



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

“Herramientas virales para la detección e identificación del origen de la contaminación fecal en desechos industriales y aguas residuales domiciliarias.”

Mg. Melina Elizabeth Barrios
Año 2019

Dirección de Tesis: Dra. Viviana A. Mbayed.

Área: Virología.

Lugar de realización: Cátedra de Virología,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Agradecimientos

- A la Dra. Viviana A. Mbayed, Directora de mi tesis doctoral, por incorporarme a su grupo de trabajo, por enseñarme y guiarme durante estos años.
- A la Dra. Dolores Blanco Fernández, a la Dra Carolina Torres, Dra. Mercedes Elizalde a la Bioq Robertina Cammarata por su ayuda incondicional y por su compañía a lo largo de todo este proceso.
- A mis compañeros de laboratorio.
- Al Dr. Pablo Power, Codirector de mi beca de finalización de Doctorado, por su guía y consejos en los experimentos tendientes a la detección de genes de resistencia a antimicrobianos en bacteriófagos y a todos los integrantes del Laboratorio de Resistencia Bacteriana, a cargo del Dr. Gabriel Gutkind, quienes me permitieron el uso de sus instalaciones y me brindaron colaboración en el desarrollo de las tareas.
- A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires por prestarme sus instalaciones para realizar mi trabajo de Tesis.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por haberme otorgado la beca de iniciación de Doctorado.
- A CONICET por haberme otorgado la beca de finalización de Doctorado.

1 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 AGUAS RESIDUALES	9
1.1.1 <i>Tratamiento de aguas residuales</i>	9
1.1.1.1 Laguna de estabilización	10
1.2 CONTAMINACIÓN VIRAL EN MATRICES HÍDRICAS.....	11
1.3 VIRUS DE TRANSMISIÓN FECAL-URINARIA /ORAL	12
1.3.1 <i>Norovirus Humano</i>	13
1.4 ANÁLISIS VIROLÓGICO DE MATRICES HÍDRICAS.....	14
1.4.1 <i>Métodos de concentración de virus</i>	14
1.4.2 <i>Detección de virus</i>	16
1.5 CONTROLES VIROLÓGICOS DE LOS PROCESOS DE CONCENTRACIÓN	17
1.6 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL.....	18
1.6.1 <i>Indicadores virales de contaminación fecal</i>	19
1.6.1.1 Bacteriófagos.....	19
1.6.1.2 Trazadores del origen de contaminación.....	20
1.7 BACTERIÓFAGOS COMO VEHÍCULOS DE DISEMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES.....	22
1.7.1 <i>Resistencia antimicrobiana</i>	23
1.7.2 <i>Genes de resistencia a β-lactámicos</i>	23
1.7.3 <i>Difusión de genes de resistencia antimicrobianos en plantas de tratamientos de Aguas residuales</i>	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GENERALES	27
2.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	27
3 HIPÓTESIS	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	30
4.2 MUESTRAS.....	30
4.2.1 <i>Aguas residuales</i>	30
4.2.2 <i>Aguas superficiales</i>	31
4.2.3 <i>Materia Fecal de Equinos</i>	31
4.3 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL.....	31
4.3.1 <i>Indicadores convencionales de calidad de agua y efluentes industriales</i>	31
4.3.2 <i>Indicadores y patógenos Virales</i>	32
4.3.2.1 Bacteriófagos	32
4.3.2.2 Virus humanos y animales.....	33
4.4 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUAS RESIDUALES Y AGUAS SUPERFICIALES	33

Índice

4.4.1	Concentración de virus en aguas residuales	33
4.4.2	Concentración de virus en aguas superficiales	34
4.4.3	Cálculo de Recuperación Viral	34
4.5	DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS	35
4.5.1	Extracción de Ácidos Nucleicos	35
4.5.2	Retrotranscripción de ARN.....	35
4.5.3	Detección de Poliomavirus humanos por nested-PCR	36
4.5.4	Detección de Poliomavirus bovino por multiplex nested PCR	39
4.5.5	Detección de adenovirus aviar por una nested-PCR	40
4.5.6	Limite de detección de nested-PCR de Poliomavirus bovino y adenovirus aviar.....	41
4.6	CUANTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS	42
4.6.1	PCR en tiempo real para Poliomavirus JC y BK.....	42
4.6.2	PCR en tiempo real para norovirus	42
4.6.3	Calculo de la concentración de Poliomavirus humanos y norovirus en las muestras de aguas residuales y superficiales	43
4.7	EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	44
4.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	44
4.9	BACTERIÓFAGOS EN LA TRANSMISIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES.....	44
4.9.1	Muestras Involucradas en el Estudio de genes de resistencia antimicrobianos	44
4.9.2	Purificación del ADN de bacteriófagos y bacterias	45
4.9.2.1	Purificación de partículas de bacteriófagos.....	45
4.9.2.2	Extracción del ADN de las partículas de bacteriófagos.....	45
4.9.2.3	Extracción del ADN bacteriano	45
4.9.2.4	Controles	45
4.9.3	Detección de <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{CTX-M}	46
4.9.3.1	Detección de <i>bla</i> _{TEM}	46
4.9.3.1	Detección de <i>bla</i> _{CTX-M} por nested PCR.....	46
4.10	SECUENCIAS VIRALES Y BACTERIANAS	48
4.11	ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	48
5.	RESULTADOS.....	49
5.1	EVALUACIÓN DE LOS INDICADORES VIRALES DE CONTAMINACIÓN EN AGUAS	49
5.1.1	Aguas residuales	49
5.1.1.1	Cuantificación de Coliformes termotolerantes y Bacteriófagos	49
5.1.1.2	Cuantificación por PCR en tiempo real de Poliomavirus humano y Norovirus	51
5.1.1.3	Comportamiento de los indicadores frente a los tratamientos a los que son sometidos los efluentes	52
5.1.1.4	Correlación entre Norovirus y los indicadores de contaminación fecal	53
5.1.2	Aguas Superficiales.....	54
5.1.2.1	Cuantificación de Coliformes y Bacteriófagos	54

Índice

5.1.2.2	Cuantificación por PCR en tiempo real de Poliomavirus humano y Norovirus.....	55
5.1.2.3	Correlación entre Norovirus y los indicadores de contaminación fecal	55
5.2	INDICADORES DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN FECAL EN AGUAS RESIDUALES Y SUPERFICIALES	55
5.2.2	<i>Poliomavirus humanos como trazadores del origen de la contaminación fecal.....</i>	<i>56</i>
5.2.3	<i>Poliomavirus Bovinos como trazadores del origen de la contaminación fecal</i>	<i>56</i>
5.2.4	<i>Adenovirus aviar como trazadores del origen de la contaminación fecal</i>	<i>58</i>
5.3	PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN AGUAS RESIDUALES	60
6	DISCUSIÓN	63
7	CONCLUSIONES.....	69
8	RESUMEN.....	70
9	BIBLIOGRAFÍA	73
10	ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	85

1 INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso fundamental para la vida, pero en ocasiones puede convertirse en el vehículo de patógenos que llegan a ella a través del vuelco de desechos de diferentes actividades humanas. Numerosos brotes de gastroenteritis virales alrededor del mundo, incluido nuestro país, han sido causados directa o indirectamente por agua contaminada, y han afectado particularmente a la población infantil. Entre los posibles escenarios para la transmisión viral se encuentran: ingesta de agua contaminada, actividades recreativas acuáticas, consumo de moluscos, frutas, vegetales y hortalizas cultivados o abonados con aguas o barros contaminados (Cheong *et al.*, 2009a)

Con el objetivo de prevenir y controlar los brotes de enfermedades transmitidas por el agua, los países establecen códigos de regulación que fijan límites máximos de contaminantes de aguas, entre ellos los microbiológicos. Debido a la gran diversidad de microorganismos patógenos implicados, no es posible su determinación individual. Por esta razón, se trabaja con microorganismos indicadores que actuarían como marcadores subrogantes de la presencia de patógenos. En Argentina, la calidad microbiológica del agua y efluentes industriales y cloacales se evalúa con indicadores bacterianos (coliformes totales, fecales, *E.coli*, enterococos)(Autoridad del Agua, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que otros agentes patógenos como los virus y protozoos presentan mayor resistencia a procesos de desinfección y una mayor estabilidad en el ambiente que las bacterias, por su constitución bioquímica y estructural (Hata *et al.*, 2013). Es decir, que un agua que cumpla adecuadamente con los parámetros bacterianos aún podría contener virus.

Dado que los indicadores fecales bacterianos no persisten en el ambiente ni luego de los tratamientos de desinfección tanto como los virus y no muestran correlaciones consistentes con éstos, se ha establecido un consenso general sobre la necesidad de utilizar indicadores microbiológicos alternativos que brinden información sobre la posible presencia de virus en las distintas matrices acuáticas. Entre los indicadores virales propuestos para evaluar la contaminación se encuentran los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) somáticos y F-específicos, los poliomavirus (PyV) y adenovirus humanos y animales(USEPA. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality).

Introducción

La EPA (Agencia de Protección Ambiental de EEUU) ha validado protocolos para la detección y enumeración de colifagos en aguas, y existen normas ISO con la misma finalidad (ISO 10751-2). Actualmente, la EPA coordina estudios multicéntricos para elaborar la recomendación de incorporación de los colifagos como indicadores virales de contaminación fecal en la normativa sobre la calidad de aguas ambientales (Nappier, 2015)(Nappier, S. P. Status of EPA's Ambient WaterQuality Criteria for Coliphage. Webinar (2015).).

Los bacteriófagos tienen la ventaja de: - estar altamente concentrados en aguas contaminadas, - ser físicamente semejantes y tener patrones de persistencia en el ambiente similares a los virus entéricos patógenos humanos, - no exhibir crecimiento en aguas ambientales y - no ser patogénicos para el hombre (Europea, C. Directiva Marco del Agua (2000/60/CE). Minist. Agric. Aliment. y Medio Ambient.). La metodología para su detección y cuantificación es de fácil implementación y realizable en los laboratorios microbiológicos convencionales. Además, la medición de viabilidad revela la capacidad infectiva de los microorganismos evaluados. Por estos motivos, se trata de una metodología fácilmente transferible a organismos de control del Estado y a las empresas, lo que les permite incorporarlos en la evaluación de los tratamientos de sus propios efluentes.

Para el análisis de la contaminación fecal de las aguas resulta de suma utilidad establecer el origen de dicha contaminación, para poder implementar medidas de control.

La EPA está evaluando la inclusión en las normativas de métodos de rastreo de la fuente de contaminación, incluyendo métodos rápidos de detección (métodos moleculares)(Nappier, S. P. Status of EPA's Ambient WaterQuality Criteria for Coliphage. Webinar (2015).). Estos permiten la identificación del origen de la fuente de contaminación, discriminando la especie animal involucrada. Se describieron distintos marcadores con esta finalidad, y los virus han resultado excelentes candidatos, dada la especificidad de especie de sus infecciones. Se ha propuesto el uso de los poliomavirus humanos y bovinos, adenovirus humano, bovino, porcino y aviar, entre otros (Motes *et al.*, 2004; Bofill-Mas *et al.*, 2013). Debido a las variaciones regionales en la circulación de estos virus es de importancia el conocimiento de la diseminación local de los mismos (Bofill-Mas *et al.*, 2013).

Para una descripción completa de la situación, es necesario el conocimiento de la circulación de virus patógenos, ya sean estos humanos o animales con capacidad zoonótica, que son volcados desde los efluentes domiciliarios y de industrias agroindustriales, para contrastarlos con las mediciones de los indicadores virales propuestos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto el foco de la atención en los virus que más frecuentemente contaminan alimentos,

Introducción

siendo las aguas de riego o cultivo contaminadas una de las principales fuentes de estos patógenos. En la propuesta de la OMS se mencionan a los norovirus y el virus de hepatitis A como los de mayor preocupación.

Por otro lado, existen preocupaciones sobre otros contaminantes emergentes en las descargas de aguas residuales de las industrias alimentarias y las aguas residuales domésticas, como son los antibióticos. Se ha demostrado que los genes de resistencia a los antibióticos (GRA) tienen orígenes ambientales y estudios recientes destacan el papel de las partículas de bacteriófagos como vehículos de diseminación de GRA en el ambiente, de acuerdo con su abundancia en aguas residuales humanas y animales, aguas superficiales y lodos (Calero-Cáceres *et al.*, 2014; Colomer-Lluch, Jofre, *et al.*, 2014). El uso incorrecto y abusivo de antibióticos en animales y humanos, especialmente betalactámicos, está contribuyendo al aumento de la resistencia a los antimicrobianos. Las plantas de tratamiento de aguas residuales se consideran puntos estratégicos para la difusión de GRA.

Las partículas de fagos que contienen GRA ingresan a estos biomas a partir de bacterias autóctonas o de la fuente de contaminación fecal (Quirós *et al.*, 2014a).

1.1 AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales son residuos líquidos cuya calidad se vio afectada negativamente por una influencia antropogénica y son potencialmente peligrosas en el caso de que sean vertidas en el ambiente sin un tratamiento previo (Sorrequieta, 2004). Los vertidos líquidos de origen industrial y líquidos cloacales humanos tienen incidencia significativa sobre la salud de las personas y la calidad ambiental. Desde el punto de vista microbiológico, podrían ser fuente de patógenos en el medio acuático, provenientes principalmente de desechos de materia fecal u orina de animales o del hombre.

Se pueden clasificar según su procedencia de la siguiente manera:

- Domésticas o urbanas: es el resultado del uso del agua en las viviendas y núcleos urbanos, así como también de comercios o lugares de trabajo. Este tipo de agua residual en especial tiene una alta carga de contaminantes orgánicos y sólidos sedimentables, así como en microorganismos.
- Industriales: son líquidos que se generan de los procesos que se llevan a cabo en el sector industrial. Este tipo de aguas poseen características específicas dependiendo del tipo de industria.
- Agrícolas y ganaderas: la mayoría de las aguas residuales del sector primario proviene de la ganadería, especialmente de la ganadería intensiva. Estas aguas son ricas en materia fecal y orina de animales.

1.1.1 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El tratamiento elegido para las aguas residuales dependerá principalmente de las características del agua cruda (afluente), la calidad requerida del agua tratada (efluente) y de su disposición final.

El proceso de tratamiento de las aguas residuales se divide en varias etapas (Generales):

- Pretratamiento: permite la eliminación de los sólidos grandes y abrasivos
- Tratamiento primario: es un tratamiento físico químico que permite reducir la materia en suspensión por medio de precipitación o sedimentación

Introducción

- Tratamiento secundario: es un tratamiento biológico que se realiza con el fin de eliminar la materia orgánica por acción de microorganismos. Consiste en la oxidación aeróbica o anaeróbica de la materia orgánica
- Tratamiento terciario: este tratamiento consiste en un proceso físico-químico que utiliza la precipitación, la filtración para reducir drásticamente los niveles de nutrientes inorgánicos, especialmente los nitratos y fosfatos.
- Desinfección: consiste, generalmente, en un proceso de cloración para reducir, inactivar o eliminar agentes patógenos.

1.1.1.1 LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN

Como se mencionó anteriormente es importante conocer los componentes del afluente para elegir el tratamiento adecuado. Para aguas residuales ricas en materia orgánica como lo pueden ser las aguas domiciliarias/urbanas o agrícola ganadera es apropiado la utilización de un tratamiento biológico como lo son las lagunas de estabilización.

Las lagunas de estabilización operan con concentraciones reducidas de biomasa que ejerce su acción a lo largo de periodos prolongados. La eliminación de la materia orgánica y de microorganismos patógenos en las lagunas de estabilización es el resultado de una serie compleja de procesos físicos, químicos y biológicos, entre los cuales se pueden destacar dos grandes grupos.

- Sedimentación de los sólidos en suspensión
- Transformaciones biológicas que determinan la oxidación de la materia orgánica contenida en el agua residual.

Proceso biológico que tiene lugar en la laguna de estabilización:



1.2 CONTAMINACIÓN VIRAL EN MATRICES HÍDRICAS

Existen más de 120 especies diferentes de virus que son excretados con las heces y orinas de humanos y animales. Éstos constituyen contaminantes del medio y convierten a las aguas residuales en potenciales fuentes de infecciones virales. Entre ellos podemos mencionar a los rotavirus, astrovirus, norovirus, adenovirus entéricos, enterovirus, virus de las hepatitis A y E y poliomavirus que han sido estudiados en los últimos años como importantes contaminantes de aguas ambientales. Estos patógenos involucrados en la transmisión fecal-oral pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta hepatitis (Theng-Theng Fong† and Erin K., 2005).

El potencial riesgo para la salud que acarrea la presencia de virus entéricos en las distintas matrices contaminadas dependerá del tipo de virus presente, de su resistencia a tratamientos de depuración, de su estabilidad, de su concentración en el ambiente, de su dosis infectiva y del uso que se le dará al recurso hídrico en particular.

Actualmente, la regulación en Argentina sobre el vertido de aguas residuales contempla la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la presencia de indicadores bacterianos como coliformes termotolerantes, *E. coli* y enterococos como parámetros de control, sin tener en consideración la detección de patógenos como los virus o los parásitos (Autoridad del Agua, 2003). La mayoría de los tratamientos aplicados a aguas residuales no consiguen eliminar la presencia de virus entéricos infectivos o de su material genético (Hata *et al.*, 2013). Por lo tanto, cursos de agua superficiales tales como mares, ríos, lagos y lagunas, donde los efluentes tratados son volcados, resultan contaminados por estos patógenos de transmisión fecal-oral (Bofill-Mas *et al.*, 2010; Blanco Fernández *et al.*, 2011; Rezaeinejad *et al.*, 2014). Además, la descarga de efluentes por poblaciones sin acceso a servicio de cloacas contribuye a la carga de virus entéricos en aguas superficiales y subterráneas

El uso de agua contaminada con fines recreativos (natación, navegación y otros deportes acuáticos) o para consumo ha ocasionado numerosos brotes causados por coxsackievirus, adenovirus (AdV), echovirus, virus de hepatitis A (HAV), astrovirus (AstV) y norovirus (NoV) (Sinclair *et al.*, 2009; Hlavsa MC, Roberts VA, Anderson AR, Hill VR, Kahler AM, 2011). Sin embargo, la exposición a agua contaminada como origen de un brote suele ser subestimada y solo puede demostrarse una fuerte asociación al detectar simultáneamente el agente etiológico viral en agua y en materia fecal de los individuos afectados (Hoebe *et al.*, 2004).

