 1 se puede observar que tanto el PEG 6000 como el PEG 8000 permiten concentrar las partículas virales un logaritmo más con respecto al título de la muestra inoculada sin concentrar, por lo tanto evidenció que la eficiencia del nuevo reactivo (PEG 8000) es idéntica a la eficiencia del reactivo que se venía utilizando (PEG 6000), validando su aplicación.

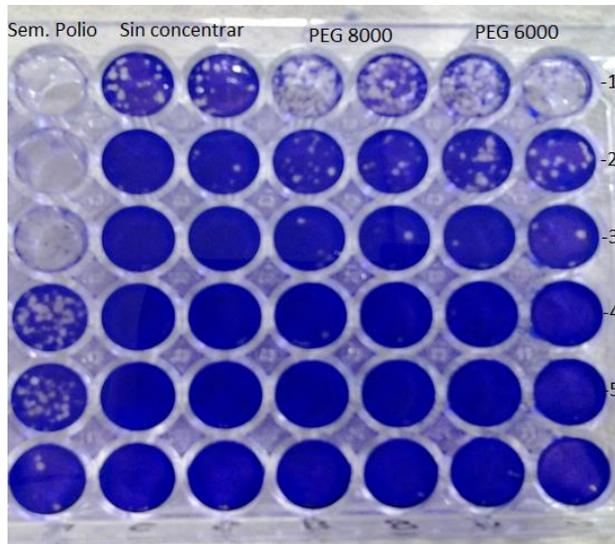


Figura 1. Concentración de la cepa vacunal Sabin del virus Polio 1, utilizando PEG 8000 (8% del volumen total).

En la figura 2 se muestra un gel de agarosa con los productos de PCR para Enterovirus obtenidos a partir de los concentrados utilizados para inocular la placa de Dulbecco. Tanto con PEG 6000 como PEG 8000 se observa una banda con un peso molecular de aproximadamente 113pb, la cual también se observa claramente en la semilla viral original, lo cual respalda la utilización tanto de PEG 6000 como de PEG 8000 para concentrar enterovirus.

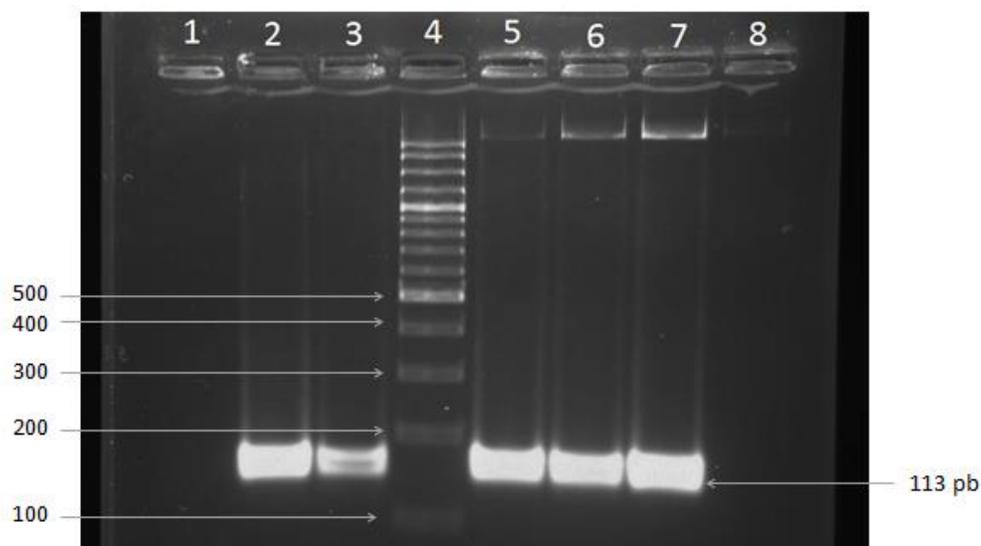


Figura 2. PCR anidado para la detección de Enterovirus del ensayo control con la cepa vacunal Sabin Polio 1. 1: Control Negativo, 2: Semilla vacunal Polio Sabin; 3: Agua Residual Inoculada, 4: Marcador de Masa Molecular, 5-6: Concentrado con PEG 8000; 7: Concentrado con PEG 6000; 8: Control de reactivos.

B. Cuantificación de la concentración de colifagos somáticos en los efluentes y afluentes como indicadores de contaminación fecal.

Para evaluar el grado de contaminación fecal en los afluentes y efluentes de las diferentes plantas de tratamiento de agua residual, se empleó el procedimiento de cuantificación viral en capa simple de agar para las salidas y en capa doble de agar para la mayoría de las entradas.

En la figura 3 se muestra una placa petri del método de capa doble de agar para la muestra colectada en la entrada de la PTAR 1 ACh el 07 de marzo del 2013, el recuento de colifagos somáticos fue de $1,01 \times 10^2$ UFP/mL.

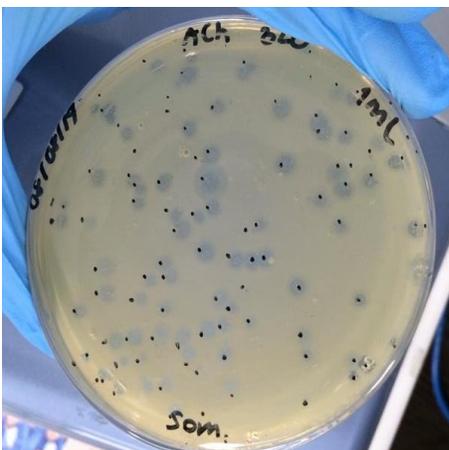


Figura 3. Cuantificación de Colifagos Somáticos por el método de capa doble de agar obtenido para la PTAR de ACh, el día 07/01/2013.

Como se describió en el apartado anterior, el criterio de recuento se hizo en base a APHA 2012. Por lo tanto se establece como máxima concentración de colifagos somáticos contables en un afluente un valor de $3,0 \times 10^9$ UFP/mL (Máximo contable en la dilución de 10^{-5}) obtenido por el método de capa doble de agar y en un efluente un valor de $3,0 \times 10^3$ UFP/mL obtenido por el método de capa simple de agar. Se estableció este criterio ya que inicialmente para los afluentes se obtuvieron resultados incontables de colifagos y se optó por el método capa doble de agar inoculando diluciones de la muestra por lo tanto su valor máximo contable es mayor que para los efluentes (Ver cuadros 5, 6, 7 y 8) (APHA, 2012).

c. Presencia de Hepatitis A y Enterovirus en afluentes y efluentes de las aguas residuales en estudio mediante una reacción en cadena de la polimerasa.

Mediante la implementación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa es posible la identificación de la presencia de los virus en estudio, empleando RT-PCR anidado y RT-PCR, para la detección de Enterovirus y Hepatitis A respectivamente.

Como se muestra en las figura 4, se detectó Enterovirus en las muestras de ciertos afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, por ejemplo en la PTAR 1 ACh se encontraron muestras positivas (bandas con pesos moleculares alrededor de 113 pb) durante mayo y diciembre y en la PTAR 5 LR muestras positivas en mayo y octubre.

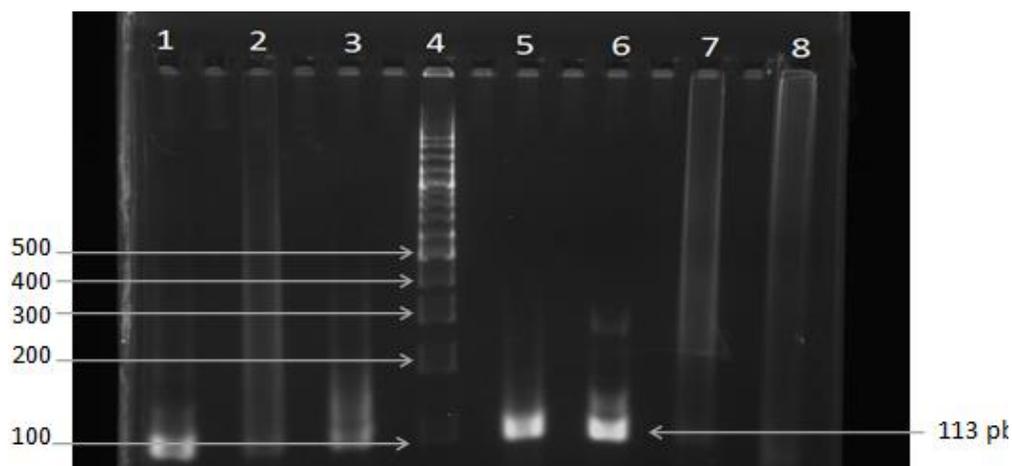


Figura 4. PCR anidado para la detección de Enterovirus a partir de muestras de PTAR. 1: E ACh (29/05/2013); 2: S LR (30/05/2013); 3: S LR (01/10/2013); 4: Marcador de masa molecular; 5: E ACh (30/05/2013); 6: E ACh (10/12/2013); 7: Control Positivo Enterovirus; 8: Control Negativo.

