

Genomas virales fragmentados sugieren contaminación para aguas de consumo humano

Viral genome fragments suggests contamination of human drinking water

Cristina Lenis¹, Jazmín López², Juan Carlos Ulloa², Nury Olaya², María Fernanda Gutiérrez²

Resumen

Objetivo. Determinar la presencia de rotavirus y norovirus en agua para consumo humano en una localidad de Bogotá.

Materiales y métodos. Se recolectaron ocho muestras de agua por semana en ocho lugares diferentes del predio en estudio. Para determinar la presencia del genoma viral, las muestras se ultrafiltraron y se hizo detección viral por medio de la técnica RT-PCR, amplificando un segmento del gen VP6 del rotavirus y un segmento del ORF2 del norovirus. Este estudio se llevó a cabo en una institución universitaria ubicada en una zona periurbana cercana a Bogotá, a 45 km del acueducto que surte de agua al predio. La zona se encuentra rodeada por fincas con ganado lechero, centros comerciales y cuatro cementerios. El agua se recolectó en recipientes de polipropileno. En total, fueron 64 muestras de cinco litros de agua cada una.

Resultados. La presencia viral fue de 12,5 %, encontrándose rotavirus en cuatro y norovirus en cuatro de las 64 muestras colectadas. Además de presentar la importancia de la presencia viral en agua para consumo humano, en este documento se discute el significado que tiene el encontrar solo segmentos virales y no la partícula viral completa e infecciosa.

Palabras clave: agua potable, rotavirus, norovirus

Abstract

Objective: To determine the presence of rotavirus and norovirus in drinking water in a northern neighborhood in Bogotá, Colombia.

Materials and methods: Eight weekly samples of water were collected and ultrafiltered in order to detect the viral genome presence. The technique used for detection of genome segments was RT-PCR. VP6 gene from rotavirus and ORF2 segment from norovirus were selected in order to find the virus in the water. This study was performed in a higher education institution located in a periurban zone near Bogotá, 45 km away from the aqueduct that services the area. The zone is surrounded by dairy cattle farms, malls and four cemeteries. Water was collected in clean polypropylene containers. There were a total of 64 samples of 5 liters of water each.

Results: Viral segments were found in 12.5% of the samples. We found rotavirus in four samples and norovirus in another 4. Besides discussing the importance of viral contamination in drinking water, we discussed the meaning of finding only viral segments and not complete and infectious viral particles.

Keywords: drinking water, rotavirus, norovirus

Introducción

“Agua potable, no es agua segura”, esta premisa implica que el agua, a pesar de pasar por el proceso de potabilización, continúa siendo un vehículo transmisor de microorganismos, principalmente aquellos cuyo tamaño se mide en nanómetros en vez de micras, como sucede con los virus. Se han reportado epidemias virales asociadas con agua potable, de baño y de mar y con el consumo de ostras, y asociadas a la presencia de rotavirus, norovirus, astrovirus, adenovirus, virus de la hepatitis A y enterovirus de tipo poliomielitis, Cocksackie y echo, generando enfermedades

como la gastroenteritis, lo que hace suponer que, después de la transmisión persona a persona, el consumo de agua contaminada puede ser un factor importante en su transmisión⁽¹⁻³⁾.

Se ha propuesto que existen más de 140 tipos de virus que se pueden encontrar en el agua y se ha sugerido que los tratamientos de purificación masiva no son capaces de eliminarlos. Uno de los principales problemas para verificar la inocuidad del agua después de pasar por los procesos de potabilización, radica en la poca sensibilidad que tienen los laboratorios de control de calidad para concentrar y verificar la presencia de los virus en ella⁽⁴⁻⁶⁾.