Introducción

El agua subterránea, que generalmente posee una mejor calidad microbiológica que las aguas superficiales, puede estar expuesta a la contaminación por virus entéricos provenientes de acuíferos circundantes que reciban contaminaciones debidas a filtraciones desde pozos ciegos. En este tipo de recursos hídricos, se han descrito niveles bajos o ausentes de indicadores bacterianos de contaminación fecal y la presencia de virus entéricos como adenovirus y enterovirus (Cheong *et al.*, 2009a). El tamaño pequeño de los virus entéricos (25-75 nm) permite su pasaje a través de los poros de sedimentos, son más estables en aguas subterráneas que en aguas superficiales y permanecen infectivos por periodos prolongados (Charles *et al.*, 2009; Seitz *et al.*, 2011).

1.3 VIRUS DE TRANSMISIÓN FECAL-URINARIA /ORAL

Los virus más comúnmente estudiados pertenecen a las familias Adenoviridae, Caliciviridae, Hepeviridae, Picornaviridae y Reoviridae.

Otros virus que han cobrado relevancia en los últimos años pertenecen a las familias Circoviridae; Picobirnaviridae; Parvoviridae y Polyomaviridae. (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Wilhelm *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2016; Lizasoain *et al.*, 2018).

A continuación se detalla información sobre algunos de ellos.

Adenoviridae: los adenovirus pertenecen a esta familia, son virus ADN, con un genoma de 36-38 Kb, desnudos que infectan al hombre y a un amplio rango de especies de animales (Pedrero, 2001). Las partículas víricas son resistentes a pH ácido, a la bilis y enzimas proteolíticas, lo que permite la multiplicación en el intestino humano (Allard *et al.*, 1992). Son eliminadas por largos periodos en la materia fecal, la orina y secreciones respiratorias de personas infectadas. Las vías de transmisión principales son fecal oral, a través de secreciones orgánicas y por aerosoles (Jiang *et al.*, 2001).

Picornaviridae: los géneros enterovirus y hepatovirus pertenecen a esta familia, (International Committee on Taxonomy of Viruses), carecen de envoltura y tiene un genoma de ARN simple cadena de polaridad positiva. Debido a sus características estructurales son muy estables y resistentes a los agentes físicos y químicos. La transmisión de estos virus ocurre principalmente por la ruta fecal/oral, contacto entre personas o por la ingesta de comida o agua contaminada.

Introducción

Reoviridae: los rotavirus son miembros de esta familia, tienen un genoma ARN de doble cadena de aproximadamente 18 kb. Se ha descrito la presencia de rotavirus en aguas residuales, agua de río, efluentes, sedimentos y bivalvos.

Caliciviridae y Polyomaviridae: será abordado en la sección 1.3.1 y 1.6.1.2.1, respectivamente.

1.3.1 NOROVIRUS HUMANO

NoV pertenece al género Norovirus de la familia Caliciviridae y es el agente etiológico más frecuente de gastroenteritis afectando a personas de todas las edades con 685 millones de infecciones registradas anualmente alrededor del mundo (Soller *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2016; Gibney *et al.*, 2017). Es un virus desnudo de aproximadamente 27-38 nm de simetría icosaédrica que encapsida un genoma ARN simple cadena de polaridad positiva (≈ 7.5 kb) con una proteína VPg unida covalentemente a su extremo 5'. El genoma está dividido en 3 marcos de lectura abierta (ORF, del inglés Open Reading Frame), ORF1, ORF2 y ORF3, y un extremo 3' con una cola de poliA. El ORF1 codifica para seis proteínas no estructurales, incluyendo la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP). Los ORF2 y ORF3 codifican a las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente (Lambden *et al.*, 2016). Existen 7 genogrupos de NoV (GI-GVII). Los 7 genogrupos infectan un amplio rango de especies; siendo GI, GII, GIV y GVI las que infectan principalmente a humanos (Zheng *et al.*, 2006; Vinjé, 2015). El genogrupo II es el más frecuente en humanos y en particular el genotipo GII.4 de NoV ha causado el 70-80 % de todos los brotes por NoV en Estados Unidos, Europa y Oceanía en los últimos años.

La infección por NoV tiene un periodo de incubación de entre 24 y 48 horas y se caracteriza por un comienzo agudo de náuseas, vómitos, calambres abdominales, mialgias y diarrea no sanguinolenta. Los síntomas usualmente se resuelven en 2 ó 3 días aunque la enfermedad suele ser severa en niños, individuos inmunocomprometidos y ancianos (Mallory *et al.*, 2019). La ruta fecal-oral es la forma de transmisión más importante de NoV.

La información proveniente de los países occidentales y Japón ha demostrado que los NoV son responsables del 5% al 30% de la infección asintomática en adultos (Ozawa *et al.*, 2007; Utsumi *et al.*, 2017), y que las personas asintomáticas y sintomáticas pueden propagar el virus por tres semanas.

NoV es la principal causa de brotes de gastroenteritis asociados al consumo de alimentos contaminados (Mattia and Manikonda, 2018). También es la causa más frecuente de brotes

Introducción

asociados al uso recreativo de agua contaminada por un patógeno viral (Sinclair *et al.*, 2009). En Estados Unidos, del 81 al 96 % de todos los brotes de gastroenteritis aguda no bacterianas y del 30 al 50 % de los brotes totales asociados a alimentos son atribuidos a NoV, en Europa y en Japón causa más del 85% y entre el 93 y 97% de los brotes de gastroenteritis, respectivamente (Brown *et al.*, 2012). Tanto en nuestro país como en la región, la información epidemiológica sobre la actividad de NoV a través del tiempo y los brotes causados por este agente etiológico es limitada.

1.4 ANÁLISIS VIROLÓGICO DE MATRICES HÍDRICAS

Los pasos más importantes en un análisis virológico en muestras ambientales son: la toma de muestra, la concentración viral, la eliminación de inhibidores que puedan interferir en las técnicas utilizadas para la detección cualitativa o cuantitativa, y la detección específica de virus.

La concentración y detección de virus en matrices hídricas es particularmente problemática debido a la variabilidad de recuperación de virus diferentes, a la calidad analítica y microbiológica de la muestra y los métodos utilizados.

1.4.1 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS

A menudo, los virus se encuentran en el ambiente y en alimentos en baja concentración, constituyendo una limitación para los métodos de detección viral en estas matrices. Por este motivo, la aplicación de procesos de concentración viral previos a la detección es un paso indispensable.

El objetivo de la concentración viral es obtener la mayor cantidad de virus presentes en la muestra (agua, efluentes cloacales, alimentos, sedimentos, etc.) en el mínimo volumen posible.

Podemos considerar un buen método de concentración aquel que: - es reproducible, - tiene una tasa de recuperación alta, -permite concentrar una amplia variedad de virus, - es sencillo, - es rápido, - permite procesar volúmenes grandes de muestra, - el volumen final del concentrado es pequeño.

Los métodos de concentración se basan en las propiedades físicas y químicas de los virus, como son la carga iónica, el tamaño de la partícula viral, la densidad y el coeficiente de sedimentación.

Introducción

La elección del método de concentración de virus es dependiente de la matriz con la que se quiera trabajar. Una de las principales variables es el nivel de contaminación de la matriz y, por lo tanto, la concentración de virus. Cuando se trabaja con matrices con muy baja contaminación es necesario procesar volúmenes más grandes de muestra, para lograr al final del proceso una concentración de virus que supere el límite de detección o cuantificación de los métodos que se acoplen luego.

Existen distintos métodos de concentración de virus en aguas y alimentos entre los que se encuentran la adsorción-elución; ultrafiltración; ultracentrifugación; floculación; precipitación con polietilenglicol (PEG) (Wyn-Jones and Sellwood, 2001).

El método de **adsorción-elución**, se fundamenta en el contacto entre los virus y una matriz sólida en condiciones definidas de pH y fuerza iónica para que ocurra la adsorción viral a dicha matriz y luego se utiliza un eluyente que permite que el virus se desprenda de la matriz y sea recuperado en un volumen pequeño. Se lo utiliza como un método de concentración primaria (Katayama *et al.*, 2002).

La **ultracentrifugación** se basa en la aplicación de una elevada fuerza centrífuga durante un período de tiempo, permitiendo de esta manera que las partículas virales sedimenten y se concentren formando un *pellet* en el fondo de los tubos, pudiendo separarlos del líquido sobrenadante. Este *pellet* es resuspendido luego en unos pocos mililitros. Una característica de este método es que es un proceso no selectivo, permite concentrar todos los virus presentes en la muestra. Otra característica a destacar es que no introduce factores de inhibición (adicionales a los presentes en las muestras) para los métodos moleculares de detección, como la PCR. Se utiliza como método de concentración en aguas muy contaminadas, como aguas residuales domésticas e industriales, debido a que no permite procesar grandes volúmenes de muestras. Por lo tanto, no es un buen método para concentrar virus en aguas superficiales o de consumo, pero es útil en cambio para aguas residuales. (Prata *et al.*, 2012)

En el caso de la concentración por **floculación** los virus son adsorbidos a los flóculos y separados por centrifugación. El proceso se basa principalmente en las interacciones electroestáticas de la superficie de los virus y la de los flóculos. Estas interacciones dependen de varios factores como el punto isoeléctrico de las partículas virales, el pH de la muestra y la concentración de sales [43]. Este método es muy utilizado para la concentración de virus de muestras de aguas ambientales y de consumo, debido a que logra procesar grandes volúmenes de agua. Una de las desventajas es que concentra sustancias inhibitorias de la PCR junto con las partículas virales.

La **ultrafiltración tangencial** es un tipo de filtración por membrana, en la que se retiene partículas suspendidas en el líquido en función de su tamaño y del tamaño que tiene el tamiz elegido. Utiliza un flujo tangencial, el que pasa a velocidad por las membranas generando una diferencia de presión, forzando a que las partículas menores al MWCO (*molecular weigh cut off* o punto de corte) pasen a la solución de filtrado, mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas. Este método con la elección adecuada del tamaño de poro de la membrana puede asegurar que las partículas virales queden retenidas en la solución de alimentación la que es recirculada por el dispositivo hasta obtener un volumen deseado del concentrado (Rajal *et al.*, 2007). Este método es utilizado para la concentración de virus en aguas ambientales y de consumo, matrices que requieren del procesamiento de grandes volúmenes de muestra.

El método de **precipitación con PEG** se basa en la formación de dos fases una acuosa y otra polimérica en la que son retenidas las partículas víricas (Lewis and Metcalf, 1988; Poma *et al.*, 2013). Este método ha sido utilizado para la concentración de efluentes cloacales y de aguas ambientales muy contaminadas.

1.4.2 DETECCIÓN DE VIRUS

Existen diversos métodos por los que se pueden detectar e identificar virus: microscopía electrónica, cultivo, detección de ácidos nucleicos y proteínas virales. La observación directa por microscopía electrónica es una técnica compleja y presenta una baja sensibilidad por lo que no es adecuada para su utilización en muestras hídricas. El método de cultivo virológico sobre células permite mostrar la infectividad de las partículas virales presentes en las muestras, pero la gran desventaja de este método es que no todos los virus pueden propagarse en cultivo. La utilización de test inmunológicos para la detección de antígenos en muestras ambientales no es recomendable debido a la baja sensibilidad de estos. Actualmente, los métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos son los más usados debido a su sencillez, a su sensibilidad y a la posibilidad de caracterizar distintas cepas virales, lo cual brinda información epidemiológica molecular. Los métodos moleculares se basan en la amplificación de ácidos nucleicos mediante diferentes técnicas, entre ellas PCR o RT-PCR de punto final o PCR en tiempo real (qPCR). Las desventajas observadas con estos métodos incluyen la susceptibilidad de las reacciones enzimáticas a la presencia frecuente de inhibidores en los concentrados virales y la falta de información que estos análisis proveen sobre la infectividad de los virus presentes en la muestra.

1.5 CONTROLES VIROLÓGICOS DE LOS PROCESOS DE CONCENTRACIÓN

La eficiencia de la concentración y/o extracción de virus depende principalmente de la matriz con la que se trabaje. En el caso de trabajar con matrices hídricas, se observa una alta variabilidad entre procesos, esto se debe a que las matrices son distintas entre sí. A su vez, la presencia de inhibidores interfiere en la detección y cuantificación de los virus. Por esto es necesario incluir controles virales internos que permitan evaluar la eficiencia de recuperación viral (Pettersson *et al.*, 2015).

Los controles virales internos permiten evaluar integralmente el proceso de análisis de la contaminación viral. Estos controles deben estar naturalmente ausentes en las muestras a estudiar, ser diferenciables de los virus a evaluar, pero tener comportamientos semejantes a ellos. Además deben cuantificarse fácilmente mediante la medición de la infectividad y de ácidos nucleicos.

Se ha reportado el uso de bacteriófagos (Rajal *et al.*, 2007; Poma *et al.*, 2013), adenovirus humanos recombinantes (rAdVs) (Blanco Fernández *et al.*, 2017) y virus animales relacionados con virus patógenos humanos, como sustitutos de virus entéricos humanos (Jones *et al.*, 2014).

Uno de los virus elegidos como control interno del proceso de análisis de contaminación viral es el bacteriófago PP7. Tiene un genoma ssRNA de polaridad positiva (aproximadamente 3500 nt) y pertenecen a la familia de los *Leviviridae* y su hospedador es *Pseudomonas aeruginosa* (Ceyssens and Lavigne, 2010). Las ventajas de usar bacteriófagos como virus control son, por un lado, sus características bio- fisicoquímicas similares a los virus entéricos humanos, como su pequeño tamaño y la ausencia de envoltura y, por otro lado, su seguridad y simplicidad en la producción de stocks virales de trabajo y su fácil cuantificación mediante la medida de infectividad.

Los rAdVs también pueden ser usados como virus de control. Estos son virus ADN, no replicativos porque carecen del gen E1, una región genómica involucrada en la transcripción de genes virales y esenciales para su replicación. Los rAdV solo se pueden cultivar en la línea celular 293A, que posee la región E1 integrada en su genoma (He *et al.*, 1998). La ventaja de usar rAdVs como virus control son sus propiedades fisicoquímicas similares a los patógenos virales humanos con genoma ADN y sus características no replicativas en condiciones convencionales.

La utilización de estos dos virus como control de proceso permitiría evaluar el comportamiento de virus con genoma ADN y ARN en el proceso de análisis de la contaminación viral.

1.6 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Existe una gran dificultad para determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en el proceso de contaminación ambiental, por este motivo se utilizan indicadores. Estos, son microorganismos que tienen un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a su concentración en las aguas y su reacción frente a factores ambientales, pero son detectados e identificados de manera más fácil, rápida y económica (Iván *et al.*, 2010).

Estos indicadores microbiológicos pueden ser utilizados para valorar la calidad de los vuelcos de aguas residuales domésticas, industriales y agrícola/ganadero, de sedimentos y de aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. No existe un indicador universal, por lo que se debe seleccionar el más apropiado para la situación específica en estudio (Luby *et al.*, 2008; Larrea-murrell *et al.*, 2013).

Entre los principales microorganismos que se utilizan como indicadores de contaminación fecal se puede mencionar a los Coliformes totales y termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos (American Public Health Association *et al.*, 1999; Autoridad del Agua, 2003; Rossen *et al.*, 2008). Son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal, tanto en hombres como animales homeotermos. Existen numerosas limitaciones asociadas con la aplicación de estas bacterias como indicadores, como su escasa supervivencia en cuerpos de agua y fuentes no fecales, su habilidad para multiplicarse en aguas que contengan gran cantidad de materia orgánica, así como también no permitir la identificación del origen de la fuente de contaminación humano o animal. Además no reflejan la presencia de contaminación viral, probablemente esto se debe a que los virus son más resistentes que las bacterias, no sólo en el ambiente sino también frente a procesos de desinfección o depuración (Hata *et al.*, 2013).

En Argentina, la calidad microbiológica del agua residual doméstica, industrial y agrícola/ganadera se evalúa con indicadores bacterianos. La regulación de la provincia de Buenos Aires establece que el límite máximo admisible de coliformes fecales en efluentes es de 2000 NMP/100 ml para el volcado a un cuerpo de agua superficial (río, lago, etc.) y 20000 NMP/100 ml para el volcado a mar abierto (Decreto 674/89/ Disposición 79179/90-Nación, Resolución 389/1998-Provincia de Buenos Aires).

1.6.1 INDICADORES VIRALES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Actualmente las regulaciones sobre calidad microbiológica en nuestro país no contemplan la detección de agentes virales. Sin embargo, como hemos mencionado en la sección 1.6, los indicadores bacterianos no son capaces de reflejar la contaminación viral. Por lo tanto, se ha establecido un consenso general sobre la necesidad de utilizar indicadores microbiológicos alternativos que brinden información sobre la posible presencia de virus en las distintas matrices hídricas.

Es deseable que un virus designado como indicador sea de alta prevalencia/incidencia en la población, que pueda ser recuperado del medio ambiente, que no presente fluctuaciones estacionarias, que no esté controlado mediante programas de vacunación y que tenga especificidad de hospedador (permitiendo identificar la fuente de contaminación humana o animal).

Entre los indicadores virales propuestos para evaluar la contaminación se encuentran los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) Somáticos, F-específicos, bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis*, los poliomavirus (PyV) humanos y animales (Bofill-Mas *et al.*, 2000; Andilara *et al.*, 2006; Nappier S., 2015; Torres *et al.*, 2016), enterovirus y adenovirus.

1.6.1.1 BACTERIOFAGOS

Los bacteriófagos son virus que infectan exclusivamente bacterias, contienen una cápside y su genoma puede ser ADN o ARN. Debido a su similitud física y genómica con los virus entéricos humanos, a su abundancia en aguas residuales y a que son fácilmente detectables mediante métodos sencillos, varios bacteriófagos han sido sugeridos como indicadores virales. Estos incluyen colifagos somáticos (Borrego *et al.*, 1991; Rezaeinejad *et al.*, 2014; Yahya *et al.*, 2015) y colifagos F específicos (Havelaar A. H. and Pot-Hogeboom W. M., 1988; Havelaar *et al.*, 1993; Donnison and Ross, 1995; Haramoto *et al.*, 2015), que infectan *Escherichia coli* y otras especies emparentadas, y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* (Payan *et al.*, 2005).