En la figura 5, también se evidencia la presencia de virus Hepatitis A (bandas de 266 pb) en las dos muestras de entrada de la PTAR 4 CC, en mayo.

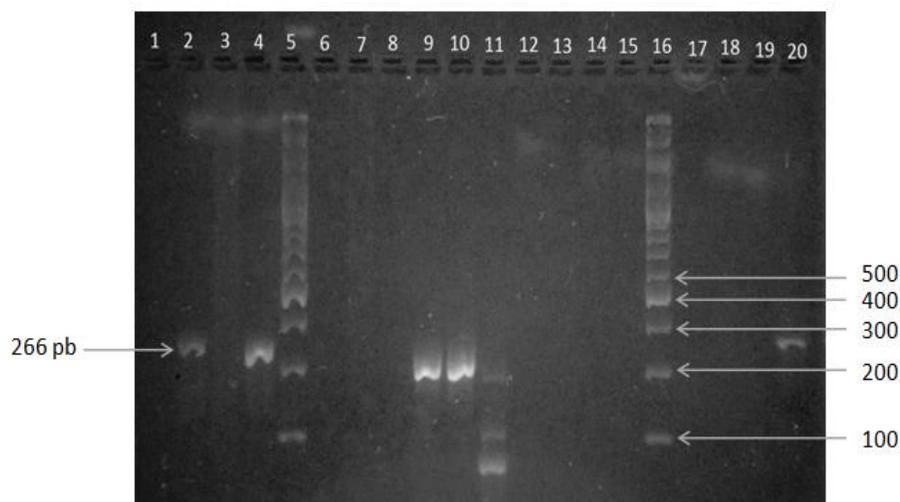


Figura 5. PCR para la detección de virus Hepatitis A en muestras de PTAR. 1: Control Negativo; 2: E CC (28/05/2013);3: S CC (28/05/2013) ;4: E CC (29/05/2013); 5: Marcador de masa molecular; 6: S CC (29/05/2013) ; 7: S CC (31/05/2013); 8 (NO inoculo); 9-10-11: Controles Positivos;12: S CC (01/10/13) ; 13: S CC (02/10/13); 14: S CC (03/10/13);15: S CC (10/12/13); 16: Marcador de masa molecular; 17: S CC (11/12/13); 18: S CC (12/12/13); 19: Control Negativo; 20: Control Positivo.

Del total de 120 muestras proyectadas se realizó el análisis de 118, esto debido a que una muestra se derramó durante el procesamiento (salida de PTAR 1 ACh recolectada en día 08/03/13), y además una salida de la PTAR 3 RV (06/03/13) la cual del todo no fue colectada debido a que el día del muestreo no había flujo de agua suficiente en el efluente, sin embargo, se le realizó el recuento de colifagos respectivo.

En el caso del virus de la Hepatitis A se encontraron 6 muestras con bandas presuntivamente positivas. Estas muestras correspondieron principalmente a entradas a las PTAR. Se encontraron 3 muestras de entrada positivas en la PTAR 4 CC en el mes de mayo, además se encontró una entrada y una salida de PTAR 1

ACh positivas en el mismo día de muestreo (octubre), por último se encontró una entrada de la PTAR 5 LR positiva en el mes de marzo. Para las PTAR 2 M y PTAR 3 RV no se encontraron muestras positivas por el virus de la Hepatitis A

Las muestras que resultaron positivas por Enterovirus fueron en total 21 muestras de 118 analizadas, de las cuales 6 corresponden a la PTAR 1 ACh: una entrada en marzo, dos en mayo de las cuales se encontró una salida positiva el mismo día, y una entrada en el mes de diciembre con salida positiva el mismo día de muestreo.

Se encontraron 4 muestras positivas en la PTAR 4 CC: una entrada y una salida en el mes de marzo, y dos salidas del mes de diciembre. Para la PTAR 2 M solo se encontró una muestra de entrada positiva en el mes octubre. Además para la PTAR 5 LR se encontraron un total de 4 muestras positivas: una entrada y salida positivas del mismo día de muestreo (Marzo), una salida del mes de mayo y una salida del mes de octubre. Para la PTAR 3 RV se encontraron 6 muestras positivas: una entrada y una salida en el mes de marzo, una entrada en el mes de mayo, dos salidas en el mes de octubre y una entrada en el mes de diciembre.

Los siguientes cuadros muestran la información completa sobre el número total de muestras, las fechas de muestreo, el tipo de muestra (afluente o efluente) y los resultados obtenidos para la cuantificación de colifagos somáticos y la evaluación cualitativa sobre la presencia de Enterovirus y Hepatitis A.

Cuadro 5. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de marzo

Fecha de muestreo	Planta de tratamiento	Entrada o salida	Somáticos (UFP)	Enterovirus	Hepatitis A
Marzo 05-03-13	PTAR 1 ACh	Entrada	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	1,04E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Entrada	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	0,00E+00	Positiva	Positiva
	PTAR 5 LR	Salida	4,60E+01	Positiva	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	5,88E+02	Positiva	Negativa
Marzo 06-03-13	PTAR 1 ACh	Entrada	3,00E+09	Positiva	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	1,09E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Entrada	3,00E+05	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	5,00E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	0,00E+00	Positiva	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	6,20E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	2,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	2,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	2,70E+01	Negativa	Negativa
PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa	
Marzo 07-01-13	PTAR 1 ACh	Entrada	1,01E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,00E+03	No se procesó	No se procesó
	PTAR 2 M	Entrada	5,40E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	2,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	3,00E+04	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	3,00E+05	Positiva	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	2,18E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	3,00E+04	Negativa	Negativa
PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa	

Cuadro 6. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de mayo.

Fecha de muestreo	Planta de tratamiento	Entrada o salida	Somáticos (UFP)	Enterovirus	Hepatitis A
Mayo 28-05-13	PTAR 2 M	Entrada	5,00E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	6,16E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	1,90E+04	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	1,47E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	1,70E+04	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	1,67E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	9,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	0,00E+00	Negativa	Positiva
	PTAR 4 CC	Salida	6,85E+02	Negativa	Negativa
Mayo 29-05-13	PTAR 2 M	Entrada	1,00E+05	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	1,00E+00	Positiva	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	1,20E+03	Positiva	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	1,40E+09	Positiva	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	9,35E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	1,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	0,00E+00	Negativa	Positiva
	PTAR 4 CC	Salida	1,57E+03	Negativa	Negativa
Mayo 30-05-13	PTAR 2 M	Entrada	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	4,80E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	1,30E+06	Positiva	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	2,00E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	2,40E+06	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,36E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	2,50E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	7,00E+06	Negativa	Positiva
	PTAR 4 CC	Salida	4,79E+02	Negativa	Negativa

Cuadro 7. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de octubre.