1 Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, UDCA, Bogotá, D.C., Colombia

2 Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Recibido: 15/11/2011; Aceptado: 09/05/2012

Correspondencia: María Fernanda Gutiérrez. Departamento de Microbiología, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Tel 320 8320 ext 4102, cel 310 2707567 Correo electrónico: mfgutier@javeriana.edu.co

En Colombia, existen pocos reportes en los que se documenta la presencia de virus en aguas, en uno de ellos se reporta la presencia de enterovirus en Armenia ⁽⁷⁾ y, en otros publicados en los años 2007 y 2008, por Gutiérrez, *et al.*, describen la presencia de rotavirus, astrovirus y norovirus en aguas de Facatativá y de Chocó ^(8,9). De manera simultánea, se encuentran reportes en los que se determina la prevalencia de estos mismos virus como causantes de diarrea en la población infantil, con presencia promedio de rotavirus del grupo A del 13 %, de astrovirus del 2 % y de norovirus del 10 %, lo cual coincide con los datos reportados para rotavirus y astrovirus alrededor del mundo, mientras que, para norovirus, la prevalencia fue mayor a la reportada en otros lugares del planeta ^(10,11).

La alta prevalencia de norovirus, el importante impacto de los virus entéricos en la salud pública y un imaginario de que en la población de estudio existe mayor número de diarreas que en el resto de la región, generan la necesidad de continuar llevando a cabo estudios tendientes a la búsqueda de contaminantes virales en el agua, como serían los norovirus y los rotavirus. Otro motivo más para este tipo de estudios es entender que el comportamiento epidemiológico de los norovirus en países sin estaciones como el nuestro, donde actúa de manera endémica apareciendo durante todo el año, dista mucho del comportamiento que tiene en países desarrollados donde se ha asociado con epidemias alimentarias. En los reportes colombianos se demuestra que los norovirus se mantienen de manera endémica, permanecen todo el año y su presencia puede ser mayor que la de los rotavirus ⁽¹²⁾.

Los rotavirus y los norovirus son virus desnudos, característica que les confiere resistencia al medio ambiente. Un estudio reportado por Espinoza en 2008, quien trabajó con rotavirus y astrovirus, demostró que estos virus pueden permanecer infecciosos en el agua por periodos mayores de 60 días y su ácido nucleico permanece estable por más de 30 días ⁽³⁾. Si bien ese trabajo

no incluyó datos con respecto a los astrovirus, se sabe que este también puede ser transmitido por el agua, tanto potable como de río, drenajes y aguas negras ⁽¹³⁾.

Con el objeto de continuar determinando la presencia viral en el agua para consumo, en este trabajo se buscaron segmentos de material genómico viral de rotavirus y norovirus como indicadores de contaminación. El uso de técnicas moleculares para la detección de ácidos nucleicos virales es más sensible, específico y rápido, en comparación con aquellas pruebas que buscan la detección de virus completos. Sin embargo, estas pruebas no brindan suficiente información como para saber si las partículas presentes son infecciosas o si no lo son ⁽³⁾.

Materiales y métodos

Lugar del muestreo

Se hizo un muestreo aleatorio estratificado en una institución universitaria ubicada en una zona periurbana cercana a Bogotá, que se encuentra, además, rodeada por fincas con ganado lechero, centros comerciales y cuatro cementerios. La razón por la cual se escogió ese predio, fue porque dentro de la institución se cree que en esa zona hay más diarrea que en el resto de Bogotá, dato que no se logró confirmar. Sin embargo, esta suposición la convierten en un buen lugar de muestreo, además de las características de su sistema de acueducto y obtención de agua potable.

El muestreo se hizo en ocho puntos diferentes de la institución, para obtener un total de 64 muestras. Los lugares de recolección fueron dos cafeterías, dos baños, tres laboratorios de práctica agrícola y veterinaria, y un espacio de recreación y de intercambio social. En estos lugares, las muestras se recolectaron con intervalos de 20 a 30 días, recogiendo cinco litros de agua por punto por semana, en recipientes de polipropileno limpios.

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, donde se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la concentración viral. A todas las muestras se les determinó el pH en el momento de su recolección. Los procesos que se presentan a continuación, de clarificación, purificación y concentración de virus, utilizados para este trabajo, fueron estandarizados en este mismo laboratorio y se han implementado como herramientas de trabajo desde el año 2004.