Los colifagos somáticos son un grupo heterogéneo de bacteriófagos (pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*) que inician la infección uniéndose a receptores ubicados en la pared celular de los hospedadores. Suelen replicar en bacterias que colonizan el aparato digestivo de animales con sangre caliente, por lo que se detectan con altos

Introducción

recuentos en desechos fecales. Estos fagos también pueden replicarse en medios acuáticos con contaminación fecal.(IAWPRC, 1991).

Los colifagos de ARN F-específicos (F-ARN) son un grupo reducido de fagos que pertenecen a la familia *Leviviridae* y que comprenden un genoma de ARN monocatenario y una cápside icosaédrica, con una morfología similar a la de los picornavirus. Los F-ARN se unen específicamente al F-pilus, una estructura apendicular en la superficie bacteriana, siendo la más estudiada la de *E. coli*. Los F-pili se producen solo cuando la *E. coli* crece a temperaturas superiores a 30 ° C (Havelaar A. H. and Pot-Hogeboom W. M., 1988). En los países templados, las aguas naturales rara vez alcanzan esta temperatura, por lo que los F-ARN pueden ser indicadores más confiables que los colifagos somáticos ya que a temperaturas inferiores a 30°C las bacterias no exhibirán el F-pili, y los F-ARN no podrán adsorberse y replicar. Por esta razón, a diferencia de los fagos somáticos que pueden infectar a las bacterias en el ambiente, el uso de fagos F-ARN como indicadores alternativos de contaminación fecal no daría lugar a sobreestimaciones en el recuento.

En general la presencia de colifagos en las matrices hídricas es un índice de contaminación fecal y, por lo tanto, de la posible presencia de virus entéricos y de otros agentes patógenos.

1.6.1.2 TRAZADORES DEL ORIGEN DE CONTAMINACIÓN

1.6.1.2.1 Poliomavirus humanos y bovinos

Los *Polyomaviridae* constituyen una familia de virus de ADN que infectan diferentes especies de vertebrados, incluidos roedores, aves, conejos, ganado, humanos y primates no humanos. Los miembros de esta familia presentan un genoma de ADN súper enrollado y covalentemente cerrado, de doble cadena circular, de aproximadamente 5,000 pb. Los poliomavirus son altamente específicos para su huésped, y todos los miembros comparten una organización similar. El genoma se puede dividir en tres regiones funcionales: la región temprana que codifica proteínas reguladoras implicadas en la replicación del ADN viral y la expresión génica, la región tardía que codifica las proteínas de la cápside, y la región no codificante que comprende el origen de los elementos de control de la replicación y la transcripción (Nasimul Ahsan, 2006).

Se han descrito alrededor de 80 especies de PyV y algunas de ellas infectan a humanos: BK virus (BKPyV), JC virus (JCPyV), KI virus (KIPyV), virus WU (WUPyV), virus Merkel-Cell (MCPyV), poliomavirus humanos 6 (HPyV6), 7 (HPyV7), 9 (HPyV9), 12 (HPyV12), virus Trichodysplasia

Introducción

Spinulosa (TSV), poliomavirus Malawi (MWPyV), poliomavirus Saint Louis (STLPyV) (Minutilli and Mulè, 2016) y New Jersey PyV (NJPyV) (Allander *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2014).

Las infecciones por HPyV son de alta prevalencia y persistentes en la población y ocurren principalmente de forma subclínica. Las manifestaciones clínicas suelen asociarse mayormente a poblaciones con inmunosupresión. Las partículas virales pueden ser excretadas en la orina, las heces, o por piel (Kassem *et al.*, 2008; Feltkamp *et al.*, 2013; Korup *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016), dependiendo del tipo de poliomavirus.

Se han descrito tres especies de Poliomavirus bovinos (BoPyV) 1, 2 y 3. Estudios previos han demostrado que el ganado se encuentra infectado con al menos una especie de BoPyV (Hundesá *et al.*, 2010; Peretti *et al.*, 2015). El BoPyV1 se ha utilizado como marcador ambiental para la detección de la contaminación generada por los desechos del ganado bovino debido a su alta prevalencia. (Wong K1; Xagorarakí I.; Bofill-Mas *et al.*, 2013; Rusiñol *et al.*, 2014). Se desconoce si otras especies de poliomavirus son endémicas en el ganado.

BPyV no causa patogenicidad significativa en el ganado y aún no se ha atribuido ninguna enfermedad al agente (Nairn *et al.*, 2003)

Diferentes estudios han demostrado que los PyVs son frecuentes en aguas residuales y en otros ambientes acuáticos en todo el mundo, lo que aumenta la posibilidad de transmisión por el agua (Fratini *et al.*, 2014). Por este motivo, han sido propuestos como indicadores de contaminación viral en vertidos cloacales y en aguas de consumo (Bofill-Mas *et al.*, 2010; Rusiñol *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2016).

1.6.1.2.2 Adenovirus aviar

Los adenovirus de aves de corral (AdV aviar) pertenecen al género *Aviadenovirus*, familia *Adenoviridae*. Son virus que afectan a las aves principalmente a pollo, patos, gansos y pavos entre otros. Se agrupan en 5 especies diferentes (AdV-A a AdV-E) (Hess, 2000). Los virus de este género tienen una distribución mundial y es común encontrar más de una especie en las granjas (www.ivami.com).

Los AdV aviarios son virus de ADN de doble cadena no envueltos que varían en tamaño desde 70 a 100 nm de diámetro. Las proteínas estructurales principales son el hexón y la fibra, que está unida de manera no covalente a la base de pentón (Pitcovski *et al.*, 1998).

Introducción

El virus se transmite horizontalmente por la vía oro-fecal y verticalmente. Se excreta en altos títulos en la materia fecal de las aves sanas o enfermas. En general las infecciones causadas por las especies de adenovirus son subclínicas, sin embargo pueden cursar con enfermedad. Los signos clínicos más comunes son: hepatitis por cuerpos de inclusión, síndrome de hidropericardio, enteritis hemorrágica, síndrome gota de huevo (Hess, 2000).

1.7 BACTERIÓFAGOS COMO VEHÍCULOS DE DISEMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES

Como mencionamos en las secciones anteriores, el estudio de los virus en el ambiente puede ser llevado a cabo considerando a los mismos como patógenos (de humanos o animales) o como indicadores de contaminación (virus humanos, animales o bacteriófagos). En el caso particular de los bacteriófagos, se conoce que cumplen otros roles en el ambiente. Pueden actuar, por un lado, como reguladores de las poblaciones bacterianas, y por otro como agentes transmisores de información genética entre bacterias.

En esta sección se planteará el rol de los bacteriófagos como vehículos de diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos en los residuos industriales y domésticos.

Los fagos infectan a las bacterias e incorporan su genoma viral en el genoma del hospedador, replicándose como parte del hospedador (ciclo lisogénico), o se multiplican dentro de la célula hospedadora antes de liberar nuevas partículas de fago (ciclo lítico). Pueden actuar como vectores para el intercambio genético a través de la transducción generalizada o especializada, o mediante la recientemente descrita transducción lateral, (Chen *et al.*, 2018) por lo que las partículas del fago llevan un rasgo genético desde una célula bacteriana donante a una célula receptora. La transducción generalizada implica la transferencia de cualquier porción del genoma del donante a la célula receptora, ya sea por un fago lítico o lisogénico (temperado), mientras que la transducción especializada involucra solo fagos temperados, en los que unos pocos genes donantes específicos pueden transferirse a la célula receptora. Un fago de transducción especializada produce partículas que transportan tanto el ADN cromosómico como el ADN del fago y contiene solo regiones específicas del cromosoma bacteriano ubicadas de forma adyacente al sitio de inserción del profago. Algunos fagos temperados también pueden inducir un cambio en el fenotipo del huésped infectado, a través de un proceso conocido como conversión lisogénica (Brabban *et al.*, 2005). A través de estos mecanismos, los fagos

Introducción

desempeñan un papel importante en la evolución y ecología de las especies bacterianas, ya que tienen el potencial de transferir material genético entre bacterias. A su vez los fagos pueden actuar como reservorio de genes bacterianos en el ambiente, ya que presentan una mayor resistencia que las bacterias y que el ADN libre.

Por estos motivos se sugiere que los bacteriófagos jugarían un papel importante en la emergencia y dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) (Balcazar, 2014; Larrañaga *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Diferentes trabajos han demostrado la presencia de GRA en el ADN de fagos de muestras de aguas superficiales, así como también en la fracción de fagos (Marti *et al.*, 2014) extraídos de diferentes efluentes (hospitales y zonas urbanas). La transferencia de estos genes a cepas de *E. coli* susceptibles fue demostrada (Colomer-Lluch, Calero-Cáceres, *et al.*, 2014).

1.7.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los antimicrobianos son medicamentos esenciales para la salud humana y la salud animal. Sin embargo, la aparición, desarrollo y propagación constantes de agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos son un motivo de creciente preocupación en todo el mundo (Hawkey, 2008). Los mecanismos involucrados en la evolución de la resistencia incluyen la transferencia horizontal de genes y la integración de genes de resistencia a antibióticos en plásmidos y otras plataformas genéticas, y eventos fortuitos tales como las mutaciones que pueden desempeñar un papel importante en las trayectorias evolutivas seguidas por cepas resistentes a los antibióticos (Galán *et al.*, 2013).

1.7.2 GENES DE RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS

La baja toxicidad de los β -lactámicos y el amplio espectro de acción los convierte en uno de los antibióticos más usados, por lo que la propagación de la resistencia a los β -lactámicos constituye una preocupación clínica importante. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. En las bacterias gramnegativas la resistencia a los β -lactámicos está originada por varios mecanismos, pero el más importante, por su frecuencia y eficacia, es la hidrólisis enzimática. Este mecanismo implica la inactivación de estos antibióticos como

Introducción

consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de β -lactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos.

En la actualidad, han sido reportadas más de 1.300 β -lactamasas. Estas enzimas se han clasificado según sus secuencias de aminoácidos o a sus propiedades de inactivación frente a diferentes clases de β -lactámicos (Bush and Fisher, 2010). Algunas son específicas para penicilinas (es decir, penicilinasas) o cefalosporinas (es decir, cefalosporinasas), mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos β -lactámicos, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). En la tabla 1 se muestra la clasificación estructural y funcional.

Si bien se han asociado los genes de todas las clases de β -lactamasas a los fagos ADN en el ambiente, las que se detectaron con mayor frecuencia son CTX-M, TEM y SHV.

Las β -lactamasas CTX-M son BLEE que hidrolizan cefotaxima y ceftriaxona y también otros sustratos como ceftazidima, ceftriaxona o cefepime. Se conocen actualmente más de 200 tipos de CTX-M, entre variantes plasmídicas y cromosómicas. Se encuentran agrupadas en 5 clusters, siendo *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-25} las propuestas como representantes de cada uno (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>).

Este tipo de BLEE son cada vez más predominantes en todo el mundo, pero con una epidemiología particular para los distintos tipos de enzima (Cantón and Coque, 2006; Cantón *et al.*, 2012).

Por otro lado las β -lactamasas TEM, se encuentran representadas por más de 250 alelos (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). Estas variantes pueden tener diferente actividad y espectro de inhibición. Las variantes de espectro extendido más comunes en Argentina son las *bla*_{TEM-10} y *bla*_{TEM-12} (Paterson *et al.*, 2003). EL tipo *bla*_{TEM-1}, se encuentra con mucha frecuencia, pero no es BLEE, sino una betalactamasa común.

Tabla 1: Clasificación de las β -lactamasas bacterianas más prevalentes a nivel mundial según Bush-Jacoby.

Grupo funcional	Clase molecular	Sustrato distintivo	Enzimas representantes
1	C	CEFALOSPORINAS	AmpC de enterobacterias
2a	A	PENICILINAS	PC1 y otras penicilinas de estafilococos
2b	A	PENICILINAS Y CEFALOSPORINA	TEM-1, TEM-2, SHV1
2be	A	CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y MONOBACTÁMICOS	BLEE-TEM, BLEESHV, CTX-M y PER
2br	A	PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS	TEM Resistentes a Inhibidores (IRTs)
2ber	A	PENICILINAS, CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y MONOBACTAMES	Mutantes Complejas de TEM (CMTs)
2c	A	CARBENICILINAS	PSE-1 CARB-3
2d	D	CLOXACILINA	OXA-1, OXA-10
2de	D	PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	OXAs de espectro extendido
2df	D	CARBAPENEMES	OXA-23, OXA-48
2e	D	CARBAPENEMES, CLOXACILINA, OXACILINA	CepA
2f	A	CARBAPENEMES	KPC-2, IMI-1, SME-1
3	B	CARBAPENEMES	IMP, VIM

Modificado de Bush, K., Jacoby G. A., *Updated Functional Classification of β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2010.*

1.7.3 DIFUSIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS DE TRATAMIENTOS DE AGUAS RESIDUALES

Las plantas de tratamiento de aguas residuales desempeñan un papel central en la diseminación de los genes de resistencia a los antimicrobianos (Rizzo *et al.*, 2013). La razón principal de esto es la gran cantidad de bacterias y otros microorganismos que se vuelcan de distintas fuentes de contaminación en estas. No solo las bacterias pasan a través de las plantas, sino también una diversidad de genes de resistencia en varias formas, bacterias resistentes capaces de conjugación, plásmidos / ADN libres y partículas de fagos, lo que permite una alta probabilidad de transferencia de genes dentro de esta comunidad bacteriana (Rizzo *et al.*, 2013; Marti *et al.*, 2014).

Introducción

La transferencia horizontal de genes contribuye de manera importante a la evolución de los genomas bacterianos y puede facilitar la diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos entre los reservorios ambientales y los patógenos potenciales. Sin embargo, la contribución a la resistencia en patógenos humanos, en las plantas de tratamiento de aguas residuales, sigue siendo poco conocida.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo es estudiar la contaminación virológica en muestras de aguas superficiales y en efluentes cloacales e industriales.

Para ello, se pretende estudiar distintos roles que podrían cumplir los virus en estas matrices acuosas: como patógenos humanos, como indicadores de contaminación y como agentes de diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos entre bacterias.

De manera más detallada, los objetivos generales son:

Evaluar parámetros microbiológicos alternativos a los convencionalmente utilizados para el análisis de matrices acuosas, como bacteriófagos y virus humanos y animales, para su utilización como indicadores virales de contaminación, estudiando su correlación con los indicadores convencionales y la presencia de patógenos virales.

Estudiar la contribución de los bacteriófagos en la diseminación de los genes de resistencia a antimicrobianos en las aguas residuales.

Contribuir, mediante el empleo de los parámetros propuestos de calidad microbiológica en el análisis de aguas, a preservar la salud humana y ambiental.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar indicadores virales de contaminación fecal en distintas matrices hídricas (aguas superficiales, residuos cloacales e industriales relacionados a la producción de alimentos de origen animal) mediante distintos acercamientos experimentales: métodos de cultivo para recuento de virus viables, métodos moleculares de cuantificación de genomas virales.
- Utilizar indicadores virales y bacterianos para evaluar la eficacia de distintos tipos de tratamientos de efluentes cloacales e industriales.

Objetivos

- Desarrollar una metodología para la detección de virus específicos de especie (humanos y de diferentes especies animales), que puedan utilizarse como indicadores de contaminación y trazadores del origen de la contaminación microbiana.
- Estudiar la correlación de los resultados de los diferentes indicadores virales propuestos, las mediciones bacterianas convencionales y la presencia de virus patógenos humanos.
- Realizar un estudio exploratorio de la contribución de los bacteriófagos en la diseminación de resistencia a antibióticos en distintos ámbitos, investigando la presencia de genes de resistencia a antibióticos en la fracción viral de efluentes cloacales domiciliarios y de efluentes de industrias dedicadas a la producción animal para el consumo alimentario.

3 HIPÓTESIS

Este trabajo de tesis propone las siguientes hipótesis:

- Que los virus serían patógenos importantes en las infecciones gastrointestinales causadas al hombre y animales, siendo el agua un vehículo frecuente en su transmisión. Por su resistencia en el ambiente y frente a distintos tratamientos, la contaminación con estos microorganismos podría ocurrir aún frente a una buena calidad bacteriológica de las aguas. La incorporación de un indicador viral de contaminación fecal podría tener una mejor correlación con patógenos virales que los actuales indicadores bacterianos.
- Que la contaminación fecal o urinaria del ambiente proviene de distintos orígenes, siendo importantes fuentes de contaminación: - los residuos domiciliarios recogidos por sistemas cloacales y - los residuos industriales de producción de alimentos de origen animal.
- Sabiendo que la relación entre los virus y sus hospedadores tiene una alta especificidad de especie, la identificación de virus provenientes de una especie animal, que fueron excretados por vía fecal o urinaria, indicaría el origen de la contaminación en una determinada muestra.
- Que en las muestras con contaminación fecal, los bacteriófagos estarían presentes con alta probabilidad y algunos de ellos podrían ser agentes de diseminación de resistencia a los antibióticos entre bacterias.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO

La estrategia experimental aborda el estudio de la contaminación viral del ambiente, especialmente el acuático con influencia antrópica. Para ello se propuso el desarrollo y utilización de metodologías que permitan evidenciar o cuantificar la presencia de virus indicadores de contaminación fecal o urinaria, virus indicadores del origen de la contaminación y de virus patógenos en efluentes y aguas superficiales. Las correlaciones de las mediciones virales y los parámetros convencionales evaluarán el comportamiento de los indicadores virales en distintos tipos de aguas. Se estudiaron también otros roles que cumplen los virus en el ambiente: la contribución de los bacteriófagos a la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana.

4.2 MUESTRAS

4.2.1 AGUAS RESIDUALES

Entre agosto de 2015 y febrero de 2018, fueron recolectados un total de 52 muestras de afluentes crudos, sin tratamiento, que ingresan a las plantas y efluentes ya tratados, a la salida de las plantas de tratamiento de líquidos cloacales humanos y de residuos de industrias vinculadas a la producción o procesamiento de ganado bovino, aves de corral, cerdos, equinos y productos lácteos, localizadas en la provincia de Buenos Aires. Estas plantas efectúan tratamientos primarios (eliminación física de sólidos) y tratamientos secundarios (procesos biológicos anaeróbicos o aeróbicos en lagunas o tanques).