Fecha de muestreo	Planta de tratamiento	Entrada o salida	Somáticos (UFP)	Enterovirus	Hepatitis A
Octubre 01/10/2013	PTAR 2 M	Entrada	4,00E+00	Positiva	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,50E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	5,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	2,40E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	6,00E+00	Positiva	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	3,00E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
Octubre 02/10/2013	PTAR 2 M	Entrada	4,60E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	3,00E+09	Negativa	Positiva
	PTAR 1 ACh	Salida	0,00E+00	Negativa	Positiva
	PTAR 3 RV	Entrada	4,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	0,00E+00	Positiva	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	3,00E+05	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	7,50E+04	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	0,00E+00	Negativa	Negativa
Octubre 03/10/2013	PTAR 2 M	Entrada	1,50E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	3,00E+09	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	1,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	2,00E+00	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	1,06E+04	Negativa	Negativa
PTAR 4 CC	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa	

Cuadro 8. Resumen de los resultados de recuento de Colifagos somáticos, Enterovirus y Hepatitis A detectados en entradas y salidas de las PTAR en el mes de diciembre.

Fecha de muestreo	Planta de tratamiento	Entrada o salida	Somáticos (UFP)	Enterovirus	Hepatitis A
Diciembre 10/12/2013	PTAR 2 M	Entrada	1,70E+06	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	3,00E+09	Positiva	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	4,10E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	2,60E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	5,10E+07	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa
Diciembre 11/12/2013	PTAR 2 M	Entrada	4,20E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	4,50E+08	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	3,00E+01	No se procesó	No se procesó
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	1,70E+06	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	8,00E+06	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
Diciembre 12/12/2013	PTAR 2 M	Entrada	1,70E+01	Negativa	Negativa
	PTAR 2 M	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Entrada	1,65E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 1 ACh	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 3 RV	Entrada	6,50E+01	Positiva	Negativa
	PTAR 3 RV	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Entrada	1,40E+02	Negativa	Negativa
	PTAR 5 LR	Salida	3,00E+03	Negativa	Negativa
	PTAR 4 CC	Entrada	3,90E+01	Negativa	Negativa
PTAR 4 CC	Salida	3,00E+03	Positiva	Negativa	

D. Correlación de los resultados de cuantificación de colifagos somáticos indicadores de contaminación fecal con la presencia de Hepatitis A y Enterovirus.

Para correlacionar los resultados obtenidos del recuento de colifagos con muestras positivas ya sea por Hepatitis A o Enterovirus, se parte de la premisa de que se desconoce la relación de dependencia de ambas variables y por lo tanto se supone que ambas son aleatorias, en este caso contamos con una variable continua (recuento de colifagos expresados de forma logarítmica en UFP/mL) y una variable categórica (muestras positivas o negativas por los virus en estudio), se calcula el coeficiente de correlación (Rho) de Spearman cuyos resultados varían entre -1 y +1 pasando por 0, siendo un valor de Rho de 0 indicativo de que no existe correlación, y un valor de +1 indicativo de que la correlación es directa y estrecha, y un valor de -1 indicativo de que la correlación es inversa y estrecha (Moya, 2009).

Cuando las variables no tienen una distribución semejante a una curva normal, o cuando una o ambas son discretas el coeficiente idóneo para evaluar la intensidad de asociación es el coeficiente de correlación de Spearman; definida como una prueba no paramétrica que mide la relación de dependencia o interdependencia entre dos variables medidas. (Tomás, 2010).

Para calcular los índices de correlación se separaron y agruparon las muestras recolectadas según la planta de tratamiento durante los cuatro periodos de muestreo (todo el año) y según el tipo de muestra (Entrada/Afluente o Salida/Efluente), se realizó el cálculo de correlación entre las muestras de entrada

de una determinada planta de tratamiento junto con sus respectivos resultados de detección viral, y se hizo el cálculo de igual forma para las muestras salientes; por lo que se obtuvo como resultado final para cada planta un índice de correlación del total de las entradas y uno del total de las salidas.

Como se observa en el Cuadro 9, no parece que exista algún tipo de correlación entre la cantidad de bacteriófagos y la presencia de virus patógenos. Sin embargo es importante destacar que la mayoría de las muestras positivas por patógenos estaban positivas por indicadores.

Cuadro 9. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho) calculado para determinar la correlación existente entre el recuento de colifagos con la presencia de Hepatitis A o Enterovirus según afluentes y efluentes de las PTAR en estudio.

Muestras según PTAR	Índice de correlación Spearman (Rho)
Entradas PTAR 1 ACh	0,321
Salidas PTAR 1 ACh	-0,099
Entradas PTAR 2 M	-0,306
Salidas PTAR 2 M	No Calculado*
Entradas PTAR 3 RV	-0,320
Salidas PTAR 3 RV	0,000
Entradas PTAR 4 CC	-0,103
Salidas PTAR 4 CC	0,426
Entradas PTAR 5 LR	-0,480
Salidas PTAR 5 LR	-0,476

*Todas las muestras salientes de la PTAR 2 M resultaron negativas para la presencia virus patógenos por lo que no se pudo realizar el cálculo del índice de correlación ya que al menos una variable es constante.

Además para la determinación de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el recuento de colifagos de las muestras entrantes con respecto

a las salientes de una misma planta de tratamiento, se utilizó el método estadístico conocido como “t student para muestras relacionadas”, el cual es útil para trabajar promedios de muestras pequeñas de poblaciones con variabilidad real desconocida, es decir para poblaciones muestrales inferiores a 30 ($n < 30$), se desconoce la desviación estándar y por lo tanto no tienen distribución normal sino que sigue una distribución que tiende a la normal conforme el valor de “n” aumenta. (Moya, 2009)

Es así como se estimó mediante la t student el valor de “p dos colas” con un 95% de confianza, para las 12 muestras entrantes de una determinada PTAR en relación con las 12 muestras salientes de dicha planta y así para el resto de plantas de tratamiento, y se logró determinar si la relación del recuento de colifagos es igual o distinto de forma estadísticamente significativa ya que se esperaba que las concentraciones de colifagos en las salidas fuera diferente estadísticamente significativo por el efecto propio de la planta en la eliminación de contaminantes (Moya, 2009). Como se puede observar en el Cuadro 10, solamente para la PTAR 1 ACh se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de concentración de colifagos en las salidas con respecto a las entradas, para las demás plantas de tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los datos ($p > 0,05$).

Cuadro 10. Análisis de comparación de medias del recuento de colifagos somáticos en las entradas y las salidas de las plantas de tratamiento.

PTAR	Promedio del recuento de colifagos (UFP/mL)	p(T<=t) dos colas*
Entradas PTAR 1 ACh	1,04E+09	0,031
Salidas PTAR 1 ACh	1,66E+03	
Entradas PTAR 2 M	1,76E+05	0,242
Salidas PTAR 2 M	1,35E+03	
Entradas PTAR 3 RV	1,17E+08	0,338
Salidas PTAR 3 RV	2,00E+03	
Entradas PTAR 4 CC	5,53E+06	0,216
Salidas PTAR 4 CC	1,30E+03	
Entradas PTAR 5 LR	1,70E+05	0,260
Salidas PTAR 5 LR	2,25E+03	

P=0.05 con un 95% de confianza, gl=11

No se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la concentración de indicadores virales en época seca comparada con la época lluviosa. Para evaluar el efecto del agua llovida se utilizó la prueba “t student para muestras relacionadas de los afluentes y efluentes obtenidos en el muestreo realizado en marzo del 2013, establecido como estación seca y el muestreo realizado en octubre del 2013, establecido como estación lluviosa. Se contó con información de la cantidad de agua llovida (mm) a través del Boletín Meteorológico del Instituto Meteorológico Nacional (cuadro 11).

Cuadro 11. Evaluación de la influencia del agua llovida durante el periodo de muestreo, sobre el recuento de fagos de las entradas y salidas de las diferentes PTAR durante el mes de marzo (estación seca) y el mes de octubre (estación lluviosa).