Clarificación y purificación viral

Para la concentración viral y purificación de los virus presentes en el agua, los cinco litros pasaron inicialmente por membranas clarificadoras y esterilizadoras *Millipore™* de 0,8 y 0,2 µm (*Opticam 4" Capsule Disposable Cartridge™*, pore size 0.8 y 0.2 µm, nominal) que es un sistema de filtración frontal, el cual permite retirar las impurezas presentes en el agua, como partículas suspendidas de tamaños pequeños, residuos orgánicos, etc., junto con carga microbiana de origen fúngico y bacteriano. Este proceso se realizó tres veces consecutivas para cada muestra obtenida con la ayuda de una bomba peristáltica a velocidad promedio entre tres y cuatro rpm. Para evitar la contaminación cruzada entre las muestras, se hizo un lavado de los filtros con 500 ml de agua desionizada estéril entre muestra y muestra. El volumen final obtenido después de esta filtración del agua, fue de un litro para cada muestra, el cual fue almacenado en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta el momento del proceso de concentración viral.

Concentración viral

A partir del litro obtenido de cada muestra en la clarificación, se llevó a cabo la ultrafiltración mediante un sistema de filtración tangencial y recirculante con la ayuda de una bomba peristáltica y de un filtro *Millipore™* Prep/Scale TFF con una membrana de celulosa con capacidad de retención de peso mayor de 1.000 daltons. El

volumen final de este proceso fue, aproximadamente, de 13 a 15 ml para cada muestra ⁽⁶⁾, que luego se pasaron por un tubo de centrifugación *Centriprep Ultracel YM-50, Millipore™*; se centrifugaron entre siete y ocho minutos a 5.000g. El volumen final del concentrado obtenido durante este proceso fue de 300 a 500 µl, los cuales se separaron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta la detección viral ^(8,9).

Extracción del ARN viral y determinación de la presencia de virus en las muestras

Para la extracción del ARN viral se utilizó *Trizol LS Reagent™* (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones propias del reactivo. La detección del genoma viral se inició con una retrotranscripción con la enzima *SuperScript III™* (Invitrogen) y con un iniciador aleatorio. El programa para la retrotranscripción para los dos tipos de virus, se inició colocando el tubo en el termociclador a 96 °C por cinco minutos y pasándolo a hielo por cinco minutos para la predesnaturalización del ARN, para luego continuar con el proceso de retrotranscripción que incluyó temperaturas de 25 °C por cinco minutos, de 50 °C por una hora y de 70 °C por 15 minutos, para la elongación y formación del ADN complementario (ADNAc). El ADNAc se amplificó con Taq polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil).

Los iniciadores usados para la amplificación del genoma de norovirus fueron descritos por Frankhouse y se han denominado MON 431 (TGGACIAGRGGICCYAAYCA)432 (TGGACICGYGGICCYAAYCA), 433 (GAAYCTCATCCAYCTGAA-CAT) y 434 (GAASCGCATCCARCGGAACAT) (14) los cuales amplifican una región de aproximadamente 213 pb. Para rotavirus se buscó un segmento del gen que codifica para la proteína estructural VP6, utilizando los iniciadores *VP6-Forward* (GACGGVGCRACTACATGGT) y *VP6-Reverse* (GTCCAATTCATNCCTGGTGG), correspondiente a la cápside intermedia del virus, que amplifican un segmento de 379 pb ⁽¹⁵⁾.

Las bandas se visualizaron en gel de agarosa al 1,5 % con adición de bromuro de etidio. Los controles positivos para la prueba de PCR correspondieron a muestras de materia fecal proveniente de niños menores de cinco años, previamente caracterizadas para los dos virus en el Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana. Como control negativo del ensayo, se utilizó agua cristal y, como control del procedimiento de clarificación y concentración, a 1 litro de agua cristal se le adicionó una mezcla de los dos virus, el rotavirus cultivado en la línea celular MA104 y el norovirus obtenido directamente a partir de materia fecal de niños menores de cinco años. Estos controles se utilizaron también para comprobar la ausencia de inhibidores de reacción que pudieran generar resultados falsos negativos en los ensayos.