Se tomaron cuatro alícuotas de las muestras:

- 50 ml destinados a la concentración de partículas virales por ultracentrifugación tangencial seguida de la detección correspondiente.
- 10 ml destinados a la medición de los parámetros bacteriológicos
- 10 ml destinados a la cuantificación de bacteriófagos

Materiales y Métodos

- 50 ml de los afluentes destinados a la detección de los genes de resistencia a antimicrobianos en la fracción bacteriana.

4.2.2 AGUAS SUPERFICIALES

Durante el periodo de diciembre 2017 a febrero 2018 se recolectaron semanalmente muestras de un punto del Río de La Plata correspondientes a la playa Bagliardi, situada en la ciudad de Berisso, provincia de Buenos Aires.

Se tomaron tres alícuotas de las muestras:

- 10 litros destinados a la concentración de partículas virales por ultrafiltración tangencial seguida de la detección correspondiente
- 100 ml destinados a la medición de los parámetros bacteriológicos
- 10 ml destinados a la cuantificación de bacteriófagos

4.2.3 MATERIA FECAL DE EQUINOS

Se recolectaron, en frascos estériles, 100 gr de heces frescas de nueve caballos de la ciudad de 25 de Mayo y Los Toldos, provincia de Buenos Aires.

4.3 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

4.3.1 INDICADORES CONVENCIONALES DE CALIDAD DE AGUA Y EFLUENTES INDUSTRIALES

En todas las muestras propuestas en este estudio (aguas residuales y aguas superficiales) se determinaron los indicadores coliformes termotolerantes. Los protocolos aplicados fueron los descriptos para el análisis de calidad de agua y de efluentes de la provincia de Buenos Aires, dictados en la resolución 293 y 336/03, basados en la técnica del filtro membrana y el número más probable (NMP).

Para la cuantificación de coliformes termotolerantes en la materia fecal de caballos, se suspendió 20 g de heces en 80 ml de una solución de NaCl al 0,9%. Se colocó en un agitador durante 20 minutos a 120 rpm a temperatura ambiente. La cuantificación se realizó mediante la técnica de NMP.

4.3.2 INDICADORES Y PATÓGENOS VIRALES

4.3.2.1 BACTERIOFAGOS

La cuantificación de los bacteriófagos F-ARN en las muestras de aguas residuales y superficiales se realizó mediante el recuento de unidades formadoras de placas utilizando el método de la doble capa de agar de acuerdo a las normas ISO 10705-1 (International Organization for Standardization, 2001) sin concentración previa de las muestras y utilizando como bacteria hospedadora, *S. typhimurium* WG-49. Para la cuantificación de bacteriófagos F-ARN en la materia fecal de caballos, se suspendió 20 g de heces en 80 ml de una solución compuesta por: NaCl 0,2 M, 0,1 g de azida de sodio, 1 g de Tween 20 % y agua hasta un volumen final de 1 litro. Se colocó en un agitador durante 1 hora a 120 rpm a temperatura ambiente. Se alicuotó en tubos de 2 ml y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos (Golomidova *et al.*, 2007). Los bacteriófagos en los sobrenadantes se cuantificaron de acuerdo con la norma mencionada anteriormente.

En el caso de las muestras donde no se detectaron bacteriófagos F-ARN por las técnicas descritas arriba, se realizó un ensayo de presencia o ausencia. Esta técnica se basa en un paso previo de enriquecimiento de la muestra. Se sembró la bacteria hospedadora, *S. typhimurium* WG-49, en 25 ml de medio de cultivo líquido triptona, extracto de levadura y glucosa (TYG), se añadió 150 ml de una solución 1 M de CaCl₂ y se incubó durante 3hs a 37°C con una agitación suave. Luego se agregó 1 ml de la muestra en estudio y se incubó a 37°C durante 18 hs. Pasado el tiempo de incubación se tomó 1 ml del cultivo y se colocó en un tubo de 2 ml, con el agregado de 0,4 ml de cloroformo y se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos (lo denominaremos M1). Por otro lado, se preparó un cultivo de *S. typhimurium* WG-49 (0,5 ml de la bacteria en 50 ml de medio líquido TYG, incubados a 37°C durante 3 hs) y se prepararon tubos con 5 ml de medio semisólido TYG y 30 µl de una solución 1 M de CaCl₂. A cada tubo se le agregó 1 ml del cultivo de *S. typhimurium* WG-49. Se homogenizó y se volcó en placas de Petri de 9 cm con agar TYG. Una vez solidificadas las placas, se colocó una gota del cultivo tratado con cloroformo (M1). Se incubaron a 37°C durante 18 hs. Se examinó la presencia de zonas de lisis.

4.3.2.2 VIRUS HUMANOS Y ANIMALES

Para la detección y/o cuantificación de poliomavirus humanos y bovinos, adenovirus aviar y norovirus humanos presentes en las muestras de aguas residuales y superficiales se requirió un paso previo de concentración mediante las metodologías que se detallarán a continuación (4.4). Las metodologías empleadas para la detección y cuantificación de dichos virus se detallarán en los apartados posteriores (4.5 y 4.6)

4.4 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUAS RESIDUALES Y AGUAS SUPERFICIALES

Para la detección o caracterización molecular de virus, las muestras de aguas residuales y superficiales fueron concentradas previamente. Para el cálculo del porcentaje de recuperación viral, antes de la concentración, las muestras fueron inoculadas con dos virus controles del proceso: PP7, bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa* y rAdV, un adenovirus recombinante no replicativo, desarrollado por nuestro grupo de trabajo (Blanco Fernández et al., 2017; Rajal et al., 2007).

4.4.1 CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUAS RESIDUALES

Los efluentes domiciliarios e industriales se concentraron por ultracentrifugación (Prata et al., 2012). La muestra inicial (44 ml) fue inoculada con los virus controles de proceso: PP7 (ATCC 15692-B2) y rAdV (Blanco Fernández *et al.*, 2017) obteniendo una concentración de 10^6 UFP/ml. Se homogenizó por agitación enérgica. Se tomó una alícuota de la muestra inicial de 2 ml en un tubo estéril que se preservó a -70 °C. Se procesó un volumen de 44 ml por muestra, se centrifugaron a $110000 \times g$ por 1 hora a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4 ml de buffer glicina 0,25 N pH 9,5, para la desorción alcalina de los virus de los elementos particulados del sedimento. El sedimento resuspendido fue pasado a un tubo de centrifuga de 15 ml y se incubó en hielo por 30 minutos con agitación. Se le agregó 4 ml de PBS 2 X frío. Se centrifugó durante 20 minutos a $3000 \times g$. El sobrenadante fue colocado en un tubo de ultracentrífuga y se neutralizó con PBS 1X, luego se ultracentrifugó a $110000 \times g$ por 1 hora a 4 °C. Por último se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 ml de PBS 1 X. El concentrado viral fue guardado a -70 °C.

4.4.2 CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN AGUAS SUPERFICIALES

Las muestras de aguas superficiales se concentraron por la técnica de ultrafiltración tangencial (Rajal et al., 2007). La muestra inicial (10 litros) fue inoculada con los virus controles de proceso: PP7 (ATCC 15692-B2) y rAdV (Blanco Fernández *et al.*, 2017) obteniendo una concentración de 10^6 UFP/ml. Se homogenizó por agitación enérgica. Se tomó una alícuota de la muestra inicial de 2 ml en un tubo estéril que se preservó a -70 °C. Los 10 litros de muestra se filtraron a través de prefiltros de fibra de vidrio (MSI, G15WP14225) y luego se bombearon a través de una unidad de ultrafiltración con un corte de peso molecular de 50 kDa (Microza AHP 1010, Pall Life Sciences, East Hills, NY), con recirculación para la reducción del volumen. Para recuperar los virus retenidos en el sistema se utilizó una solución de lavado (0,05 M de glicina/NaOH y 0,1% de Tween 80), que se recirculó durante 15 minutos y se sumó al concentrado inicial. El volumen final del concentrado más la solución de lavado fue de 300 ml. Se conservó una alícuota de 15 ml de este concentrado final a -70 °C, para su posterior análisis.

4.4.3 CÁLCULO DE RECUPERACIÓN VIRAL

La recuperación viral en los dos sistemas de concentración utilizados, se determinó mediante la cuantificación de los genomas de los dos virus utilizados como controles de proceso (bacteriófago PP7 y adenovirus rAdV) en las muestras iniciales y concentradas siguiendo el cálculo que se detalla abajo. Para ello, se extrajeron los ácidos nucleicos como se detalla en la siguiente sección. Se hizo una transcripción reversa del genoma ARN del bacteriófago PP7 (sección 4.5.2) y se cuantificó mediante un método de qPCR que utiliza química TaqMan y fue descrito previamente (Rajal et al., 2007b, 2007a). El rAdV fue cuantificado por TaqMan qPCR según protocolo descrito por Blanco Fernández et al. (2017), Tabla 2. Se utilizó la mezcla Fast Start Universal Probe Master (ROX) (Roche Life Science) en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500. Las concentraciones se estimaron utilizando una curva estándar por corrida basada en diluciones seriadas en base 10 (de 1 a 10^6 cg por reacción) de un ADN plasmídico que contiene una secuencia parcial del gen de replicasa de PP7, o un fragmento del hexón específico del rAdV. El ADN plasmídico se cuantificó mediante una determinación fluorométrica (Qubit® 3.0 Fluorometer, Life Technologies, EE. UU.). La medida obtenida en ng/ul se convirtió en copias genómicas / μ l según el peso molecular del clon (en Dalton). Las muestras se analizaron por duplicado. El porcentaje de recuperación viral (% VR) de los virus de control se

calculó como la proporción del número total de copias genómicas (cg) en el concentrado con respecto al número total de cg en la muestra inicial.

$$\% VR = (\text{cg concentrado viral} / \text{cg en la muestra inicial}) \times 100$$

Tabla 2: Cebadores y sondas utilizados para la detección de AdVr y PP7.

Nombre	Secuencia (5-3')
AdVr	
JTVXF (+)	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG; Jothikumar et al. (2005a)
JTVXR (-)	ACIGTGGGGTTTCTGAACTTGTT; Jothikumar et al. (2005a)
Sonda PSC	VIC-ACTGCCGTCGCGTAGTGTCGCC-BHQ; María Dolores Blanco Fernández et al.(2017)
PP7	
PP7-247f	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT
PP7R-320	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG
Sonda PP7R-274	6-FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGA ACTAMRA

4.5 DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS

4.5.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se empleó un kit de extracción de ADN y ARN comercial (Roche, High Pure Viral Nucleic Acid) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este método se basa en la combinación de la propiedad de unión selectiva de los ácidos nucleicos a una membrana de sílica gel y su elución mediante un buffer. El primer paso permite la lisis de la muestra y la extracción del ácido nucleico viral, posteriormente este se pasa por una columna en la cual es retenido junto con las impurezas, estas son eluidas en dos pasos, utilizando en cada uno un buffer distinto. Por último, el ácido nucleico de alta calidad es eluido mediante el uso de un buffer.

4.5.2 RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN

Para la síntesis de ADNc, se partió de 10 µl del ARN extraído y se le agregó 15 µl de una mezcla de reacción compuesta de: Buffer RT-ML 1X, dNTP 5 mM c/u, *Random primers* 0,8 mM, RNasin

(inhibidora de RNAsa) 40U y M-MLV 200U (Promega). El ciclado consistió en 60 minutos a 37 °C y 10 minutos a 72 °C.

4.5.3 DETECCIÓN DE POLIOMAVIRUS HUMANOS POR NESTED-PCR

Para la detección de poliomavirus en las muestras de aguas residuales y superficiales se utilizaron protocolos previamente implementados en el laboratorio. Para la detección se siguió un algoritmo que utiliza diferentes reacciones de *nested*-PCR. Comprende dos reacciones principales: reacción A (que detecta los virus JCPyV, BKPyV, MCPyV, TSPyV, HPyV9 and MWPyV) y reacción B (que detecta los virus KIPyV, WUPyV, HPyV6 y HPyV7). A su vez las muestras positivas obtenidas en la reacción A se siguieron analizando mediante dos *nested*-PCR, la reacción A1 (que discrimina JCPyV y BKPyV) y la reacción A2 (MCPyV, H9PyV, MWPyV).

El ciclado de la primera ronda de la reacción A constó de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C. Esta fue seguida de 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos con una temperatura decreciente de 45 °C a 40 °C y 40 segundos a 72 °C. Posteriormente, se realizaron 26 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 40°C y 40 segundos a 72 °C. Finalmente, una extensión de 5 minutos a 72 °C.

El ciclado de la segunda ronda de la reacción A constó de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 8 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos con una temperatura decreciente de 42 °C a 38 °C y 40 segundos a 72 °C sucesivamente. Posteriormente, se realizaron 28 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 38 °C y 40 segundos a 72 °C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

El volumen final de reacción fue de 25 µl durante las etapas de screening y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), MgCl₂ 1,5 mM, los cebadores S-AP1 0,28 µM; S-Ap2 y S-Ap3 0,21 µM de cada uno; AS-AP1a 0,32 µM, AS-AP1b y AS-AP2 0,16 µM de cada uno, en primera ronda y S-AS1a 0,32 µM, S-AS1b 0,16 µM, S-AS2 0,16 µM, S-AS3 0,16 µM, AS-AS1 0,3 µM, AS-AS2 0,2 µM en la segunda ronda, 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® ADN Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2µl de ADN en la segunda ronda.

Los tamaños de los productos de amplificación de la segunda ronda fueron de 220, 224, 370 y 338 pb para MWPyV, MCPyV, BKPyV, JCPyV respectivamente.

El ciclado de la primera y segunda ronda de la reacción B fue idéntico a la segunda ronda de A.

Materiales y Métodos

El volumen final de reacción fue de 25 µl durante las etapas de screening y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), MgCl₂ 1,5 mM, 0,25 µM de cada uno de los cebadores S-BP1, S-BP2, AS-BP1 y 0,3 µM AS-BP2 en primera ronda y 0,3 µM S-BS1, S-BS2, AS-BS1y 0,25 µM S-BS2 en la segunda ronda, 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® ADN Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2µl de ADN en la segunda ronda. Los tamaños de los productos de amplificación son de 370, 452, 473 pb en primera ronda y 231, 232, 231,265 pb en segunda ronda para KIPyV, WUPyV, H6PyV y H7PyV, respectivamente.

Las subreacciones A1 y A2 siguieron el mismo ciclado tanto en primera y segunda ronda que la reacción A.

El volumen final de reacción A1 y A2 fue de 25 µl durante las etapas de screening y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), MgCl₂ 1,5 mM, 0,25 µM de cada uno de los cebadores JC1 y Bk1 en primera ronda de A1 y 0,25 µM JC3 y Bk3 en la segunda ronda A1, 0,3 µM de cada uno de los cebadores S-AP2,AS-AP1b y AS-AP2; 0,25 µM de S-AP3 en la primera ronda de A2 y 0,3 µM de S-AS1b; 0,25 µM de cada uno de AS-AS1 y AS-AS2, de la segunda ronda de A2; 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2µl de ADN en la segunda ronda.

Los cebadores de las distintas reacciones se encuentran descritos en la Tabla 3.

Tabla 3: Cebadores de la reacción A, A1, A2 y B para la detección de HPyV.

Nombre	Secuencia (5-3')
Nested PCR cebadores para HPyV reacción A y A2	
Primera Ronda	
S-AP1	CCTSAMTGGATGTTGCCT (desde 1399 hasta 1416) ^a
S-AP2*	CCAGATTGGATKCTWCCTC (desde 1399 hasta 1417) ^a
S-AP3*	CCTGATTGGATGCTACAAT (desde 1399 hasta 1417) ^a
AS-AP1a	ATGTGGGAGGCTGTNACY (desde 1789 hasta 1772) ^a
AS-AP1b*	AGASACAGCYTCCACAT (desde 1789 hasta 1772) ^a
AS-AP2*	TGCCTCCACATMTRCAA (desde 1783 hasta 1766) ^a
Segunda Ronda	
S-AS1a	AARAGGAGGAGTAGAAGT (desde 1531 hasta 1548) ^a
S-AS1b*	TAAAGGAGGGGTRGAAGT (desde 1531 hasta 1548) ^a
S-AS2	TAAGGGTGGGATAGATGT (desde 1531 hasta 1548) ^a
S-AS3	GAAGGGCAATATAGAGGT (desde 1532 hasta 1549) ^a
AS-AS1**	ACAGGTHAGRTCTCATT (desde 1759 hasta 1742) ^a
AS-AS2*	ACAGGTCATRTCTCATT (desde 1759 hasta 1742) ^a
Nested PCR cebadores para HPyV reacción A 1	
Primera Ronda	
JC1	AATGTGCAATCTGGTGAATT (desde 1333 hasta 1352) ^a
BK1	TACATTCAGGAGAGTTTATAGA (desde 1432 hasta 1453) ^b
Segunda Ronda	
JC3	CCTTTACTTTTAGGGTTGTAC (desde 1414 hasta 1434) ^a
BK3	CCTTRCTTCTAGGCCTG (desde 1559 hasta 1526) ^b
Nested PCR cebadores para HPyV reacción B	
S-BP1	CCTGACTGGATTTTTRTAT (desde 1416 hasta 1433) ^c
S-BP2	CCTCAATGGMTGCTTTTT (desde 1235 hasta 1252) ^d
AS-BP1	TTCTRTACAGCTCCATA (desde 1888 hasta 1871) ^c
AS-BP2	TCTAWAGGCYTCCAAAC (desde 1595 hasta 1578) ^d
Segunda Ronda	
S-BS1	TMARAAAAGGAGGGGTAG (desde 1583 hasta 1600) ^c
S-BS2	ARCTCCAGAGTRATAA (desde 1324 hasta 1341) ^d
AS-BS1	TGATTWGGWATATCAGGG (desde 1847 hasta 1830) ^c
AS-BS2	GCMTCAGGAATTCAGGC (desde 1555 hasta 1538) ^d

^a Posiciones numeradas de acuerdo con la secuencia de referencia JCPyV GenBank NC_001699

^b Posiciones numeradas de acuerdo con la secuencia de referencia BKPyV GenBank NC_001538

^c Posiciones numeradas de acuerdo con la secuencia de referencia KIPyV GenBank NC_009238.