PTAR		Periodo de muestreo	Promedio del recuento de colifagos (UPP/mL)	Agua llovida en milímetros (mm) ^{1,2}	p(T<=t) dos colas*
Entrada	PTAR 1 ACh	Marzo	1,00E+09	4,6	0,423
		Octubre	2,00E+09	332,4	
	PTAR 2 M	Marzo	1,00E+05	4,6	0,425
		Octubre	2,03E+03	332,4	
	PTAR 3 RV	Marzo	1,00E+04	50,9	0,423
		Octubre	3,33E+00	493,4	
	PTAR 4 CC	Marzo	1,00E+05	35,7	0,586
		Octubre	2,85E+04	519,7	
	PTAR 5 LR	Marzo	1,00E+04	6,8	0,483
		Octubre	1,00E+05	214,5	
Salida	PTAR 1 ACh	Marzo	1,71E+03	4,6	0,184
		Octubre	1,01E+03	332,4	
	PTAR 2 M	Marzo	1,73E+01	4,6	0,190
		Octubre	2,00E+03	332,4	
	PTAR 3 RV	Marzo	2,02E+03	50,9	0,423
		Octubre	2,00E+03	493,4	
	PTAR 4 CC	Marzo	2,69E+02	35,7	0,555
		Octubre	1,00E+03	519,7	
	PTAR 5 LR	Marzo	2,02E+03	6,8	0,415
		Octubre	1,00E+03	214,5	

* P=0,05 con un 95% de confianza.

1. Fuente: Naranjo, J. (2013). Boletín Meteorológico Mensual. Instituto Meteorológico Nacional. Costa Rica. Revisado el 30 de abril del 2015 desde http://www.imn.ac.cr/boletin_meteo/historial/2013/BMET032013.pdf.

2. Fuente: Solano, E. (2013). Boletín Meteorológico Mensual. Instituto Meteorológico Nacional. Costa Rica. Revisado el 30 de abril del 2015 desde http://www.imn.ac.cr/boletin_meteo/historial/2013/BMET102013.pdf.

Tal como se observa en el cuadro 11, los resultados estadísticos muestran que la cantidad de lluvia no influye sobre la concentración de indicadores virales.

Discusión

A. Implementación de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) para la concentración de las partículas virales.

El uso de polietilenglicol (PEG 6000 15% + NaCl) como un polímero acuoso de sistema de dos fases para concentrar virus de muestras de aguas residuales fue descrito por Albertsson en el año 1960 y en la actualidad sigue considerándose un método rápido y barato de precipitación viral de una muestra de agua.

Sin embargo, es importante tomar en cuenta que este método de concentración con PEG varía en su eficiencia de concentración según el virus en cuestión, por ejemplo Lewis y Metcalf realizaron un estudio utilizando PEG 6000 donde se determina la efectividad de este método de concentración con diferentes tipos de virus, entre estos: Hepatitis A, Rotavirus y Virus Polio, teniendo como conclusión que el método además de ser efectivo para concentrar virus en agua en general es capaz de concentrar virus patógenos presentes en la misma, siendo el método de elección para concentrar Hepatitis A. Sin embargo, para el Virus Polio se destaca que no hay diferencia significativa entre el método con PEG y la floculación orgánica descrita por Katzenelson *et al*, en cuanto a la concentración y recuperación viral, siendo ambos métodos igualmente efectivos (Lewis & Metcalf, 1988)

Es por esta razón que el método de concentración con PEG es el más adecuado para concentrar los virus de interés en este estudio y además, el ensayo empleado para determinar la validez del uso PEG 8000 como alternativa de sustitución del PEG 6000, funcionó asimismo para evaluar la efectividad del proceso de concentración implementado, mismo procedimiento realizado por Deshpande en el cual de igual

forma inocularon una muestra de agua con virus Polio cepa vacunal Sabin 1 y lograron un porcentaje de recuperación de 79%. (Deshpande *et al*, 2009).

La muestra inoculada con la cepa vacunal del virus Polio Sabin 1 requirió ser autoclavada (120°C, 15min) para eliminar aquellos microorganismos que podrían interferir en el proceso de filtración a través de las membranas, y para inactivar mediante el empleo de temperatura aquellos Enterovirus que podrían estar presentes en la muestra de forma natural, ya que a pesar de ser los más resistentes al tratamiento con calor se inactivan a temperaturas superiores a los 60°C. Estos virus al generar el mismo efecto citopático que el virus Polio inoculado, introducirían un error adicional al ensayo al determinar la titulación viral en la placa de Dulbecco (Niseen *et al*, 1996).

Además de demostrar que tanto el PEG 8000 como el PEG 6000 son sustancias idóneas para la concentración de enterovirus en aguas, con el ensayo de prueba se observó la capacidad de concentración del protocolo utilizado. Se comparó el título obtenido en UFP/mL para la muestra inoculada sin concentrar con respecto a la muestra inoculada y concentrada, tanto por PEG 6000 como con PEG 8000, siendo el título resultante de las muestras concentradas (10^4 UFP/mL) un logaritmo mayor al título de la muestra sin concentrar, lo que significa que este proceso logra concentrar alrededor de diez veces las partículas virales infectantes.

Es importante destacar que para determinar el título viral se utilizó el método de placas de Dulbecco en el cual únicamente se evidencian aquellas partículas virales que permanecen infectantes en el inóculo, pues lo que se observa es la capacidad viral de generar un efecto citopático en las células (en este caso Hep-2) y la consecuente formación de placas de lisis.

Teniendo esto en cuenta, no es de extrañar que el título determinado de las muestra concentradas sea menor que el de la semilla viral de la cepa vacunal (10^7 UFP/mL), la cual funcionó como control positivo, ya que es posible que durante el proceso de concentración las partículas virales inoculadas en la muestra se hayan inactivado parte de las mismas por cambios en el pH o incluso por inhibidores presentes en la matriz de agua inoculada (Sobsey *et al*, 1998).

En aguas residuales es común encontrar sustancias como desinfectantes, cloro libre y dióxido de cloro que pueden dañar las partículas virales, a diferencia de la semilla viral que no fue inoculada en la muestra de agua y cuya manipulación fue mínima (Sobsey *et al*, 1998)

Por otro lado, el alcance de esta investigación es determinar la posible presencia de partículas virales en cuerpos de agua (entrada y salida de una PTAR) por medio de la detección por biología molecular del material genético. La capacidad infectante de la partícula viral no está siendo determinada, a diferencia de un ensayo de placas de Dulbeco. Sin embargo, es importante destacar que, los métodos de concentración utilizados buscan concentrar partículas virales íntegras y posteriormente extraer su material genético, lo que significa que de encontrarse una muestra positiva esto se debe a la presencia de una partícula viral, no a material genético presente libremente en la muestra.

Para confirmar que las UFP/mL resultantes correspondieran al virus Polio inoculado, una vez ejecutado el protocolo se obtuvieron bandas en gel de agarosa, de masa molecular de 113 pb, estas bandas fueron observadas en el control positivo (semilla viral cepa vacunal), en los eluidos obtenidos con PEG 6000 y PEG 8000 y en la muestra de agua residual sin concentrar.

B. Cuantificación de la concentración de colifagos somáticos en los efluentes y afluentes como indicadores de contaminación fecal.

El principio del análisis de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal parte del hecho de que son virus que infectan y que se replican específicamente en *Escherichia coli* provenientes del tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente, es decir, la temperatura óptima de replicación de estos virus es 37 °C siendo esto una condición que le permite a los fagos compartir ese hábitat con posibles agentes virales enteropatógenos.

Aunque estudios realizados por Jofre hablan de que existe posibilidad de replicación estos virus en el ambiente, principalmente en climas tropicales, establece que la concentración mínima de *Escherichia coli* ronde las 10⁶ UFC/ 100ml y además una alta densidad de los colifagos para que este proceso sea exitoso (Paz *et al*, 2003; Jofre, 2009; Woody & Cliver, 1997).

Dentro de los métodos establecidos para su cuantificación se destacan las metodologías de capa doble la cual se asignó para la mayoría de los afluentes y capa simple, asignada para los efluentes. Ambas técnicas son consideradas procedimientos rápidos, sencillos, de bajo costo y de alta sensibilidad, por lo que su empleo es recomendado en el estudio de virus indicadores de contaminación en muestras con matrices complejas (Paz *et al*, 2003).