Obtención de datos de los factores ambientales

Para obtener el registro de los factores ambientales (temperatura, precipitación y humedad) en cada fecha de muestreo, se solicitó la información al Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), y el pH se midió en el momento de la toma de las muestras con el uso de un potenciómetro portátil.

Análisis estadístico y asociación de la presencia de rotavirus con los diferentes factores ambientales

Para el análisis de datos se hizo un análisis descriptivo en el que se determinaron las medias para las variables evaluadas, según cada sitio de muestreo; además, se determinó la frecuencia con la cual el virus estuvo presente en cada punto de muestreo para establecer el porcentaje de muestras positivas del total del estudio.

Resultados

Detección de virus en las muestras de agua

Durante las ocho semanas de muestreo, la presencia viral se evidenció entre la cuarta y la séptima semana, encontrándose tanto rotavirus como norovirus. Los rotavirus se encontraron durante tres semanas, desde la quinta hasta la séptima, en cuatro lugares, un laboratorio, un baño, una cafetería y el lugar de recreación, a diferencia de lo sucedido con los norovirus, que solo se encontraron en la cuarta semana en dos cafeterías y dos laboratorios. En la tabla 1 se muestra la presencia viral por semanas y por lugares.

Tabla 1. Resultados de la presencia de rotavirus y norovirus en los sitios de muestreo. Entre las semanas 4 y 7, aparece resaltada la presencia de rotavirus o norovirus. Nótese la presencia de cada uno de los virus en cuatro semanas en distintos lugares del predio.

Sitio de muestreo	Semana de muestreo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Baño 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Cafetería 1	-	-	-	-	-	RV +	-	-
Laboratorio 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Cafetería 2	-	-	-	NV +	-	-	-	-
Laboratorio 2	-	-	-	NV +	-	-	-	-
Baño 2	-	-	-	-	-	-	RV +	-
Laboratorio 3	-	-	-	NV +	-	RV +	-	-
Cafetería 3	-	-	-	NV +	RV +	-	-	-

(-):negativo; (+): positivo; RV: rotavirus; NV: norovirus

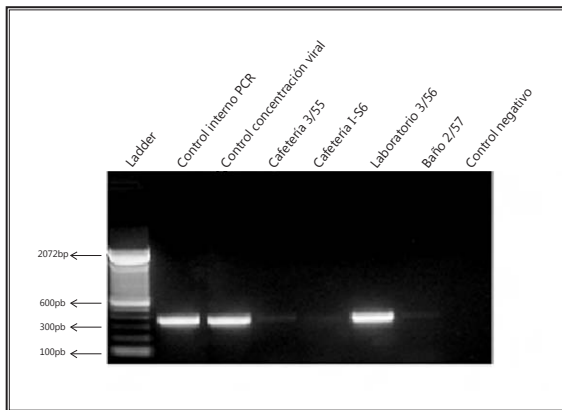


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa con muestras positivas para el genoma viral de rotavirus.

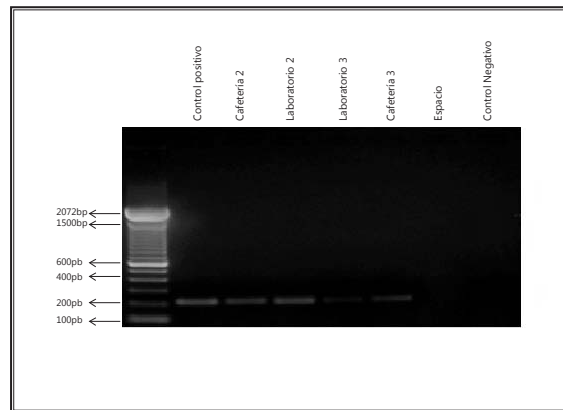


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa con muestras positivas para el genoma viral de norovirus.

En la figura 1 se puede evidenciar el corrido electroforético en gel de agarosa al 1,5 % obtenido con las muestras positivas para rotavirus del estudio junto con los controles positivos utilizados, suministrados por el Laboratorio de Virología.