^d Posiciones numeradas de acuerdo con la secuencia de referencia HPyV6 GenBank NC_014406.

*Cebadores utilizados en la reacción A2

+ Cebadores utilizados en la reacción A1

4.5.4 DETECCIÓN DE POLIOMAVIRUS BOVINO POR MULTIPLEX NESTED PCR

La detección de Poliomavirus bovino (BPyV) en las muestras se realizó mediante un protocolo desarrollado en esta tesis, que consistió en una *nested*-PCR dirigida a la región VP1/VP2. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4. Para la elección de los cebadores se utilizaron 30 secuencias del genoma completo de Poliomavirus bovino 1, 2 y 3 obtenidas del GenBank, estas se alinearon con el programa ClustalX2. Para la visualización y edición de las secuencias se utilizó el programa BioEdit. Como secuencia referencia se utilizó NC_001442. Los cebadores elegidos para la amplificación de los segmentos de los tres BPyV fueron analizados por el programa de OligoAnalyzer 3, de Integrated DNA Technologies (IDT inc).

El ciclado de la primera y segunda ronda de la PCR fue igual a los descriptos previamente para la reacción A de HPyV.

El volumen final de reacción fue de 25 µl durante las etapas de *screening* y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂); MgCl₂ 1,5 mM; los cebadores 1FBo12 0,3 µM y 1FBo3 0,2 µM ; 1RBo1, 1RBo2 y AS-BP2 0,28 µM de cada uno en primera ronda y 2FBo1 y 2FBo3 0,26 µM de cada uno, 2Fbo2 0,28 µM, 2RBo1 y AS-BS2 0,26 µM de cada uno, 2RBo2 0,28 µM en la segunda ronda, 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® ADN Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2µl de ADN en la segunda ronda. Los tamaños de los productos de amplificación fueron de 313, 385 y 259 pb en segunda ronda para Bo1, Bo2, Bo3 respectivamente.

Tabla 4: Cebadores utilizados en este trabajo de tesis para la detección de BPyV

Nested PCR cebadores para BoPyV	
Nombre	Secuencia (5-3')
Primera Ronda	
1FBo12	CWGTAGGTGGYGAACCAC (desde 2354 hasta 2371)*
1FBo3	CCATCATGGCAACATGCG (desde 1753 hasta 1770)*
1RBo1	CAAATGTCTGCTGCTGTG (desde 2708 hasta 2725)*
1RBo2	AACTYGAACTGGATATGGG (desde 2819 hasta 2839)*
AS-BP2	TCTAWAGGCYCCCAAAC (desde 2076 hasta 2093)*
Segunda Ronda	
2FBo1	TGTGAGGATTCAAAGCC (desde 2390 hasta 2409)*
2FBo1	MAAATACCCTAAGGGCAG (desde 2409 hasta 2426)*
2FBo3	GGAAGAGGCAAGGTGACC (desde 1779 hasta 1796)*
2RBo1	ATAGCTTGTCAGCTTTAC (desde 2685 hasta 2703)*
2RBo2	GAGTWACATTAATAATCTGGG (desde 2773 hasta 2794)*
AS-BS2	GCMTCAGGAATTCAGGC (desde 2031 hasta 2048)*

*Posiciones numeradas según la secuencia de referencia NC_001442 de BPyV

4.5.5 DETECCIÓN DE ADENOVIRUS AVIAR POR UNA *NESTED*-PCR

La detección de adenovirus aviar en las muestras se realizó mediante un protocolo desarrollado en esta tesis, que consistió en una *nested*-PCR dirigida a la región del hexón. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5. Para la elección de los cebadores se utilizaron 27 secuencias del genoma completo de adenovirus aviar obtenidas del GenBank, representantes de las cinco especies virales, y se alinearon con el programa ClustalX2. Para la visualización y edición de las secuencias se utilizó el programa BioEdit. Como secuencia de referencia se utilizó KT862805.1. Los cebadores elegidos para la amplificación del segmento de los cinco grupos fueron analizados por el programa OligoAnalyzer 3, de IDT Inc.

El ciclado de la primera y segunda ronda de la reacción constó de una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos con una temperatura de 50 °C y 30 segundos a 72 °C y finalmente una extensión de 5 minutos a 72°C.

El volumen final de reacción fue de 25 µl durante las etapas de *screening* y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), los cebadores 52K-F y 52K-rv 0,50 µM de cada uno, en primera ronda y 2FAdvF y 2RAdvF 0,50 µM de cada uno en la segunda ronda, 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® ADN Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2µl de ADN en la segunda ronda. El tamaño del producto de amplificación fue de 284 pb en segunda ronda.

Tabla 5: Cebadores utilizados en este trabajo de tesis para la detección de Adeno virus aviar

Nested PCR cebadores para AdV aviar	
Nombre	Secuencia (5-3')
Primera Ronda	
52K-F	TGTACGAYTTCGTSCARAC (Ayse Günes et.al 2012) (desde 13898 hasta 13916)*
52K-rv	AGCGCCTGGGTCAAACCGA (Ayse Günes et.al 2012) (desde 14342 hasta 14360)*
Segunda Ronda	
2FAdvF	GAGATGGCGTACATGATCGT (desde 14056 hasta 14075)*
2RAdvF	CAT GTA STC SGC GTC AGW CAT C (desde 14319 hasta 14340)*

*Posiciones numeradas según la secuencia de referencia KT862805.1 de FAdv Genbank

4.5.6 LIMITE DE DETECCIÓN DE NESTED-PCR DE POLIOMAVIRUS BOVINO Y ADENOVIRUS AVIAR

Para determinar el límite de detección de la *nested*- PCR de poliomavirus bovino 1 y 2 y del adenovirus aviar, se clonó el producto de la primera ronda de amplificación del BPyV 1 (524 pb), del BPyV2 (475 pb) y del AdV aviar (462 pb). Para esto se realizó una extracción de ADN de muestras positiva para los virus mencionados anteriormente con el kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche Life Science). La amplificación de los segmentos de BPyV 1, BPyV 2 y AdV aviar se realizó según se detalla más arriba. Los amplicones obtenidos fueron purificados utilizando el Kit Clean Up (PB-L) y clonados en el vector pGEM-T Easy Vector System II (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se transformó *E. coli* Top10 con el plásmido. Las bacterias recombinantes se seleccionaron sobre agar LB que contenía ampicilina. Se seleccionaron 5 clones positivos que se propagaron en un cultivo líquido de LB con ampicilina durante la noche. Se determinó la secuencia de los insertos en cada clon. Los plásmidos se extrajeron siguiendo el protocolo de *miniprep*. La linealización de los mismos se llevó a cabo por la reacción de restricción con EcoR1 a 37 °C durante una noche. Los plásmidos fueron cuantificados por Sinergy HT de Biotek, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Para calcular la cantidad de copias genómicas/ μ l se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{1 \text{ mol}}{\text{PM del plasmido+amplicon (gr)}} \times \frac{6,02 \cdot 10^{23} \text{ copias genómicas}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ gr}}{10^9 \text{ ng}} \times \frac{A \text{ ng}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{copias genómicas}}{\mu\text{l}}$$

A= amplicon; PM: peso molecular

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 por quintuplicado para determinar la concentración más baja de copias genómicas de BoPyV1, BoPyV2 y AdV aviar que se pueden amplificar en la segunda ronda de PCR, tomando como el límite de detección la última dilución en la que las 5 muestras dieron positivas.

4.6 CUANTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS

4.6.1 PCR EN TIEMPO REAL PARA POLIOMAVIRUS JC Y BK

Para la cuantificación de los Poliomavirus humanos se realizó una PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) simultánea de los virus JCPyV y BKPyV dirigida a la región VP2. El límite de detección (LOD) 95% se estimó en 4,9 copias genómicas mientras que el límite de cuantificación (LOQ) se estimó en 5,0 copias genómicas. (Wilrich C and Wilrich PT., 2009).

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclado estándar de: 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 °C por 1 minuto usando el equipo Applied Biosystems® 7500.

El volumen final de la reacción fue de 20 µl, utilizando la mezcla Fast Start Universal Probe Master (ROX) (Roche Life Science) 2X, 250 nM de la sonda TaqMan, 500 nM de cebadores sentido y antisentido (Tabla 6), 5 µl de ADN y agua estéril hasta llevar a volumen.

Tabla 6: cebadores y sonda para cuantificación por qPCR de HPyV

qPCR: cebadores y sondas para HPyV	
Nombre	Secuencia (5-3')
Primera Ronda	
S1-JC-BK	CTGCTGCTGCCACAGGATT
AS2_JC-BK	CCTCTACAGTAGCAAGGGATGCA
Probe-JC-BK	AGCAGCAGCCTCYCCAGCAGCAATTCAGC-BHQ

4.6.2 PCR EN TIEMPO REAL PARA NOROVIRUS

Para la cuantificación del genogrupo II de norovirus (GII), se utilizó una RT-qPCR dirigida a la región 5' del ORF 2, basado en la Norma ISO_15216-1 (Organización Internacional de Normalización, 2017). El LOD95% se estimó en 8,3 copias genómicas mientras que el LOQ se estimó en 10,0 copias genómicas (Wilrich C and Wilrich PT., 2009; Barrios *et al.*, 2018). Los parámetros de amplificación para norovirus consistieron en una reacción de volumen final 20 µl que contenía: Fast Start Universal Probe Master (ROX), mix 2X (Roche Life Science), 250 nM de la sonda TaqMan, 900 nM de cebadores sentido y antisentido, 5 µl de ADN y agua estéril hasta llevar a volumen (Tabla 7). Las condiciones de ciclado fueron 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 °C por 1 minuto usando el equipo Applied Biosystems® 7500.

Tabla 7: cebadores y sonda para cuantificación por qPCR de NoV

qPCR: cebadores y sondas para NoV	
Nombre	Secuencia (5-3')
Primera Ronda	
QNIF2 ^m (FW):	ATGTTYAGRTGGATGAGRTTCTCIGA (Loisy et al.. 2005)
COG2R (REV	TCGACGCCATCTTCATTCACA (Kageyama et al.. 2003)
Probe- QNIFS ^m	AGCACRTGGGAGGGCGATCG- TAMRA ; BHQ (Loisy et al.. 2005)

4.6.3 CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIOMAVIRUS HUMANOS Y NOROVIRUS EN LAS MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES Y SUPERFICIALES

Los ensayos de TaqMan PCR para HPyV y norovirus se realizaron por duplicado para cada muestra. Los datos de recuperación calculados para PP7 y AdVr (sección 4.4.2.1) se utilizaron para corregir los resultados de la concentración de norovirus y HPyV obtenidos por (RT) qPCR. La concentración de los virus en las muestras de aguas residuales originales fue calculada con las siguientes ecuaciones, según lo descrito por (Rajal *et al.*, 2007)

$$\text{Virus RNA: } C_s = C_{qPCR} \times (V_{RT}^t / V_{RT}) \times (V_{na}^t / V_c^{ext}) \times (V_c / V_s) \times 1 / V_R$$

$$\text{Virus DNA: } C_s = C_{qPCR} \times (V_{na}^t / V_c^{ext}) \times (V_c / V_s) \times 1 / V_R$$

Donde C_s es la concentración viral en la muestra (expresada como copias genómicas por ml); C_{qPCR} es la concentración media de cada reacción duplicada, medida por qPCR (expresada como copias genómicas por microlitro de reacción de RT), V_{RT}^t es el volumen total de la reacción de RT, V_{RT} es el volumen de ácidos nucleicos utilizados en la reacción de RT; V_{na}^t es el volumen total de ácidos nucleicos extraídos; V_c^{ext} es el volumen de concentrado viral utilizado para la extracción de ácidos nucleicos; V_c es el volumen de virus concentrado; V_s es el volumen de la muestra original y V_R es la recuperación viral (expresada como una fracción, no como porcentaje). Las concentraciones se expresan como copias genómicas por ml.

4.7 EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Para determinar la reducción de un indicador específico, se estableció la relación entre la carga del indicador que fluye a la planta de tratamiento (entrada C_i) y la carga del indicador descargado de la planta (salida C_o).

$$\text{Reducción } (\log_{10}) = \log_{10} (C_i/C_o)$$

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La correlación entre el título de todos los indicadores y los patógenos virales se evaluó mediante las pruebas de correlación de Pearson o Spearman (coeficiente de correlación de Pearson r , r , y el coeficiente de correlación de rango de Spearman, ρ , respectivamente), dependiendo de la distribución de los datos. Las reducciones de los indicadores por tratamiento de aguas residuales se compararon con las pruebas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Todos los valores por debajo del límite de detección de un microorganismo determinado se incluyeron en los análisis estadísticos como la mitad del valor correspondiente al límite de detección. Se utilizó el software GraphPad Prism V5.

4.9 BACTERIÓFAGOS EN LA TRANSMISIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES

4.9.1 MUESTRAS INVOLUCRADAS EN EL ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANOS

De las muestras descritas en el punto 5.2.1 se procedió al análisis de la presencia de genes de resistencia antimicrobianos (GRA) en 39 muestras de afluentes crudos, sin tratamiento, que ingresan a las plantas de residuos industriales relacionados con la producción animal alimentaria (producción o procesamiento de pollos, equinos, bovinos, porcinos e industrias lácteas) y de líquidos cloacales humanos, localizadas en la provincia de Buenos Aires. Se analizaron las fracciones de bacteriófagos y de bacterias de dichas muestras.

4.9.2 PURIFICACIÓN DEL ADN DE BACTERIÓFAGOS Y BACTERIAS

4.9.2.1 PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS DE BACTERIÓFAGOS

Para detectar los genes bla-TEM y bla-CTX-M en la fracción de fagos, las muestras de efluentes fueron concentradas por ultracentrifugación como se describió previamente en la sección 5.4.1. El concentrado fue filtrado por una membrana de 0,22 μm , quedando en la superficie de esta la mayor cantidad de bacterias y en el filtrado los bacteriófagos. Los filtrados fueron tratados con cloroformo 1:10 (V: V) para eliminar la presencia de vesículas que pudieran contener ADN bacteriano. Luego se trataron con DNasa (100 unidades / ml) para descartar la posibilidad de contaminación con ADN libre, no encapsidado.

4.9.2.2 EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS PARTÍCULAS DE BACTERIÓFAGOS

El ADN del bacteriofago fue aislado mediante digestión con proteinasa K, tratamiento con fenol / cloroformo (1: 1) (v: v) y precipitación con etanol.

4.9.2.3 EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO

Para el análisis de los dos genes de resistencia antimicrobianos en la fracción de bacterias, se filtraron 50 ml de muestra de efluente a través de filtros de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro. El contenido bacteriano de la membrana se suspendió en 4 ml de caldo Luria Bertani. La extracción de ADN bacteriano se llevó a cabo mediante tratamiento con fenol / cloroformo (1: 1) (v: v) y precipitación con etanol.

4.9.2.4 CONTROLES

Para evaluar la ausencia de ADN bacteriano libre contaminante en la fracción de fagos, se tomó una alícuota del filtrado después del tratamiento con DNasa y antes de la extracción del ADN de los bacteriófagos. Se realizó una PCR convencional para la amplificación del gen 16Sr ADN eubacterial y para la amplificación de los genes de resistencia buscados en este trabajo. Se avanzó en el análisis de la fracción de fagos cuando estas PCRs dieron negativas, indicando la ausencia de ADN bacteriano libre contaminante.

4.9.3 DETECCIÓN DE *BLA_{TEM}* Y *BLA_{CTX-M}*

4.9.3.1 DETECCIÓN DE *BLA_{TEM}*

Para la detección de los genes de *bla_{TEM}* en las muestras se realizó una PCR de punto final dirigida a la amplificación del gen completo. Los cebadores que fueron utilizados se muestran en la Tabla 8.

Los parámetros de amplificación para la reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 1 minutos a 94°C, 1 minutos a una temperatura de 55 °C y 1 minutos a 72 °C, con una extensión final 10 minutos a 72°C.

El volumen final de reacción fue de 25 µl y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), 0,50 µM de cada cebador (TEMR y TEMF), 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN. El tamaño del producto de amplificación fue de 800 pb.

Tabla 8: Cebadores utilizados en este trabajo de tesis para la detección de *bla-TEM*.

Nested PCR cebadores para <i>bla-TEM</i>	
Nombre	Secuencia (5-3')
Primera Ronda	
FTEM	ATGRRRTMYTMAACATTTYCGTGT
RTEM	TTACCAAKGCTTAATCAGTGAGG

4.9.3.1 DETECCIÓN DE *BLA_{CTX-M}* POR NESTED PCR

La metodología que se empleó para la detección de los genes de *bla_{CTX-M}* en las muestras fue una PCR anidada, dirigida a una porción de 227 pb de los genes de *bla_{CTX-M}*, desarrollada como parte de este trabajo de Tesis. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 9. Para la elección de los cebadores se utilizaron 90 secuencias de los genes completos de *bla_{CTX-M}* obtenidas del GenBank, que se alinearon con el programa ClustalX2. Para la visualización y edición de las secuencias se utilizó el programa BioEdit. Como secuencia referencia se utilizó NG_049029. Los cebadores elegidos para la amplificación de los segmentos de los genes de *bla_{CTX-M}* fueron analizados por el programa OligoAnalyzer 3, de IDT Inc.

Los parámetros de amplificación para la primera y segunda ronda de la reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 1 minutos a 94°C, 1

Materiales y Métodos

minutos a una temperatura de 55 °C y 1 minutos a 72 °C, con una extensión final 10 minutos a 72°C.

El volumen final de reacción fue de 25 µl y la composición fue la siguiente: 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (1,5 mM de MgCl₂), 0,50 µM de cada cebador (CTX-MF y CTX-MR, en la primera ronda y 2CTX-MFa y 2 CTX-MR en la segunda ronda), 0,2 mM de cada dNTP y 1,25 U de GoTaq® ADN Polymerase, sembrándose 2,5 µl de ADN en la primera ronda y 2 µl de ADN en la segunda ronda.

Tabla 9: Cebadores utilizados en este trabajo de tesis para la detección de bla-CTX-M.