Durante el desarrollo de la fase experimental, se observó que la posible presencia de agentes químicos como desinfectantes y detergentes visualizados en las muestras, los cuales se encuentran comúnmente en las PTAR, estaban causando algún efecto negativo en la cuantificación colifagos somáticos, por lo que se valoró el aplicar el

método de capa doble en la entradas, esto con el objetivo de aumentar la sensibilidad y con ello evaluar si se presentaban mejoras en los resultados con respecto a los obtenidos con el método de capa simple (Sobsey *et al*, 1998).

La principal complicación que se presentó durante los análisis por la presencia de estos inhibidores, se visualizó durante el proceso de filtración, lo cual puede explicarse por el alto contenido de iones en la muestra, lo que impedía el desarrollo de un proceso fluido. Es importante mencionar que dichos interferentes no fueron evaluados de forma cuantitativa, ya que no se encontraba dentro de los objetivos del proyecto, sin embargo, de forma cualitativa se logró evidenciar su presencia durante los cuatro muestreos. (Sobsey *et al*, 1998; Lou *et al*, 2012).

Otra fase en la metodología que se puede ver afectada por la presencia de estos agentes es el proceso de cuantificación, lo cual puede explicarse por una posible inactivación de los virus ante la presencia elevada de los químicos disminuyendo así, su capacidad de infectar la bacteria *E.coli* (Sobsey *et al*, 1998).

Durante el desarrollo de las metodologías, se observó que una gran cantidad de los resultados obtenidos a partir de los procedimientos para cuantificar colifagos somáticos en las diferentes PTAR eran incontables, por lo cual fue necesario establecer un valor máximo contable, para lo cual se empleó como referencia los intervalos de cuantificación establecidos por la APHA, los cuales van de (30- 300) UFP/mL. Para nuestro estudio se definió como máxima cifra contable para los afluentes un valor de $3,00 \times 10^3$ UFP/mL; sin embargo, se debe considerar que al definir esta unidad máxima de medida no se visualiza la cantidad real de colifagos

en la muestra, lo cual puede tener implicaciones al aplicar los métodos estadísticos, afectando con ello los resultados y la posible interpretación de los mismos.

Con este marco de análisis se pudo observar un considerable número de muestras con valores superiores a 10^3 (definido como valor máximo contable) por colifagos somáticos, lo cual genera una alarma debido a que la cuantificación de este parámetro puede utilizarse para evaluar el funcionamiento de la planta. Resultados como los obtenidos en la entrada de la PTAR 5 LR (28/05/13) con un valor de $9,00 \times 10^3$ UFP/mL y su respectiva salida LR (28/05/13) de $3,00 \times 10^3$ UFP/mL, los de E PTAR 3 RV (10/12/13) con recuentos de $4,10 \times 10^3$ UFP/mL y S PTAR 3 RV (10/12/13) de $3,00 \times 10^3$ UFP/mL, y así muchas otras muestras repitiendo este mismo patrón con recuentos establecidas como valores máximos, obliga analizar detalladamente si el funcionamiento de la planta es idóneo, es decir si éstas son realmente efectivas en el proceso de eliminación de contaminantes microbianos (Paz *et al*, 2003).

En contraposición a los valores elevados discutidos anteriormente, en algunos momentos del año pareciera que el funcionamiento de las plantas es óptimo, por ejemplo la entrada de la PTAR 2 M del 29 de mayo tuvo un recuento de $1,00 \times 10^5$ UFP/mL y su respectiva salida un recuento de $0,00 \times 10^0$ UFP/mL; las muestras colectadas en la PTAR 4 CC, el 2 de octubre mostraron un recuento de $7,50 \times 10^4$ UFP/mL en la entrada y de $0,00 \times 10^0$ UFP/mL a la salida.

También es importante al observar los resultados (ver cuadro 5, 6, 7 y 8) que existen valores de entrada con recuentos menores o negativos por colifagos y su

respectiva salida con un mayor recuento de los mismos, lo cual, se puede explicar por medio de las siguientes razones:

En primer lugar se debe tener en cuenta que al momento de la toma de las muestra (entrada y salida) cada una presenta un carácter individual, no son muestras pares, ya que se toman de manera simultánea, sin tomar en cuenta los tiempos de retención del agua dentro de la planta, por lo que la muestra en la entrada podría ser diferente a lo que está saliendo después del proceso de tratamiento, por lo que resultados como los observados en la E PTAR 5 LR (03/10/13) con valores de $2,00 \times 10^0$ UFP/mL y S PTAR 5 LR (03/10/13) de $3,00 \times 10^3$ UFP/mL, E PTAR 4 CC (29/05/13) de $0,00 \times 10^0$ UFP/mL y S PTAR 4 CC (29/05/13) de $1,57 \times 10^3$ UFP/mL son esperables.

Otra razón descrita previamente, en la cual estos resultados son lógicos es el tiempo de retención del material en la planta, ya que este oscila alrededor de las 24 horas, por lo que es posible que se acumulen un alto número de colifagos y que éstos sean luego expulsados al azar y que coincidan con los elevados recuentos (AyA, 2009).

Por último como se mencionó anteriormente existe un efecto derivado de la presencia de agentes químicos en las muestras, ya que éstos pueden tener un efecto inhibitorio sobre la interacción del colifago con la *E. coli* y por ello no sea posible observar su verdadera capacidad infectante, y por eso visualizar recuentos más bajos en las entradas y más levados en las salidas (Sobsey *et al*, 1998).

C. Presencia de Hepatitis A y Enterovirus en afluentes y efluentes de las PTAR en estudio mediante PCR.

Con respecto a la evaluación de la presencia de virus pertenecientes a la familia Picornaviridae, específicamente el género Enterovirus y Hepatitis A, su determinación se realizó por medio de metodologías moleculares. En este caso se empleó la técnica de PCR, (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés). Esta metodología tiene elevada sensibilidad y especificidad para la determinación de virus en aguas contaminadas o residuales (Hamza *et al*, 2011).

Sin embargo, es importante considerar que estas determinaciones tienen una gran limitante, la cual se resume en la falta de correlación entre el genoma viral detectado y la capacidad infectante de la partícula viral, lo cual fue discutido con anterioridad, por lo que las conclusiones y alcances de estos de estudios deben analizarse con detenimiento (Hamza *et al*, 2011).

En este estudio se definió una RT-PCR anidada para valorar la presencia de enterovirus con un límite de detección de 160×10^{-10} ng/ul de ADNc, de igual forma se estableció un RT-PCR para la detección de Hepatitis A, para el cual se definió una sensibilidad de 15×10^{-7} ng/ul de ADNc dando una amplia confianza con respecto a su límite de detección (Alguera, 2012).

Según la técnica bioinformática empleada (BLAST), para los iniciadores utilizados, la igualdad de la comparación para Enterovirus que infectan al ser humano es de un 100%, por lo que a pesar de que en la muestra pueden

encontrarse Enterovirus de animales, se considera que su traslape en la amplificación es mínimo.

Es importante mencionar que el 23% de las muestras analizadas (entradas y salidas) mostraron un resultado positivo por alguno de los dos agentes virales en estudio. De este porcentaje un 13% de muestras resultaron positivas en las entradas y un 10% en las salidas.

El encontrar agentes patógenos virales en la entrada de una PTAR puede ser esperable, ya que puede ser producto de una posible infección y excreción los virus en la población que se beneficia con el sistema de tratamiento de sus aguas residuales; mientras que el determinar de forma cualitativa partículas virales en los efluentes, indican un posible riesgo en la salud pública; esto porque si se están eliminando partículas virales al ambiente implican un eminente peligro a la población que puede estar en contacto con estos efluentes, ya que como se menciona en los antecedentes las patologías asociadas con estos virus pueden ir desde problemas leves de carácter gastrointestinal hasta llegar a producir enfermedades severas.

Sin embargo para evaluar este riesgo potencial es necesario contar con datos cuantitativos de la concentración de partículas virales liberadas al ambiente y realizar estudios de capacidad infectante. Debido a los alcances de este estudio estos parámetros no fueron evaluados.

Otro resultando importante es la diferencia entre la positividad dada por las entradas y las salidas, esto porque hay muestras de salidas positivas con entradas

negativas, lo cual puede explicarse por un comportamiento similar en las muestras al descrito con los colifagos somáticos.