En la figura 2 se puede evidenciar el corrido electroforético en gel de agarosa al 1,5 % obtenido con las muestras positivas para norovirus del estudio junto con los controles positivos utilizados, suministrados por el Laboratorio de Virología.

Reporte de factores ambientales y presencia viral

El reporte de los datos de los factores climáticos (temperatura media, humedad relativa y precipitación) suministrado por el IDEAM, fue entregado en la estación número 2120626, correspondiente a la zona norte de Bogotá, donde se desarrolló el muestreo. A partir de los datos entregados, se determinaron los valores medios obtenidos para las variables temperatura, humedad y precipitación, que fueron de 14,15 °C, 74,90 % y 70,17 mm³. Los valores semanales se pueden observar en la tabla 2. El promedio del valor del pH fue de 6,91 y en la tabla 3 se pueden observar los valores para cada sitio de muestreo.

Discusión

El riesgo intrínseco de transmisión viral por medio del agua depende de varios factores, entre los cuales están la cantidad de virus presente y la capacidad que tiene el virus de sobrevivir en ella, por periodos medianos ⁽³⁾.

En un artículo publicado por Gutiérrez, *et al.*, en el 2007, se discute el impacto de encontrar proteína viral en el agua y se concluye que la detección tanto de la proteína como del ácido nucleico son indicadores de presencia viral ⁽⁸⁾. Si bien ni la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) ni la prueba ELISA suministran información suficiente para afirmar la presencia de partículas virales infecciosas, la simple presencia de componentes virales implica la presencia de la partícula completa en algún momento dentro de la muestra. Esta afirmación se puede hacer debido a que dentro de los huéspedes de virus patógenos, como lo son estos virus entéricos, no existen portadores sanos: todo individuo infectado tiene el virus en su interior, aunque este se manifieste con muy poca sintomatología o, quizá, pase de manera asintomática. Estos virus, y en general la gran mayoría de virus ARN que infectan al hombre, cuando se encuentran en un huésped, están realizando ciclos virales, multiplicándose y comportándose de manera infecciosa. En el agua, es

Genomas virales fragmentados sugieren contaminación en aguas de consumo humano

Tabla 2. Valores promedio de los factores ambientales suministrados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales durante la época de estudio. Obsérvese la presencia viral en las semanas 4 a 7.

Semanas de muestreo	Presencia Viral	Factores ambientales		
		Temperatura (°C)	Humedad (%)	Precipitación (mm ³)
1	Negativa	14,27	71,75	0,15
2	Negativa	14,86	77,37	0,56
3	Negativa	13,65	82,37	0,67
4	Norovirus	14,42	73,00	0
5	Rotavirus	14,17	71,37	0
6	Rotavirus	13,01	70,00	0
7	Rotavirus	13,81	70,87	0
8	Negativa	15,06	82,50	0

claro que el virus no lleva a cabo ningún ciclo viral, pues el agua no tiene células permisivas. Sin embargo, la presencia del virus en el agua implica el contacto de esta con materia fecal de un huésped infectado, que podría ser bovino, porcino, canino o humano, que deposita el virus en el agua, permitiendo su dispersión.

El tiempo que estas partículas pueden permanecer en el agua depende de varios factores, como son la temperatura, el pH, la cloración, la presencia de sólidos en suspensión y la presencia de metales pesados. Con respecto a la temperatura, los virus entéricos resisten temperaturas menores de 20 °C por meses y son capaces de permanecer a temperaturas menores de 0 °C por años. En un estudio en el que recolectaron agua potable tomada del grifo, se demostró que los títulos de rotavirus humano no se reducen en un período de 64 días cuando la temperatura es de 4° C y sólo se presenta reducción de 2 logaritmos si la temperatura llega a 20 °C. Esto muestra la resistencia que tienen los virus a bajas temperaturas (16-18). Al comparar esto con los resultados obtenidos en este trabajo, se podría explicar la presencia no solo de segmentos de genoma sino de toda la partícula viral, probablemente infecciosa.