Nested PCR cebadores para bla-CTX-M	
Nombre	Secuencia (5-3`)
Primera Ronda	
CTXM-STSK-di	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKAATGGC
CTXM-KSG-rev	CCGCTGCCGGTYTTATCVCCBAC
Segunda Ronda	
2FaCTX-M	ATGAATAAGCTGATTKYCA
2FbCTX-M	ATGAACAAATTGATTGCCCA
2RCTX-M	CCAYGTCACCARCTGYG

4.10 SECUENCIAS VIRALES Y BACTERIANAS

Los productos de amplificación de PCR se purificaron mediante el Kit Clean Up (PB-L) y se secuenciaron de manera automática (Applied Biosystems 3730xl Genetic Analyzer).

4.11 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Estos análisis se realizaron para genotipificar los genomas virales y bacterianos amplificados a partir de las distintas muestras. Los set de datos de cada uno de los análisis se alineó utilizando el programa Clustal X v2.0 y los alineamientos se editaron utilizando el programa BioEdit v 7.1.3. Los sets de datos incluyen las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias publicadas en GenBank. Para el análisis filogenético se utilizó Máxima Verosimilitud (ML, del inglés *Maximum Likelihood*) como metodología de inferencia filogenética implementada en el programa PhyML2.4.4. Para evaluar los agrupamientos filogenéticos se realizó un análisis de remuestreo o *bootstrapping* (1000 réplicas).

El método de ML requiere la utilización de modelos de sustitución para modelar las probabilidades de cambio entre nucleótidos (lo que permite obtener largos de rama en unidades de sustitución por sitio). El modelo de sustitución que mejor se ajustó a cada conjunto de secuencias se estimó usando el programa jModelTest v2.1.7 de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike.

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE LOS INDICADORES VIRALES DE CONTAMINACIÓN EN AGUAS

5.1.1 AGUAS RESIDUALES

5.1.1.1 CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES Y BACTERIÓFAGOS

El comportamiento de potenciales indicadores virales de contaminación se comparó con el comportamiento de indicadores bacterianos convencionales.

Los indicadores bacterianos fueron detectados y cuantificados en todas las muestras de aguas residuales domésticas e industriales (derivadas de industrias vinculadas a la producción o procesamiento de ganado bovino, aves de corral, cerdos, equinos y productos lácteos). Se obtuvieron valores mayores a 10^3 NMP/100ml (límite de vuelco de residuos industriales, permitido por la provincia de Buenos Aires (Autoridad del Agua 2003).

Por otro lado, los bacteriófagos fueron cuantificados en el total de las muestras (aguas domésticas e industriales) obteniendo títulos de $4,33 \times 10^2$ a $4,40 \times 10^4$ UFP/ml en los afluentes (entrada a la planta de tratamiento) y $6,33 \times 10^1$ a $7,37 \times 10^3$ UFP/ml en los efluentes (salida de la planta de tratamiento) (Tabla 10). Sin embargo, en las aguas de residuos industriales de origen equino, a pesar de la alta concentración de coliformes encontrada, solo se logró detectar a los bacteriófagos luego de una etapa de enriquecimiento.

Debido a las grandes diferencias en la cuantificación de coliformes termotolerantes y bacteriófagos F-ARN en las aguas provenientes del matadero equino, se decidió investigar la presencia de bacteriófagos en muestras de materia fecal de caballos. Se recolectaron 9 muestras de heces frescas de diferentes establos. Se obtuvo una amplia gama de títulos virales, consistente con los informados en otros trabajos. En uno de los animales, no se detectaron bacteriófagos F-ARN; en otros dos, la detección viral fue posible solo después de un paso de enriquecimiento (ver sección 4.3.2.1), mientras que en las seis muestras restantes, los títulos virales variaron de $1,6 \times 10^1$ a $4,6 \times 10^4$ UFP/mg de heces. Los coliformes termotolerantes, detectados en todas las muestras de heces, variaron de $9,3 \times 10^4$ a $4,3 \times 10^7$ NMP/100 ml, sin correlación con el número de bacteriófagos F-ARN ($p > 0.05$) (Tabla 11).

Resultados

Tabla 10: Cuantificación y eficacia de reducción de bacterias y virus en distintas plantas de tratamiento de efluentes.

Muestra	Fecha	Coliformes termotolerantes (NMP/100ml)			Fagos F-ARN (UFP/ml fecal)			HPyV (cg/ml)		Norovirus (cg/ml)		
		Reducción			Reducción			Reducción		Entrada	Salida	
		Entrada	Salida	Log ₁₀ (Entrada/ salida)	Entrada	Salida	Log ₁₀ (Entrada/ salida)	Entrada	Salida			Log ₁₀ (Entrada/ salida)
Domésticas WWTP A												
WWTP A1	Dic16_05	4,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁴	2,00	1,3 × 10 ⁴	7,3 × 10 ²	1,28	2,4 × 10 ⁶	3,2 × 10 ⁵	0,49	2,2 × 10 ⁶	6,0 × 10 ⁵
WWTP A2	Dic16_06	2,4 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁵	0,75	3,4 × 10 ³	7,2 × 10 ²	0,67	8,2 × 10 ⁵	4,4 × 10 ⁵	0,27	1,2 × 10 ⁶	4,0 × 10 ⁵
Domésticas WWTP B												
WWTP B1	Dic17_05	nd	4,3 × 10 ⁶	nd	9,3 × 10 ³	1,6 × 10 ³	0,76	na	1,7 × 10 ⁵	0,46	3,1 × 10 ⁶	1,4 × 10 ⁶
WWTP B2	Dic17_12	na	1,3 × 10 ³	nd	na	7,6 × 10 ²	nd	na	8,7 × 10 ⁴	nd	na	1,6 × 10 ⁶
WWTP B3	Dic17_19	na	6,5 × 10 ⁵	nd	na	2,5 × 10 ³	nd	na	2,5 × 10 ⁵	nd	na	U
WWTP B4	Dic17_26	na	1,3 × 10 ⁶	nd	na	1,2 × 10 ³	nd	na	2,4 × 10 ⁵	nd	na	1,4 × 10 ⁶
WWTP B5	Feb18_	na	1,7 × 10 ⁶	nd	na	1,3 × 10 ³	nd	na	1,7 × 10 ⁵	nd	na	4,5 × 10 ⁵
Domésticas WWTP C												
WWTP C1	Jun16	2,4 × 10 ⁶	3,0 × 10 ⁰	5,90	1,4 × 10 ³	1,8 × 10 ²	0,89	7,2 × 10 ⁴	5,6 × 10 ⁴	0,11	U	U
WWTP C2	Ago16	4,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁵	1,00	6,4 × 10 ³	5,6 × 10 ²	1,06	2,5 × 10 ⁵	2,0 × 10 ⁵	0,10	7,8 × 10 ⁵	U
WWTP C3	Nov16	2,4 × 10 ⁶	4,3 × 10 ³	2,75	5,2 × 10 ³	8,6 × 10 ²	0,78	2,8 × 10 ⁵	1,3 × 10 ⁵	0,34	U	U
Industria láctea WWTP												
Da1	Jun16	4,3 × 10 ⁷	4,0 × 10 ⁰	7,03	4,3 × 10 ²	6,3 × 10 ¹	0,84	nd	nd	nd	nd	nd
Da2	Ago16	2,4 × 10 ⁸	4,3 × 10 ³	4,75	1,1 × 10 ³	2,7 × 10 ²	0,62	nd	nd	nd	nd	nd
Da3	Jun17_05	1,5 × 10 ⁵	4,3 × 10 ⁴	0,54	4,8 × 10 ²	9,6 × 10 ¹	0,70	nd	nd	nd	nd	nd
Da4	Jun17_04	2,4 × 10 ⁵	9,3 × 10 ⁴	0,41	6,2 × 10 ²	1,2 × 10 ²	0,71	nd	nd	nd	nd	nd
Da5	Ago17	9,3 × 10 ⁶	7,5 × 10 ⁵	1,09	6,7 × 10 ³	9,0 × 10 ²	0,87	nd	nd	nd	nd	nd
Faena de pollos WWTP												
CS1	Ago15	nd	nd	nd	4,4 × 10 ⁴	4,8 × 10 ²	1,96	nd	nd	nd	nd	nd
CS2	Oct17	9,3 × 10 ⁶	na	nd	4,4 × 10 ³	na	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Matadero equino WWTP												
HS	Sep15	1,5 × 10 ⁷	2,4 × 10 ⁶	0,80	U	U	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Matadero porcino WWTP												
SS	Sep17	2,4 × 10 ⁸	na	nd	2,5 × 10 ⁴	na	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Matadero bovino WWTP												
BS1	Nov15	2,4 × 10 ⁶	9,3 × 10 ⁶	-0,59	4,8 × 10 ²	3,8 × 10 ²	0,10	nd	nd	nd	nd	nd
BS2	Dic15	4,3 × 10 ⁶	1,5 × 10 ⁷	-0,54	2,2 × 10 ⁴	6,1 × 10 ³	0,56	nd	nd	nd	nd	nd
BS3	Ene16	4,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁶	0,00	3,2 × 10 ³	1,6 × 10 ³	0,30	nd	nd	nd	nd	nd
BS4	Feb16	4,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁶	0,00	9,0 × 10 ³	7,4 × 10 ³	0,09	nd	nd	nd	nd	nd
BS5	Mar16	9,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁶	0,34	5,5 × 10 ³	4,0 × 10 ³	0,14	nd	nd	nd	nd	nd
BS6	Abr16	1,5 × 10 ⁶	1,5 × 10 ⁶	0,00	2,9 × 10 ³	2,0 × 10 ³	0,17	nd	nd	nd	nd	nd
BS7	May16	9,3 × 10 ⁵	4,3 × 10 ⁵	0,34	1,6 × 10 ³	5,1 × 10 ²	0,49	nd	nd	nd	nd	nd
BS8	Jun16	9,3 × 10 ⁵	9,3 × 10 ⁶	-1,00	1,4 × 10 ³	1,6 × 10 ³	-0,05	nd	nd	nd	nd	nd
BS9	Jul16	9,3 × 10 ⁵	4,3 × 10 ⁶	-0,66	9,4 × 10 ²	5,7 × 10 ²	0,21	nd	nd	nd	nd	nd
BS10	Dic16	4,3 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁵	1,00	4,8 × 10 ³	6,1 × 10 ²	0,89	nd	nd	nd	nd	nd

Se cuantificaron bacterias coliformes termotolerantes, bacteriófagos F-ARN, poliovirus humano y norovirus en muestras colectadas en los canales de entrada y salida de distintas plantas de tratamiento de efluentes (WWTP, del inglés *WasteWater Treatment Plant*) de actividades domésticas humanas e industriales.

NMP: número más probable; UFP: unidades formadoras de placas de lisis; cg: copias genómicas

na: muestra no disponible; nd: no determinada; U: no detectada

Resultados

Tabla 11: Cuantificación de bacterias coliformes termotolerantes y bacteriófagos F-ARN en la materia fecal fresca de equinos.

Muestra	Ciudad	Alimento del caballo	Coliformes totales NMP/10gr heces	Coliformes termotolerantes NMP/10gr heces	Fago F-ARN UFP/gr heces
Caballo 1		balanceado	1.72x10 ⁸	1.72 x 10 ⁸	P
Caballo 2		balanceado	9.60 x 10 ⁷	9.60 x 10 ⁷	P
Caballo 3	25 de Mayo	balanceado	1.72 x 10 ⁶	3.72 x 10 ⁵	U
Caballo 4		alfalfa	8.40 x 10 ⁷	6.00 x 10 ⁷	4.11 x 10 ³
Caballo 5		gramilla	9.60 x 10 ⁷	3.72 x 10 ⁷	1.60 x 10 ¹
Caballo 6		gramilla	3.72 x 10 ⁶	3.72 x 10 ⁶	2.23 x 10 ⁴
Caballo 7	Los Toldos	gramilla	3.72 x 10 ⁵	3.72 x 10 ⁵	7.00 x 10 ²
Caballo 8		gramilla	1.72 x 10 ⁸	1.72 x 10 ⁸	4.57 x 10 ⁴
Caballo 9		gramilla	9.60 x 10 ⁵	9.60 x 10 ⁵	8.40 x 10 ¹

U= no detectado P=presencia

5.1.1.2 CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE POLIOMAVIRUS HUMANO Y NOROVIRUS

La cuantificación de poliomavirus y norovirus humanos se realizó en los afluentes y efluentes de las muestras de aguas domésticas, que colectan las excretas de origen humano. Los títulos virales se corrigieron de acuerdo con la eficiencia de recuperación estimada previamente para los controles virales (PP7 y el adenovirus recombinante) sección 4.4.2.1. La mediana estimada de la recuperación viral fue 12,27% (6,98–13,27) para PP7 y 12,08% (5,05–13,71) para el adenovirus recombinante. En un trabajo previo a esta Tesis se analizaron 5 muestras de aguas residuales y se observó que no existía diferencia significativa en la recuperación entre los dos virus control mencionados y los virus entéricos norovirus y enterovirus (presentes naturalmente en las muestras) (en todos los casos, $p > 0.05$) (Blanco Fernández *et al.*, 2017). El promedio de los valores de recuperación viral se aplicó en los cálculos detallados en materiales y métodos, punto 4.6.3. Los títulos corregidos de poliomavirus humano y norovirus se presentan en la Tabla 10.

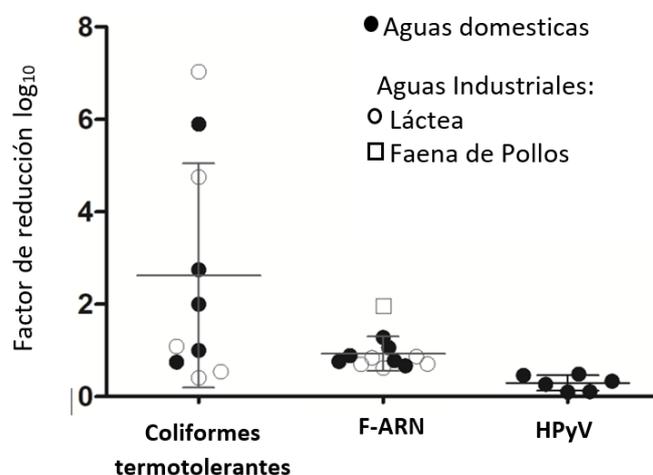
5.1.1.3 COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES FRENTE A LOS TRATAMIENTOS A LOS QUE SON SOMETIDOS LOS EFLUENTES

Para evaluar el comportamiento de los tres indicadores, coliformes termotolerantes, bacteriófagos F-ARN y HPyV, frente a un mismo tratamiento se midió la eficacia de reducción de los mismos como se indica en la sección 4.7.

La eficacia de reducción de coliformes termotolerantes y bacteriófagos F-ARN se calculó a partir de los resultados obtenidos entre 10 y 12 pares de muestras de afluentes y efluentes de distintas plantas de tratamiento (Tabla 10). La mediana de la eficacia de reducción logarítmica indicó una reducción menor de los F-ARN ($\log R = 0,81$) en comparación con la reducción de las coliformes termotolerantes ($\log R = 1,45$), aunque la diferencia no fue significativa (Figura 1). Para el cálculo de la mediana de la eficacia de reducción logarítmica, no se consideraron los valores del matadero bovino porque su planta de tratamiento se encontraba en proceso de reacondicionamiento por lo que el tratamiento era deficiente. Los factores de reducción logarítmica de esta planta de tratamiento, que incluso son negativos, se pueden ver en la Tabla 10.

En un subconjunto de cinco muestras pareadas de aguas domésticas, pudimos evaluar la reducción del indicador viral humano, HPyV, cuantificado por qPCR (Tabla 10). En estas muestras, HPyV mostró una reducción menor que los coliformes termotolerantes ($\log R = 0,30$ vs $\log R = 2,00$ $p < 0,01$) y que los F-ARN ($\log R = 0,30$ vs $\log R = 0,83$ $p < 0,05$) Figura 1.

Figura 1: Reducción de indicadores bacterianos y virales en WWTP. Reducción de bacterias coliformes termotolerantes, bacteriófagos F-ARN y HPyV en varias WWTP



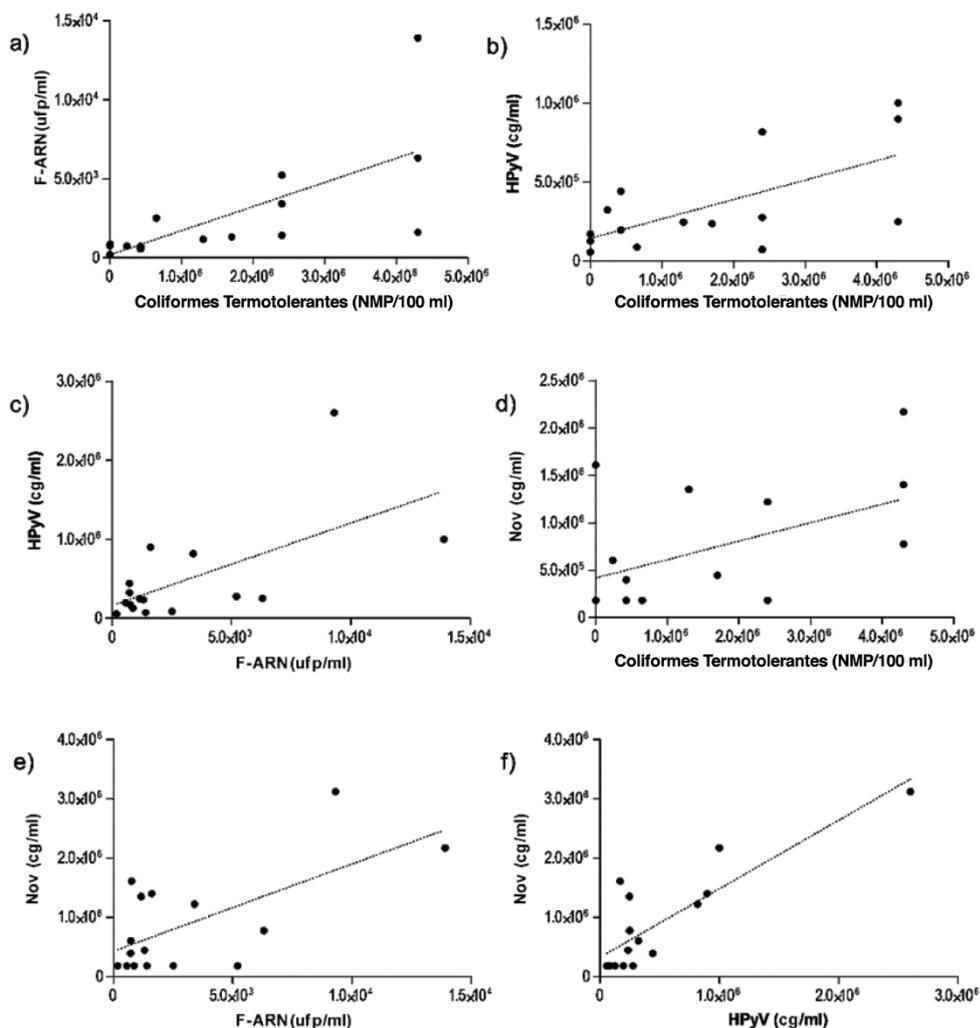
Resultados

5.1.1.4 CORRELACIÓN ENTRE NOROVIRUS Y LOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Los bacteriófagos F-ARN, como indicadores virales, mostraron una alta correlación positiva con coliformes termotolerantes ($p < 0,0001$, $r = 0,861$) y también con el otro indicador viral propuesto, el HPyV, que es específico de los humanos ($p = 0,038$, $\rho = 0,5324$). Por otro lado, HPyV mostró una débil correlación con bacterias ($p = 0,042$, $r = 0.549$).