Por otro lado, al evaluar la presencia de virus patógenos en cada una de las PTAR, se observó que todas estuvieron positivas por al menos uno de los virus en estudio durante el año analizado. Las PTAR 1 ACh y PTAR 3 RV presentaron la mayor cantidad de pruebas positivas para Enterovirus, y la PTAR 2 M, la menor cantidad.

En cuanto a la presencia de Hepatitis A, se observó que la PTAR con mayor número de reportes positivos por este virus, fue la PTAR 4 CC, específicamente en las muestras obtenidas en el segundo muestreo, en donde se determinaron como positivas las tres entradas recolectadas en los tres días de muestreo del mes de mayo (28, 29 y 30 de mayo del 2013), por lo que estos datos pueden revelar una importante información, ya que podríamos estar ante un aumento del número de casos o incluso un brote por este virus en la zona.

Sin embargo, es importante considerar que, a pesar de estos resultados positivos en las entradas de la PTAR 4 CC obtenidas en un bloque del muestreo, los análisis de todas las salidas recolectadas en los diferentes muestreos realizados durante el año 2013 presentaron resultados negativos, por lo que pareciera que la planta es capaz de eliminar algunos virus de manera más eficiente.

En lo referente a las plantas con menor número de reportes por Hepatitis A, se destacan las PTAR 2 M y PTAR 3 RV en donde no fue posible detectar el virus.

También es importante rescatar que la PTAR 2 M mostró resultados negativos en los análisis de las salidas para ambos virus, por lo que puede que esta planta posea la capacidad de eliminar más eficientemente ciertos virus.

D. Correlación de los resultados de cuantificación de colifagos somáticos indicadores de contaminación fecal con la presencia de Hepatitis A y Enterovirus

En los últimos años se ha discutido ampliamente la posibilidad de monitorear indicadores de contaminación viral en agua que correlacionen con la presencia de virus entéricos patógenos para el ser humano. Aunque la detección directa de virus patógenos por biología molecular es bastante práctica tiene limitantes como laboriosidad, costo, demanda técnica, colectas de grandes volúmenes de muestra y la incapacidad de distinguir infectantes de no infectantes; esto aunado al numeroso grupo a monitorear (Norovirus, Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Hepatitis A y Hepatitis E) hace que se vuelva poco viable para análisis de rutina, por lo cual se utilizan bacteriófagos como los colifagos somáticos, como indicadores de contaminación fecal, ya que como se mencionó anteriormente, comparten ciertas similitudes con virus entéricos. (Savichtcheva & Okake, 2006; Rezaeinejad *et al*, 2014).

Sin embargo, aún no existe un consenso sobre el uso de estos bacteriófagos como indicadores de contaminación viral en aguas residuales y el monitoreo de la misma. Siguen faltando estudios concluyentes en los que se corrobore esta correlación o que indique que los colifagos no son los indicadores virales óptimos para este propósito (Rezaeinejad *et al*, 2014). Por esta razón es importante evaluar en

nuestras condiciones la existencia de una correlación entre los datos de presencia o ausencia de los virus en estudio con respecto al recuento de colifagos somáticos detectados en las mismas muestras de agua residual en cuestión.

Algunos aspectos a considerar con respecto a éstos indicadores de contaminación viral es que al igual que los virus entéricos, se excretan por heces, pero no por esto en una muestra de agua con alto contenido de materia fecal en la cual es de esperarse un recuento por colifagos somáticos elevados se encuentre positiva por un virus entérico, por lo cual es necesario evaluar qué tan alto es el recuento de colifagos somáticos en una muestra positiva ya sea por Hepatitis A, Enterovirus o ambos y esto se visualiza mediante los resultados del estudio de correlación. Además, el hecho de que tanto los colifagos, como los virus en cuestión, comparten características de resistencia en muestras de agua residual, hace pensar que si una muestra es permisiva para la supervivencia de colifagos eventualmente lo puede ser para la supervivencia de un patógeno viral y la permanencia de su infectividad (Robert, 2014).

Al determinar el índice de correlación o el coeficiente de correlación para los recuentos de colifagos somáticos y la presencia de virus potencialmente patógenos, no se observa que para ninguna planta de tratamiento en cuestión exista una correlación aceptable ($Rho < 0,6$), algunas si presentaron una muy débil correlación con valores más cercanos a +1, sin embargo, estos datos no establecen una correlación directa estrecha.

Para las muestras salientes de la PTAR 2 no se calculó el índice de correlación debido a que todas las muestras resultaron negativas para la presencia de Enterovirus y Hepatitis A.

Al igual que en este proyecto, un estudio publicado en el año 2014 determinó una correlación débil entre colifagos y virus Entéricos en clima tropical, a excepción en la determinación de Norovirus en el cual si se encontró una fuerte correlación con los colifagos, debido a que fueron los virus entéricos que se encontraron con mayor prevalencia. El estudio concluye que el recuento de colifagos no es la forma más adecuada de monitorear la ocurrencia de virus entéricos en aguas.

También similar a lo encontrado en nuestro estudio, el estudio de Rezaeinejad encontró que aquellas muestras con un mayor recuento de colifagos presentaron concentraciones de virus entéricos menores y viceversa afirmando el hecho de que no por ser muestras con un recuento de colifagos bajo significa la ausencia de virus entéricos (Rezaeinejad *et al*, 2014).

La falta de asociación entre ambos parámetros se puede relacionar con sobrevivencia o inactivación de los colifagos en la muestra de agua ya que la principal diferencia entre ambas determinaciones es el método de detección, para colifagos se obtienen UFP/mL por lo que se requieren partículas virales infectantes, en cambio, para los virus entéricos se obtiene solamente la presencia o ausencia de los mismos y no se cuantifican.

Es aquí cuando se plantea la posibilidad de utilizar otros virus que compartan características con los demás virus entéricos y cuyo método de detección no requiera de que la partícula sea infectante, como por ejemplo los Norovirus, un virus no cultivable, el cual en el estudio realizado por Rezaeinejad y colaboradores, presenta un porcentaje de detección del 57% de muestras positivas por este virus y que además presenta una excelente correlación con las demás muestras positivas por otros enterovirus e incluso con los colifagos (Rezaeinejad *et al*, 2014).

Sin embargo este virus no está presente en el total de muestras ya que al igual que los otros enterovirus es un virus patógeno para el ser humano y esto limita la posibilidad de utilizarlo como alternativa de indicador de contaminación viral en agua, a diferencia de los colifagos los cuales se encuentran presentes en un 86% de la totalidad de las muestras procesadas en nuestro estudio.

Para evaluar la efectividad de la planta de tratamiento en la reducción del recuento de colifagos somáticos de las muestras a través del año de muestreo, se determinó que a pesar de que todas las plantas de tratamiento logran reducir el recuento de colifagos varios logaritmos en la salida con respecto a la entrada, solo para la PTAR 1 ACh esa reducción es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) por lo cual es la única planta en estudio que logra reducir efectivamente las concentraciones de estos virus indicadores de contaminación fecal.

Por último, al probar si existe alguna variación de los resultados de colifagos según estacionalidad (diferencias entre estación seca y lluviosa) no se observó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) a consecuencia de la cantidad de lluvia caída, teniendo cantidad de lluvia como indicador de estación seca y de estación lluviosa.

En el estudio de Rezaeinejad *et al*, 2014 tampoco se detectó una diferencia significativa entre las concentraciones de colifagos resultantes ($p > 0,05$) a pesar de que observaron que las concentraciones de colifagos disminuyen en aproximadamente dos órdenes de magnitud durante la primer hora de caída lluvia pero no alcanza a valores significativamente diferentes que los reportados para la estación seca (Rezaeinejad *et al*, 2014).

En dicho estudio sí se evidencia que existe una mayor prevalencia de virus entéricos durante la estación seca de países tropicales respecto a la estación lluviosa, condición que se corrobora en nuestro estudio ya que durante la estación seca y su transición a la lluviosa (Marzo y Mayo respectivamente) se detectó un 60% de las muestras positivas por virus patógenos (Enterovirus y Hepatitis A juntos) mientras que durante la estación lluviosa y su transición a la seca (Octubre y Diciembre respectivamente) se detectó el resto de las muestras positivas por estos virus (Rezaeinejad *et al*, 2014).