En cuanto al pH, estos virus entéricos se caracterizan por ser resistentes a pH extremos, ya que

pueden pasar por el estómago donde el pH es de 2 o 3 y luego por el intestino donde el pH tiende a la alcalinidad. Los potenciales de hidrógeno de 6 o 7, como los reportados en este trabajo, no alteran la estructura viral, lo cual lleva a explicar la presencia de genoma viral o inclusive virus completos e infecciosos.

En cuanto al cloro, sólidos en suspensión y metales pesados, parámetros que no se evaluaron en este estudio pero que son indicadores de la calidad del agua, es importante tener en cuenta que su cantidad y concentración podrían afectar la estabilidad viral y su capacidad infecciosa. La presencia de iones metálicos en el agua puede inactivar el virus por ligación de grupos donadores de electrones sobre proteínas o ácidos nucleicos, reacción en la cual se producen radicales

Tabla 3. Valores promedio del pH del agua obtenida en cada sitio de muestreo

Sitio de muestreo	Presencia viral	pH
Baño 1	Negativa	7,03
Cafetería 1	Positiva para RV	7,07
Laboratorio 1	Negativa	6,78
Cafetería 2	Positiva para NV	7,01
Laboratorio 2	Positiva para NV	6,85
Baño 2	Positiva para RV	6,88
Laboratorio 3	Positiva para RV y NV	6,61
Cafetería 3	Positiva para RV y NV	7,06

RV: rotavirus; NV: norovirus

hidroxilo. En el caso de las proteínas de la cápside del virión, el péptido estructural es afectado, la proteína pierde su estabilidad y se aumenta la vulnerabilidad del virus ante otros factores presentes en el agua ⁽¹⁹⁾.

Si bien estos factores contribuyen a desestabilizar la partícula viral, existen momentos en que la asociación de virus a los sólidos en suspensión puede contribuir a su supervivencia. Los virus adsorbidos en pequeños sólidos, incluyendo coloides, tienden a permanecer a flote por largos períodos y protegerse de la cloración durante el proceso de tratamiento del agua. Por esta razón, los virus adsorbidos a material en partículas pueden conservar su capacidad infecciosa por más tiempo que el virus libre ^(17,20,21).

En el trabajo de esta institución, el agua que surte el predio llega por el sistema de acueducto desde Bogotá y recorre, aproximadamente, 45 km desde su salida del acueducto hasta su llegada, donde es almacenada en dos tanques que se lavan dos veces al año. Hasta el 2011, no se hicieron estudios de control de calidad de este producto cuando llega al predio; sin embargo, desde siempre se ha considerado como apta para el consumo, puesto que en Bogotá había pasado por los procesos de potabilización, lo que hace suponer una baja cantidad de sólidos y de metales, un pH entre 6 y 7 y una concentración de cloro apta para consumo humano. Todas estas condiciones favorecen la presencia viral. Sin embargo, queda por explicar de dónde llega un virus entérico al agua de consumo, para lo cual se proponen dos hipótesis: la primera, por filtración en las tuberías porosas, situación que se facilita con la aparición de viviendas y barrios a lo largo del tubo madre que entrega el agua desde Bogotá hasta lugares apartados como lo es el predio que se estudió, y la segunda, podría ser que estos virus llegaron al agua antes del proceso de potabilización y éste no logró su eliminación.

En un artículo publicado por Borchardt, *et al.*, en el 2003, se demostró que los virus pueden difundirse a través de la tierra por 408 m de distancia

y 64 m de profundidad ⁽²²⁾. En un espacio como la institución donde se recolectaron las muestras, hay una actividad agropecuaria que posibilitaría la presencia de virus entéricos de origen bovino o porcino en el suelo, los cuales podrían migrar y penetrar en la tubería del agua potable. La segunda hipótesis es la presencia de virus en aguas potables, lo cual puede deberse a que los sistemas de purificación del agua no logran eliminar totalmente la carga viral, lo que permite la permanencia de algunos virus.