Ambos indicadores virales mostraron una correlación altamente significativa con norovirus humano GII ($p < 0,0001$, $r = 0,852$ para HPyV; $p = 0,0064$, $r = 0,650$ para F-ARN) mientras que el indicador bacteriano no se correlacionó con este patógeno viral ($p = 0,0671$, $r = 0,484$) (Figura 2).

Figura 2: grafico de dispersión de las correlaciones entre **a)** F-ARN vs coliformes termotolerantes; **b)** HPyV vs. coliformes termotolerantes; **c)** HPyV vs. F-ARN; **d)** NoV vs coliformes termotolerantes; **e)** NoV vs F-ARN; **f)** NoV vs HPyV.



5.1.2 AGUAS SUPERFICIALES

5.1.2.1 CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES Y BACTERIÓFAGOS

En las muestras de aguas superficiales provenientes de la playa la Bagliardi (cercana al lugar de descarga de los efluentes cloacales de la ciudad de Berisso) se obtuvieron valores de coliformes termotolerantes entre $1,60 \times 10^3$ a $5,20 \times 10^5$ UFC/100 ml.

Los bacteriófagos F-ARN se detectaron en todas las muestras tomadas de la playa Bagliardi obteniendo títulos de 6 a 290 UFP/ml. En la Tabla 12 se muestran la cuantificación de las coliformes termotolerantes y de los bacteriófagos F-ARN.

Tabla 12: Cuantificación de bacterias coliformes termotolerantes, bacteriófagos F-ARN, poliomavirus humano y norovirus en aguas superficiales.

Muestra	Fecha	Playa Bagliardi			
		Coliformes termotolerantes (UFC/100ml)	Fagos F-ARN (UFP/ml fecal)	HPyV (cg/ml)	Norovirus (cg/ml)
B1	Dic17_05	na	6	$2,72 \times 10^1$	U
B2	Dic17_05	$8,00 \times 10^4$	160	$2,11 \times 10^2$	P ($3,68 \times 10^2$)
B3	Dic17_12	$1,60 \times 10^3$	165	$9,09 \times 10^3$	U
B4	Dic17_19	$5,20 \times 10^5$	15	$4,76 \times 10^1$	U
B5	Dic17_26	$2,30 \times 10^5$	37	4,20	U
B6	Ene18_2	$3,10 \times 10^5$	290	$2,80 \times 10^1$	U
B7	Ene18_9	$3,00 \times 10^4$	40	$6,16 \times 10^1$	U
B8	Ene18_16	$4,80 \times 10^5$	57	8,85	U
B9	Ene18_23	$1,80 \times 10^4$	22	U	U
B10	Feb18_6	$3,10 \times 10^4$	33	7,17	U
B11	Feb18_13	$2,80 \times 10^5$	210	$1,18 \times 10^1$	P ($1,70 \times 10^2$)
B12	Feb18_20	$3,00 \times 10^5$	100	$4,38 \times 10^1$	P ($3,88 \times 10^2$)

na: muestra no disponible; P: positiva por debajo del límite de cuantificación; U: no detectada

5.1.2.2 CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE POLIOMAVIRUS HUMANO Y NOROVIRUS

Las muestras de la playa Bagliardi fueron evaluadas mediante PCR en tiempo real cuantitativa. Los poliomavirus humanos y los norovirus se evaluaron en todas las muestras. Los títulos vírales se corrigieron de acuerdo con la eficiencia de recuperación estimada previamente para el control viral utilizado (el adenovirus recombinante, rAdV) sección 4.4.3 La mediana estimada de la recuperación viral fue 10,74 % para el adenovirus recombinante. El promedio de los valores de recuperación viral se aplicó en los cálculos detallados en materiales y métodos, punto 4.6.3.

En los ensayos sobre norovirus humano GII, si bien se pudo detectar a estos virus en algunas de las muestras, los títulos obtenidos se encontraron por debajo del límite de cuantificación del ensayo en todas las muestras analizadas (ver sección 4.6.2). Los HPyV se cuantificaron con títulos desde 3,60 hasta $9,09 \times 10^3$ cg/ml en la playa Bagliardi (Tabla 12).

5.1.2.3 CORRELACIÓN ENTRE NOROVIRUS Y LOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

En las muestras de aguas superficiales, ninguno de los indicadores virales mostró una correlación significativa con coliformes ($p = 0,5193$, $r = 0,2067$ para HPyV; $p = 0,0661$, $r = 0,1414$ para F-ARN), así como tampoco entre ellos ($p = 0,8467$, $r = 0,0626$).

Como se mencionó en la sección anterior los títulos de norovirus se encontraron por debajo del límite de cuantificación, no pudiendo realizarse las correlaciones con los indicadores bacterianos y los indicadores virales propuestos en este trabajo (HPyV y F-ARN).

5.2 INDICADORES DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN FECAL EN AGUAS RESIDUALES Y SUPERFICIALES

Cuando se sospecha que la polución de un cuerpo de agua proviene de la contaminación desde múltiples fuentes, el uso de marcadores de seguimiento de la fuente microbiana contribuiría a la identificación de esas diferentes fuentes y a la toma de decisiones sobre las intervenciones de salud pública. En este trabajo de Tesis se desarrollaron técnicas para evaluar a los marcadores de seguimiento de la fuente microbiana asociada a humanos, bovinos y aves de corral, en base a las detecciones moleculares de poliomavirus humano, poliomavirus bovino y adenovirus aviar,

Resultados

respectivamente. Estas técnicas se aplicaron al análisis del origen de la contaminación de las muestras de efluentes y aguas superficiales.

5.2.2 POLIOMAVIRUS HUMANOS COMO TRAZADORES DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL

Para evaluar a los HPyV como marcadores asociados a la contaminación fecal humana se analizaron muestras de aguas residuales domésticas, así como también de aguas residuales industriales mediante una *nested*-PCR de punto final dirigida a más de 12 poliomavirus humanos diferentes. Los resultados mostraron que el 100 % de las muestras de aguas domésticas eran positivas al menos para algún HPyV (Tabla 13). En las aguas industriales de un total de 36 muestras, solo en seis se pudo amplificar HPyV, cinco correspondientes a la salida del matadero bovino y una a la salida de la industria láctea. Se lograron secuenciar 4 de estas muestras. Los análisis filogenéticos permitieron clasificar a una de las muestras secuenciadas como MCPyV y a las otras tres como JCPyV, ambos virus asociados con humanos, lo que demuestra la especificidad de la técnica (Tabla 13).

Por otro lado, se analizó la presencia de HPyV en las aguas superficiales. En la Playa Bagliardi solo 1 de las 12 muestras fue positiva para HPyV por la *nested*-PCR de punto final.

5.2.3 POLIOMAVIRUS BOVINOS COMO TRAZADORES DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL

Se detectaron poliomavirus bovinos en todas las muestras de entrada y salida del matadero de ganado bovino (20/20) y la mayoría de las muestras de la industria láctea (7/10), siendo BPyV1 el más frecuentemente detectado (27 de 30), seguido de BPyV2 (17 de 30) y BPyV3 (1 de 30) (Tabla 13). Los genomas de algunos de estos virus fueron secuenciados y clasificados por análisis filogenéticos, mostrando que las secuencias de BPyV1 de Argentina estaban relacionadas con una secuencia de España, mientras que BPyV2 pertenecía al grupo 2a y se agrupaba con una secuencia de Alemania (Figuras 3 a y 3 b). Ninguna de las muestras de mataderos de aves de corral, cerdos y equinos fue reactiva en el ensayo de virus bovinos. Sin embargo, 2 de 24 muestras de aguas residuales domésticas fueron débilmente reactivas en el ensayo. En las 12 muestras de aguas superficiales no se detectó ningún BPyV.

Resultados

Tabla 13: Detección y caracterización molecular de HPyV, BoPyV y AdV aviar en aguas residuales domésticas e industriales.

Muestras	HPyV		BoPyV		AdV aviar	
	Positivo/ muestras analizadas (%)	Poliomaviruses detectado (n muestras)	Positivo/ muestras analizadas (%)	Poliomaviruses detectado (n muestras)	Positivo/ muestras analizadas (%)	Adenovirus detectado (n muestras)
Domésticas WWTP A	4/4 (100%)	JCPyV (4) BKPyV (4) HPyV A2 ^c (4)	1 ^d /4 (25%)	BPyV1 (1) BPyV2 (0) BPyV3 (0)	0/4 (0%)	U
Domésticas WWTP B	6/6 (100%)	JCPyV (6) BKPyV (6) HPyV A2 ^c (4)	0/6 (0%)	U	0/6 (0%)	U
Domésticas WWTP C	6/6 (100%)	JCPyV (5) BKPyV (5) HPyV A2 ^c (4)	0/6 (0%)	U	0/6 (0%)	U
Domésticas WWTP D	8/8 (100%)	JCPyV (8) BKPyV (8) HPyV A2 ^c (2)	1 ^d /8 (12,5%)	BPyV1 (1) BPyV2 (0) BPyV3 (0)	0/8 (0%)	U
Matadero bovino WWTP	5 ^e /20 (25%)	JCPyV (3) BKPyV(1) MCPyV (1)	20/20 (100%)	BPyV1 (20) BPyV2 (10) BPyV3 (1)	0/20 (0%)	U
Industria láctea WWTP	1 ^a /10 (10%)	HPyV A ^b (1)	8 ^e /10 (80%)	BPyV1 (8) BPyV2 (8) BPyV3 (0)	0/10 (0%)	U
Faena de pollos WWTP	0/3 (0%)	U	0/3 (0%)	U	3/3 (100%)	Gp1E (1) Gp1 (2)
Matadero equino WWTP	0/2 (0%)	U	0/2 (0%)	U	0/2 (0%)	U
Matadero de cerdos WWTP	0/1 (0%)	U	0/1 (0%)	U	0/1 (0%)	U

U: no detectado

^a muestra perteneciente a un efluente del canal de salida de la planta de tratamiento

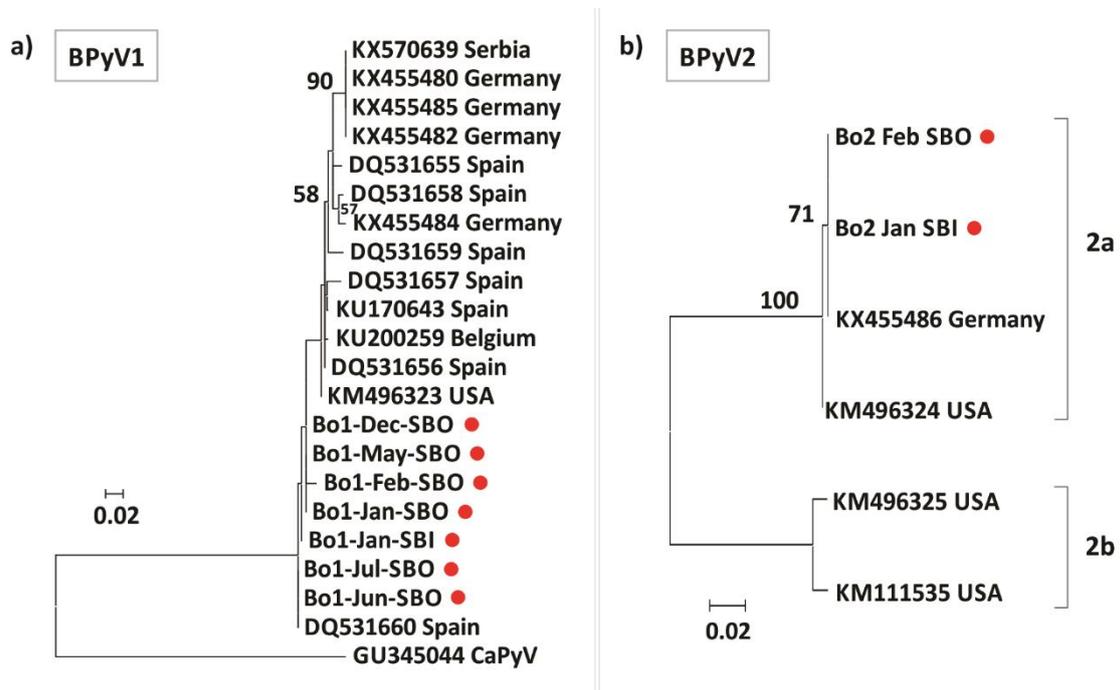
^b HPyV A: muestras positivas para la PCR A que amplifican simultáneamente JC, BK; TS, H9, MW, MC

^c HPyV A2: muestras positivas para la PCR A que amplifican simultáneamente MC, H9, MW

^d muestra perteneciente a un afluente

^e resultados negativos pertenecen a muestras de efluentes

Figura 3: a) Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de secuencias parciales de la VP1 de BPyV1. b) Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de secuencias parciales de la VP1 de BPyV2



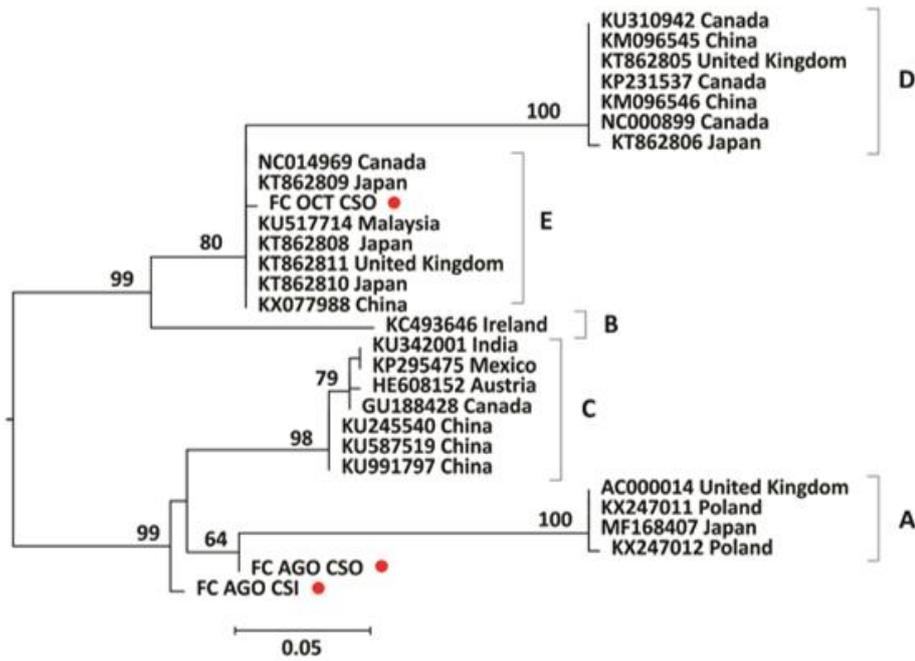
Las secuencias de Argentina se indican con puntos rojos.

5.2.4 ADENOVIRUS AVIAR COMO TRAZADORES DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL

Se encontraron adenovirus aviares en las muestras de entrada y salida de mataderos de pollos (3/3). Estos virus fueron secuenciados, y los análisis filogenéticos mostraron que uno de ellos estaba relacionado con la especie E de adenovirus de aves mientras que los otros dos virus, a pesar de estar más relacionados con las especies A y C, no se agruparon con ninguna de las cinco especies definidas. Se necesita una caracterización adicional para determinar si pertenecen a una especie aún no descrita dentro del grupo 1 (Gp1) del género Aviadenovirus (Figura 4). Las aguas residuales provenientes de actividades domésticas humanas o de industrias que involucraron a otras especies animales, diferentes a las aves de corral, no fueron reactivas para AdV aviar. En las aguas superficiales no se detectó ningún AdV aviar.

Resultados

Figura 4: Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de secuencias parciales del gen del hexón de AdV aviar.



Las secuencias de Argentina se indican con puntos rojos.

5.3 PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN AGUAS RESIDUALES

Se observó una alta prevalencia de genes codificantes de *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}, tanto en la fracción de bacterias como en la de bacteriófagos, en concordancia con lo observado por otros autores (Marti *et al.*, 2014; Quirós *et al.*, 2014b; Brandão *et al.*, 2017) (Tabla 14).

Cuando comparamos la detección de ambos GRA en los dos tipos de entornos analizados (aguas residuales domésticas e industriales), encontramos una alta tasa de detección de *bla*_{TEM} en las aguas residuales domésticas, siendo más frecuente que *bla*_{CTX-M} en esas mismas muestras ($p < 0,0001$), pero también fue más frecuente que *bla*_{TEM} en las aguas residuales industriales ($p = 0,0244$). En cambio, en el entorno de las aguas residuales industriales, ambos GRA se distribuyeron uniformemente ($p = 1,0$). Por otro lado, la frecuencia de *bla*_{CTX-M} en las aguas industriales fue mayor que en las aguas domésticas ($p = 0,0410$).

Con respecto a la distribución comparativa de GRA en las fracciones de bacteriófagos y bacterias, se encontraron diferencias con respecto a los diferentes alelos presentes.