Conclusiones

- Tanto la utilización de Polietilenglicol 6000 como de PEG 8000 para la concentración viral en agua residuales es efectiva, pues se logran concentrar las partículas virales en al menos un logaritmo con respecto a las partículas virales presentes en la muestra sin concentrar.
- Según el análisis estadístico, la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas estudiadas de nuestro país no son efectivas en disminuir el recuento promedio de colifagos somáticos de las muestras entrantes respecto a las salientes durante un año de análisis. A excepción de la PTAR 1 ACh, la cual si es efectiva.
- Los resultados positivos dados por la presencia de Enterovirus y Hepatitis A, revelan la pobre capacidad de eliminación de los mismos por parte de las plantas, así como un inminente riesgo a nivel de salud pública. Sin embargo, se debe considerar la capacidad infectante y la carga viral de éstos para cuantificar el riesgo real.
- No existe una correlación demostrable bajo el método de análisis de Spearman, entre el recuento de colifagos somáticos y la presencia de Enterovirus y Hepatitis A en las cinco PTAR en estudio.
- No existe una influencia demostrable de la estacionalidad sobre el resultado del recuento de colifagos somáticos analizados durante la estación seca y lluviosa.

Recomendaciones

- Genotipar los Enterovirus y Virus de la Hepatitis A detectados para así determinar las cepas virales circulantes en los ríos del país.
- Detección de los virus en estudio por medio de un método de cuantificación-detección como lo es el PCR en tiempo real (RT-PCR) y así poder estimar la carga viral real tanto a la entrada como a la salida de las PTAR para tener información de la cantidad de virus liberados al ambiente.
- Búsqueda de nuevos indicadores virales de contaminación fecal que permitan valorar la efectividad real de la planta utilizando un método de detección más adecuado que no requiera que las partículas virales sean infectantes y que además, correlacionen con la presencia de virus entéricos potencialmente patógenos para el ser humano.
- Identificación de los diferentes tipos de virus aislados pertenecientes al grupo de los Enterovirus para evaluar cuál de estos se encuentran en mayor proporción en las excretas vertidas a los ríos del país.
- Utilizar además de un método de biología molecular para la detección de virus entéricos, un método que permita diferenciar entre partículas no infectantes y partículas realmente infectantes, para evaluar el impacto de la presencia del virus en el agua en salud pública.
- Utilización de un control viral interno presente en todas las muestras cuya detección al inicio y fin del procedimiento permita garantizar que este fue realizado de forma correcta y calcular % de recuperación.

- Incluir dentro del protocolo de detección de virus entéricos, otros virus que comparten la forma de transmisión al ser humano con los virus estudiados en este proyecto y cuya detección es importante desde el punto de vista de la salud pública del país, como lo son: Adenovirus, Norovirus, Rotavirus, Astrovirus y Hepatitis E.

Agradecimientos

Agradecemos primero que todo a Dios por darnos la sabiduría, la paciencia, la fortaleza, el discernimiento y principalmente por la oportunidad de estudiar una carrera en la cual podemos servir al prójimo con nuestro conocimiento.

También damos gracias infinitas a todas las personas que de una u otra manera cooperaron para que este el proyecto fuera posible; y a todos nuestros amigos, amigas y familiares que nos brindaron su apoyo durante toda esta trayectoria.

Agradecemos al personal del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), por la ayuda brindada durante el desarrollo experimental del proyecto.

Agradecemos la colaboración del Dr. David Loría y la Dra. Melissa Solano, por su valioso aporte al trabajo realizado.

Valoramos y agradecemos el contribución y la disponibilidad del departamento de Virología de la Facultad de Microbiología; especialmente a los señores Carlos Vargas y Francisco Vega, para con este proyecto de investigación.

Damos las gracias a nuestra tutora la Dra. Luz Chacón por la confianza, el interés, la colaboración y principalmente por ser una guía en el desarrollo del trabajo, ya que sin sus aportes este no hubiera sido posible.

Por último, dedicamos de forma muy especial nuestro trabajo a la Dra. Lizeth Taylor, quien fue, quien nos dio la oportunidad de trabajar en este proyecto y en al ámbito que tanto nos apasiona, y quien fue y será un gran ejemplo a seguir.

Referencias bibliográficas

Abd, E., Galil, K., El Sokkary, M., Kheira, S., Salazar, A., Yates, M., Chen, W., Mulchandani, A. (2004). Combined immunomagnetic separation-molecular beacon-reverse transcription-PCR assay for detection of Hepatitis A virus from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol*, 70, 4371-4374.

Alguera, J. (2012). Implementación y análisis de métodos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa para la detección de enterovirus y virus de la hepatitis A en aguas residuales. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

American Public Health Association (APHA), Water Works Association and Water Environment Federation. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. American. 22nd edition. Part 9000 Microbiological Examination.

Angulo, F. (2013). Manejo, disposición y desecho de las aguas residuales en Costa Rica. Decimonoveno Informe del Estado de la Nación en Desarrollo Sostenible. Revisado el 10 de setiembre del 2014 desde http://www.estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/019/angulo_2013.pdf.

Arauz, P., Sundqvist, L., García, Z., Taylor, L., Visoná, K., Norder, H. Magnius, L. (2001). Presumed common source outbreaks of Hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. *J. Med. Virol*, 65, 449-456.

Argaw, N. (2004). Chapter 6: Waster sources and treated. In renewable energy in water and wastewater treatment aplicaciones; National Reserve Energy Laboratory, U.S. Department of Energy Laboratory: Golden, CO,USA, pp, 38-46.

Acueductos y Alcantarillados. (2009). Programa Nacional de manejo adecuado de las aguas residuales Costa Rica 2009-2015.

Bosch, A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: aminireview. *Int. Microbiol*, 191-196.

Cao, J., Wang, Y., Song, H., Meng, Q., Sheng, L., Bian, T., Mahemulti, W., Yierhali, A. Omata, M., Bi, S. (2009). Hepatitis A outbreaks in China during 2006: application of molecular epidemiology. *HepatolInt*, 3, 356-363.

Capaul, S., Gorgievski-Hrisoho, M. (2005).Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSensEasyQEnterovirusassay. *Journal of Clinical Virology*, 32, 236–240.

Cloette, T., Da Silva, E., Nel, L. (1998).Removal of waterborne human enteric viruses and coliphages with oxidized coal.*Curr.Microbiol*, 37, 23-27.

Comisión Nacional del Agua. (2007). Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, pp, 1-326.

Kondapalli, S., Skoupi, M., Parker, J., Kirby, B., Baeumner, A. (2011). Micro-total analysis system for virus detection: microfluidic pre-concentration coupled to liposome-based detection. *Anal Bioanal Chem*, 402, 315-23.

Deshpande, J., Shetty, S., Siddiqui, Z. (2003). Environmental surveillance system to track wild Poliovirus transmission. *Appl. Environ. Microbiol*, 69, 2919-2927.

Decreto No 33601-MINAE-S. (2007). Reglamento de vertido y reúso de aguas residuales. *La Gaceta No. 55*. Revisado el 10 de setiembre desde <http://faolex.fao.org/docs/pdf/cos71694.pdf>.

Fong, T.T.; Lipp, E.K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Revs*, 69, 357-371.

Gerba, C., Smith, J. (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual*, 34, 42-48.

Girones, R. (2006). Tracking viruses that contaminate environments using PCR to track stable viruses provides an effective means for monitoring water quality for environmental contaminants. *Microbe*, 1, 19-2.

Hamza, I., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 21, 424–436.

Haramoto, E., Katayama, H., Ohgaki, S. (2004). Detection of Noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating Enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl. Environ. Microbiol*, 70, 2154-2160.

Ikner LA, Soto-Beltran M, Bright KR. (2011). New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3500–3506.

Jofre, J., (2009). Is the replication of somatic coliphages in water environments significant ?. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1059-1069.