Parte de la discusión que se genera cuando se demuestra la presencia de virus en el agua y se trata de asociar con problemas de salud pública, es si la técnica de detección es lo suficientemente sensible y específica y si no es inhibida por las sustancias presentes en la muestra. Para superar este problema, se podría recurrir a cambiar el método de concentración del agua y a aumentar el volumen de la muestra analizada. Para ello, se propondría trabajar el método de adsorción-elución que recibe y filtra más de 10 litros, y cambiar la tradicional RT-PCR por una PCR en tiempo real, la cual, además de ser más sensible, ha sido propuesta como alternativa para trabajar virus no cultivables en células, como el norovirus (13). Teniendo en cuenta que en este trabajo no se utilizaron estas técnicas, es probable que se hayan presentado resultados falsos negativos, si la cantidad de virus presente no alcanzó a ser detectada con las pruebas utilizadas. No obstante, el haber encontrado segmentos genómicos virales en 8 de 64 muestreos, lo que significa el 12,5 %, es suficiente para aceptar la presencia de virus en el agua de consumo de este predio.

Lo último que vale la pena discutir es si el agua analizada podría estar asociada con los brotes de diarrea presentes en la población. Para responder a esta pregunta se tendría que confirmar la capacidad infecciosa de los virus y se tendría que saber si el serotipo viral presente en la muestra pertenece a un virus con tropismo humano, lo cual no se ha confirmado en este estudio. Teniendo en cuenta que la zona es semirural y

que alrededor de ella existen fincas con ganado bovino, podría pensarse en que estos virus son de origen vacuno y no humano. Para confirmar esto, deberían incluirse en trabajos posteriores, técnicas de amplificación y secuenciación de segmentos virales trabajadas con herramientas filogenéticas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, UDCA, y se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

Referencias

1. Gratacap B. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:2690-2.
2. Deetz TR, Smith EM, Goyal SM, Gerba CP, Vollet JJ, Tsai L, *et al.* Occurrence of rota-and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Wat Res.* 1984;18:567-71.
3. Espinosa A. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Wat Res.* 2008;42:2618-28.
4. Keswick BH, Gerba CP, DuPont HL, Rose JB. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47:1290-4.
5. Smith EM, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43:1440-9.
6. Soule H. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: An efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Wat Res.* 2000;34:1063-7.
7. Gonzalez M. Detección de poliovirus en aguas residuales de Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2006;8:
8. Gutierrez M. Presence of viral proteins in drinkable water –Sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? *Wat Res.* 2007;41:373-8.
9. Moreno S. Análisis filogenético de las cepas de rotavirus y virus de la hepatitis A encontradas en agua de consumo en el municipio de Quibdó, Chocó. *Biomédica.* 2009;29(2).
10. Gutierrez M. Virus diversity of acute diarrhea in tropical highlands. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006;8:17-23.
11. Gutiérrez M. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. Colombia Médica. 2005;36(Supl.1):
12. Martínez L. Etiología de la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años en la población de Quibdó. El calicivirus, un nuevo hallazgo. *Pediatría.* 2005;40:43-52.
13. Gregory J. Improved detection and quantitation of norovirus from water. *Journal of Virological Methods.* 2011;172:38-45.
14. Frankhouser R. Molecular epidemiology of Norwalk-like viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1998;178:1571-8.
15. Gouvea V. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28:276-82.
16. Panangala V, Liu I, Sun G, Worley S, Mitra A. Inactivation of rotavirus by new polymeric water disinfectants. *J Virol Meth.* 1997;66:263-8.
17. Gerba P, Rose J, Haas N, Crabtree K. Waterborne rotavirus: A risk assessment. *Water Res.* 1996;30:2929-40.
18. Raphael R, Sattar S, Springthorpe S. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol.* 1984;31:124-8.
19. Abad F, Pinto R, Diez J, Bosch A. Desinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination of low levels of chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2377-83.
20. Chalapati V, Metcalf T, Melnick J. Development of a method for concentration of rotavirus to recovery of rotavirus from estuarine waters. *Appl Environ Microbiol.* 1986;52:484-8.
21. Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:129-43.
22. Borhardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:1172-80.