Karim, M., Rhodes, E., Brinkman, N., Wymer, L., Fout, G. (2009). New electropositive filter for concentrating Enteroviruses and Noroviruses from large volumes of water. *Appl. Environ. Microbiol*, 75, 2393-2399.

Karmakar, S., Rathore, A., Kadri, S., Dutt, S., Khare, S., Lal, S. (2008). Post-earthquake outbreak of rotavirus gastroenteritis in Kashmir (India): An epidemiological analysis. *Public Health*, 122, 981-989.

Lewis, G & Metcalf, T. (1988). Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water and Sediment Samples. *Appl. Environ. Microbiol*, 8, 1983-1988.

Li, W., Xin, W., Rui, Q., Song, N., Zhang, F., Ou, Y., et al. (1998). A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J. Virol. Meth*, 74, 99-108.

Lou, J., Ding, L., Wan, Y., Jaffrin, M. (2012). Flux decline control in nanofiltration of detergent wastewater by a shear-enhanced filtration system. *J Chem Eng*. 181-182, 397-406.

Marín, A; Osés, M. (2013). Operación y mantenimiento de plantas de tratamiento de aguas residuales con el proceso de lodos activados. Comisión Estatal del Agua Jalisco. Dirección de Operación de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales. Tomo I. pp 124.

Martínez, S., Rodríguez, M. (2005). Tratamiento de aguas residuales con *MATLAB®*. Barcelona, España: Editorial Reverté, pp 156.

Maunula, L.; Miettinen, I.T.; von Bonsdorff, C.H. (2007). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg. Inf. Dis.* 11, 1716-1721.

Méndez, L., Miyashiro, V., Rojas, R., Rojas, R., Rojas, R. (2004). Treatment of residual waters by means of activated muds, *Rev. Inst. Investing*. 7, 74-83.

Miagostovich, M., Ferreira, F., Guimaraes, F., Fumian, T., Diniz-Mendes, L., Luz, S., et al. (2008). Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol*, 74, 375-382.

Mideplan. (2010). Informe de evaluación del Plan Nacional de Desarrollo 2009. San José, Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica. Revisado el 12 de setiembre del 2014 desde <http://documentos.mideplan.go.cr/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/975e63a5-6823-4c7e-bd59-95bbf8a6deba/informe-evaluacion-PND-2006-2010-2009.pdf>.

Moya, L. (2009). Introducción a la Estadística de la salud, Segunda Edición. San Jose, Costa Rica: Editorial UCR. pp 383, 486-488, 526.

Naranjo, J. (2013). Boletín Meteorológico Mensual. Instituto Meteorológico Nacional. Costa Rica. Revisado el 30 de abril del 2015 desde http://www.imn.ac.cr/boletin_meteo/historial/2013/BMET032013.pdf.

Nasri, D., Bouslama, L., Omar, S., Saoudin, H., Bourlet, T., Aouni, M. Pozzetto, B., Pillet, S. (2007). Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol*, 45, 2370-2379.

Negróni, M. (2009). Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2a edición. (P.439-440) Ed. Médica Panamericana.

Nissen, E., Konig, P., Feinstone, S., Puli, G. (1996). Inactivation of hepatitis a and other enteroviruses during heat treatment (pasteurization). *Biologicals*, 24, 339-341.

Okoh, A., Odjajare, E., Igbinosa, E., Osode, A. (2007). Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2932-2944.

Okon, A., Sibanda, T., Gusha, S. (2010). Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. In *J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2620-2637.

Organización Mundial de la Salud. The Role of Ministries of Health in reducing disease burden due to water, sanitation and hygiene related illnesses. Revisado el 12 de octubre del 2013 desde: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/drinking_water_20120306/en/#

Organización Panamericana de la Salud. (2003). Calidad del agua potable en Costa Rica, situación actual y perspectivas. Ministerio de Salud, Costa Rica.

Palacios, G., Oberst, M. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neur. Virol*, 11, 424-433.

Paz-y-Miño, M., Barzola, C., Lazcano, C., Ponce, M., León, J. (2003). Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana en la potabilización del agua. *Rev. Peru. Biol.* 10:133–144.

Peng, T., Li, Y., Yang, Y., Niu, C., Morgan-Capner, P., Archard, L., Zhang, H. (2000). Characterization of Enterovirus isolates from patients with muscle disease in a Selenium- deficient area in China. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3538-3543.

Pillai, S.(2004). Bacteriophages as fecal indicator organisms.in: Goyal SM, ed. *Viruses in food.* Minnessota: Springer, 205-222.

Racaniello, V.(2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344, 9-16.

Ramalho, R. (1996). *Tratamiento de Aguas Residuales.* Barcelona España: Editorial Reverté, pp 3-4.

Redondo, F. (2012). Tecnología al Servicio de la Salud Pública: tratamiento de las aguas contaminadas. *Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander*, 3, 35-38.

Rezaeinejad, S., Vergara, G., Woo, C., Lim, T., Sobsey, M., Gin, K. (2014). Surveillance of enteric viruses and coliphages in an tropical urban catchment. *WaterResearch*, 58, 122-131.

Robert, M. (2014). Microorganismos indicadores de la calidad de agua potable en cuba. *CENIC CienciasBiológicas*, 44, 32-43.

Rodríguez, R., Pepper, I., Gerba, C. (2009). Application of PCR-based methods to assess the infectivity of Enteric viruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol*, 75, 297-307.

Rojas, R. (2002). *Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales. Gestión integral de tratamiento de aguas residuales. Organización Panamericana de la Salud. División de Salud y Ambiente. Organización Mundial de la Salud. Revisado el 08 de setiembre del 2014*
[desdefile:///C:/Users/usuario/Downloads/tecnologia_al_servicio_tratamiento_aguas_contaminadas_2013_03%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/tecnologia_al_servicio_tratamiento_aguas_contaminadas_2013_03%20(2).pdf).

Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana, pp 397.

Sarmiento, L., Mas, P., Goyenechea, A., Palomera, R., Morier, L., Capo, V. (2001). First epidemic of echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerg Infect Dis*;7, 887.

Savichtcheva, O & Okake, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* 40, 2463-2476.

Schwab, K., Neill, F., Le Guyader, F., Estes, M., Atmar, R. (2001). Development of a reverse transcription-PCR – DNA enzyme immunoassay for detection of “Norwalk-Like” viruses and Hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 742-749.

Sobsey, M., Battigelli, D., Shin, G., Newland, S. (1998). PT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water. Sci. Technol.* 32, 91-94.

Solano, E. (2013). Boletín Meteorológico Mensual. Instituto Meteorológico Nacional. Costa Rica. Revisado el 30 de abril del 2015 desde http://www.imn.ac.cr/boletin_meteo/historial/2013/BMET102013.pdf.

Solano, M., Chacón, L., Barrantes, K., Achí, R. (2012). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Rev. Peru. biol.* 19, 335 - 340.

Tomás, J. (2010). Fundamentos de Bioestadística y análisis de datos para enfermería. Univ. Autónoma de Barcelona: España, pp 104.

Tree, J., Adams, M., Lees, D. (2003). Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2038-2043.

Valverde, V. (2012). Análisis y propuesta de ampliación del alcantarillado sanitario y planta de tratamiento de aguas residuales en la Ciudad de Liberia-Guanacaste.

Veliz, E., Llanes, J., Asela, L., Bataller, Mayra. (2009). Reúso de aguas residuales domésticas para riego agrícola. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40, 35-44.

Williams, C., Kajander, T., Hyypiä, T., Jackson, T., Sheppard, D., Stanway, G. (2004) Integrin $\alpha 6$ is an RGD-dependent receptor for Coxsackievirus A9. *J. Virol.*, 78, 6967-6973.

Woodly, M., Cliver, D. (1997). Replication of coliphage Q beta as affected by host cell number, nutrition, competition from insusceptible cells and non-FRNA coliphages. *J. Appl. Microbiol.* 82,431-440.

Ye, X., Ming, X., Zhang, Y., Xiao, W., Huang, X., Cao, Y., Gu, K. (2012). Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. *Curr Microbiol.*, 65, 244-53.