La amplificación, la secuenciación y el análisis de aminoácidos marcadores de los distintos alelos del gen de *bla*_{TEM}, nos permitió encontrar diferentes variantes en la fracción bacteriana (compatibles con genes *bla*_{TEM-116}, *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-229}), siendo el gen de tipo *bla*_{TEM-116} el más frecuente. Mientras tanto, en la fracción de bacteriófagos fue el único alelo presente.

La amplificación, la secuenciación y el análisis filogenético de los distintos alelos del gen de *bla*_{CTX-M}, permitió la detección de diferentes variantes, compatibles con los genes *bla*_{CTX-M9} y *bla*_{CTX-M2} en la fracción bacteriana. Mientras tanto, en la fracción de bacteriófagos, prevalecieron esos alelos seguidos por los genes *bla*_{CTX-M1 like} y *bla*_{CTX-M25 like}. Una secuencia relacionada con los genes *bla*_{CTX-M2}, proveniente de la fracción bacteriana de una muestra de efluentes de la industria láctea (Da2b), conformó un grupo filogenético separado, que reunió a otras secuencias recuperadas de muestras ambientales de diferentes países, como Estados Unidos (MG560066.1), China (GQ983298.1), Sudáfrica (DQ835617.1) y Portugal (JQ397677.1, JQ397685.1, JQ397689.1) (Lu *et al.*, 2010; Tacão *et al.*, 2012), (Figura 5).

Además, encontramos genes similares a *bla*_{OXY} en una fracción bacteriana de los efluentes de la granja avícola (Figura 5).

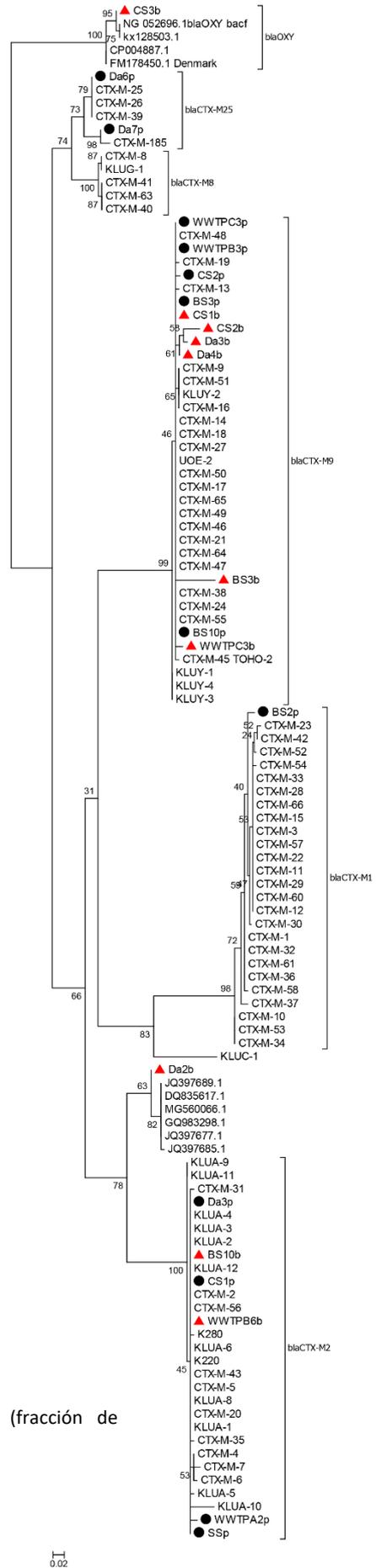
Resultados

Tabla 14: Detección de *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} en las fracciones bacterianas y de bacteriófagos provenientes de aguas residuales.

Muestra	Fecha	Detección de <i>Bla</i> _{TEM}		Detección de <i>Bla</i> _{CTX-M}	
		Fracción bacteriana	Fracción bacteriófagos	Fracción bacteriana	Fracción bacteriófagos
Domesticas WWTP A					
WWTP A1	Dic16_05	U	TEM-116 like*	U	U
WWTP A2	Dic16_06	U	U	U	CTXM-2 like*
Domesticas WWTP B					
WWTP B1E	Dic17_05	TEM-116 like*	U	U	U
WWTP B1	Dic17_05	TEM-116 like*	U	U	U
WWTP B2	Dic17_12	TEM-229 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP B3	Dic17_19	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	CTXM-9 like*
WWTP B4	Dic17_26	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP B5	Ene18_2	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP B6	Ene18_9	TEM-116 like*	TEM-116 like*	CTXM-2 like	U
WWTP B7	Ene18_16	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP B8	Ene18_23	TEM-116 like*	U	U	U
WWTP B9	Feb18_6	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP B10	Feb18_13	TEM like*	U	U	U
WWTP B11	Feb18_20	TEM-116 like*	U	U	U
Domesticas WWTP C					
WWTP C1	Jun16	U	U	U	U
WWTP C2	Ago16	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
WWTP C3	Nov16	U	U	CTXM-9 like*	CTXM-9 like*
Frecuencia de detección en aguas domiciliarias WWTP		22/34 ^{a, c}		5/34 ^{a, d}	
Industria lactea WWTP					
Da1	Jun16	U	U	U	U
Da2	Ago16	U	U	CTXM-2 like*	U
Da3	Jun17_05	U	U	CTXM-9 like*	CTXM-2 like*
Da4	Jun17_04	U	U	CTXM-9 like*	U
Da5	Ago17	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
Da6	Nov16	U	U	U	CTXM-25 like*
Da7	Dic16	U	TEM like*	U	CTXM-25 like*
Faena de pollos WWTP					
CS1	Ago15	U	TEM-116 like*	CTXM-9 like*	CTXM-2 like*
CS2	Oct17	TEM-1 like*	U	CTXM-9 like*	CTXM-9 like*
CS3	Jun16	U	U	like_OXY*	U
Matadero equino WWTP					
HS	Sep15	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	U
Matadero porcino WWTP					
SS	Sep17	U	U	U	CTXM-2 like*
Matadero bovino WWTP					
BS1	Nov15	U	U	U	U
BS2	Dic15	TEM-116 like*	TEM-116 like*	U	CTXM-1 like*
BS3	Ene16	U	TEM-116 like*	CTXM-9 like*	CTXM-9 like*
BS4	Feb16	TEM-116 like*	U	U	U
BS5	Mar16	TEM-116 like*	U	U	U
BS6	Abr16	U	U	U	U
BS7	May16	U	U	U	U
BS8	Jun16	U	U	U	U
BS9	Jul16	U	TEM-116 like*	U	U
BS10	Dic16	TEM-116 like*	TEM-116 like*	CTXM-2 like*	CTXM-9 like*
Frecuencia de detección en todas las aguas industriales WWTP		15/44 ^{b, c}		16/44 ^{b, d}	

Para determinar si hubo una asociación estadísticamente significativa entre la detección de *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} en los diferentes grupos, se realizó una prueba exacta de Fisher. Con distintas letras se indican los pares comparados, y los resultados fueron: ^a p = <0.0001, ^b p = 1.0, ^c p = 0.0244, ^d p = 0.0410.

Figura 5: Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de secuencias parciales del gen del *bla*_{CTX-M}.



Las secuencias de Argentina se indican con puntos negros (fracción de bacteriófagos) y triángulos rojos (fracción bacteriana).

6 DISCUSIÓN

La alta frecuencia de brotes de enfermedades originados por contaminación viral de aguas (Ahmed *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2016) y alimentos (Cheong *et al.*, 2009b; Mattia and Manikonda, 2018) se ha puesto en evidencia y ha tomado mayor protagonismo en las últimas décadas. Por lo tanto, es de gran interés la búsqueda de indicadores de contaminación viral y de patógenos en las distintas matrices hídricas para poder prevenir brotes, así como para dilucidar el origen de brotes de gastroenteritis y otras enfermedades de origen no bacteriano.

En este trabajo se demostró que los F-ARN se encuentran frecuentemente en aguas residuales domésticas y de actividades industriales vinculadas a la producción de alimentos de origen animal. Estos F-ARN podrían actuar como indicadores virales de contaminación fecal proveniente de humanos, pollos, cerdos y bovinos, pero no de caballos. Con respecto a la ausencia o bajos niveles de F-ARN en muestras de heces de caballos y en aguas residuales del matadero de caballos, se propone que las bacterias utilizadas según el protocolo ISO, no estarían dentro del rango de hospedadores de estos bacteriófagos. Havelaar *et al.* 1986 y Golomidova *et al.* 2007 evaluaron la presencia de otros microorganismos que se ajustan mejor al rango de hospedador de los bacteriófagos que infectan bacterias intestinales de caballo, lo que les permitió encontrar una amplia gama de títulos de colifagos.

En aguas residuales domésticas, el recuento de F-ARN mostró correlación con coliformes termotolerantes pero también con otro indicador viral de origen humano, HPyV. La correlación observada entre los F-ARN –que potencialmente podrían asociarse a distintas especies animales– y los HPyV –asociados sólo al hombre– puede estar influenciada porque en efluentes domésticos es esperable que la principal fuente de contaminación sea humana, y por lo tanto, los F-RNA presentes en ellas provendrían de la microbiota humana.

Es notable que los dos indicadores virales (pero especialmente HPyV) se correlacionaron significativamente con un patógeno humano, norovirus GII, mientras que el indicador bacteriano no lo hizo, siendo entonces mejores predictores del comportamiento de los virus patógenos entéricos.

El uso de técnicas moleculares que cuantifican los genomas virales sin información sobre la viabilidad de los virus ha sido motivo de preocupación. Sin embargo, en el trabajo aquí presentado sobre aguas residuales, observamos una buena correlación entre un marcador viral

Discusión

propuesto cuantificado por un método molecular (HPyV) y otro marcador viral detectado por infectividad (F-ARN); y ambos marcadores también se correlacionaron con un patógeno viral detectado por una técnica molecular (norovirus GI). El método desarrollado para cuantificar simultáneamente dos HPyV (JCPyV y BKPyV) ha demostrado un rendimiento confiable y presentaría una sensibilidad más alta que las técnicas solo centradas en la cuantificación de JCPyV. Estos dos virus son los poliomavirus humanos más prevalentes, según los resultados de este trabajo y los informes anteriores en muestras ambientales de la misma localización y de otras regiones geográficas (Hundesa *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2016). En este estudio, el uso concomitante de un marcador molecular específico humano junto con el recuento de bacteriófagos proporciona información valiosa sobre la fuente precisa de contaminación y una medida de infectividad viral.

La frecuencia de detección de los indicadores y patógenos en aguas superficiales se ve afectada por la dinámica con la estos que ingresan al cuerpo de agua (por ej. desde efluentes), por factores que pueden producir su dilución (como por ej. escorrentías o fuertes lluvias), por movimientos propios del fluido (como las corrientes), por su sedimentación y por la presencia de factores inactivadores de los microorganismos, entre otros. Los bacteriófagos, HPyV y Coliformes termotolerantes pudieron detectarse en todas las muestras, pero su concentración fue más baja en aguas superficiales que en aguas residuales. Sin embargo, para el caso de norovirus, su detección en aguas superficiales fue menos frecuente que en aguas residuales y con menores concentraciones, por debajo del límite de cuantificación. En las aguas superficiales no se encontró ninguna correlación entre las concentraciones de los indicadores virales y bacterianos ni tampoco entre los indicadores y el patógeno norovirus.

No existe un consenso global sobre la utilidad de los bacteriófagos como indicadores. Distintos autores reportan no haber encontrado una correlación entre norovirus y los bacteriófagos F-ARN en aguas superficiales (Jiang *et al.*, 2007; Lodder *et al.*, 2010; Viau *et al.*, 2011). Lodder y colaboradores (2010) concluyeron que sus resultados no apoyan el papel de los colifagos como indicadores de la calidad del agua superficial, sin embargo, remarcaron que los colifagos pueden ser útiles para determinar la eficacia del tratamiento de aguas residuales. En contraste, autores como Vergara y colaboradores (Vergara *et al.*, 2015) reportaron la correlación entre los F-ARN y norovirus en las aguas superficiales.

Las diferencias que observamos en cuanto a las correlaciones entre los indicadores en aguas residuales y aguas superficiales podrían estar influenciadas por la dinámica propia de cada tipo

Discusión

de fluido, y los varios parámetros que se suman a la hidrodinámica de las aguas superficiales, como se señalara más arriba.

En este contexto, resulta importante destacar que no existe un indicador universal y que la incidencia de patógenos virales puede variar entre diferentes poblaciones y localizaciones geográficas. Dadas las diferencias observadas entre estudios realizados en diferentes países o regiones, sería necesario realizar un análisis previo de la matriz y el área geográfica para determinar cuál es el mejor indicador de los patógenos bajo estudio.

Varios autores han propuesto a los F-ARN como indicadores de eficacia del proceso de tratamiento de aguas residuales debido a: sus características fisicoquímicas, su improbable crecimiento en *E. coli* suspendido en agua, su alta prevalencia, su alta concentración en heces y su mayor resistencia al tratamiento que los coliformes termotolerantes (IAWPRC, 1991; Davies-Colley *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2013). En este trabajo se demostró que los F-ARN viables son más resistentes que los coliformes termotolerantes en la mayoría de los sistemas de tratamientos biológicos analizados. Además, la reducción de los genomas virales de HPyV fue similar al comportamiento de los F-ARN viables. Los virus y bacterias podrían tener diferentes susceptibilidades a los distintos procesos que causan la descomposición microbiana. Sinton y colaboradores (Sinton *et al.*, 2002) demostraron que los F-ARN son más resistentes a la luz solar que los coliformes termotolerantes. Además, observaron que la interacción de virus con partículas coloidales puede ofrecer protección contra enzimas proteolíticas u otras sustancias inactivadoras, aumentando la estabilidad de la cápside viral y bloqueando la radiación ultravioleta. Por lo tanto, los dos marcadores virales utilizados en este trabajo (bacteriófagos y poliomavirus) podrían ser indicadores más conservadores de la eliminación de virus humanos y animales que la medición convencional de coliformes termotolerantes para diferentes tratamientos de aguas residuales.

Por otro lado, evaluamos a los virus como herramienta para trazar el origen de contaminación (MST, del inglés *Microbial Source Tracking*). Estas herramientas moleculares aumentaron los blancos de detección al dirigirse a varios virus humanos, bovinos o de aves de corral. La detección simultánea de diferentes poliomavirus humanos, no solo el JCPyV comúnmente detectado, sino también los virus con alta prevalencia en la población humana como BKPyV y MCPyV, da como resultado una herramienta MST sensible con un rendimiento confiable cuando hay contaminación múltiple. Esta técnica fue capaz de detectar una contaminación menor con virus humanos en las plantas de tratamiento del matadero bovino y la industria láctea. Se

Discusión

sospecha una filtración desde las tuberías que colectan los residuos cloacales de las industrias hacia el sistema de lagunas de estabilización de las plantas de tratamiento.

Sin embargo, en las aguas superficiales, cuya carga viral es inferior a las aguas residuales domésticas, solo se detectó 1 muestra positiva por esta técnica, mientras que la cuantificación por PCR en tiempo real cuantitativa permitió la amplificación de los poliomavirus en todas las muestras. Esta diferencia se debe al menor límite de detección de la PCR en tiempo real, establecido en 5 cg mientras que la PCR de punto final permite detectar a partir de 25-50 cg. Por lo tanto, la PCR en tiempo real es una herramienta más adecuada para la detección y cuantificación en muestras de baja carga viral como las aguas superficiales.

Con respecto al uso de un indicador para rastrear la contaminación fecal / urinaria bovina, diferentes autores propusieron la detección de BPyV1 (Hundesda *et al.*, 2006; Corsi *et al.*, 2014, 2016). Sin embargo, en nuestro trabajo, no solo BPyV1 sino también BPyV2 fueron altamente prevalentes en los desechos bovinos, lo que refuerza la aplicabilidad del nuevo método para aumentar la probabilidad de detección de contaminación bovina. En el matadero de bovinos monitoreado durante un año, uno, dos o los tres tipos virales fueron detectados simultáneamente, con diferentes combinaciones de tipos virales en distintos meses. El matadero recibió animales de diferentes lugares de cría de ganado y cada perfil viral podría estar asociado con los diferentes orígenes de los animales. La técnica desarrollada fue capaz de detectar virus bovinos incluso en aguas residuales domiciliarias. Los efluentes descargados por las industrias cárnicas urbanas en la tubería de aguas residuales de la ciudad podrían ser la fuente del virus bovino detectado. Como una caracterización adicional, los análisis moleculares presentados en este trabajo mostraron que los BPyV encontrados en nuestro país están estrechamente relacionados con los europeos, aunque se han reportado muy pocas secuencias de estos virus en todo el mundo.

Sobre el rastreo de la contaminación originada en aves de corral, desarrollamos una técnica capaz de detectar las cinco especies de adenovirus aviar (AdV aviar A a E) del grupo 1 del género *Aviadenovirus*. Los virus encontrados en este trabajo no estaban relacionados entre sí y se pudieron rastrear diferentes orígenes. AdV aviar Gp1 se ha encontrado en todo el mundo en pollos enfermos y sanos (Brown Jordan *et al.*, 2018). Su detección y caracterización podrían ser útiles como rastreo de fuentes microbianas, así como para estudiar la circulación de estos virus en granjas avícolas.

Discusión

En cuanto al análisis de los bacteriófagos, se analizaron diferentes roles que podrían cumplir: ser indicadores virales de contaminación y de eficacia de los tratamientos de efluentes, como se discutió arriba, pero también se analizó otra participación que podrían tener: diseminar genes de resistencia antimicrobiana en el ambiente. La resistencia actual de los microorganismos a los antimicrobianos constituye un problema de salud en todo el mundo. Es importante conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia. En este sentido se determinó la presencia y las características de los GRA en la fracción de bacteriófagos de las muestras de aguas residuales y se lo comparó con las mismas detecciones en la fracción bacteriana.

Dada la epidemiología local, se esperaba encontrar genes *bla*_{CTX-M} de los grupos 1 y 2 debido a la alta prevalencia de estos alelos entre los patógenos bacterianos de humanos y los encontrados en aves de corral (grupo 2). Sin embargo, el alelo predominante fue el del grupo 9, seguido por el 2, y en menor proporción el 25 y el 1. El grupo CTX-M-9 había sido detectado solo en unos pocos casos clínicos en Argentina durante el 2012 (Sennati *et al.*, 2012). A nivel global, este alelo fue detectado en diferentes contextos. En la cuenca del Mediterráneo, el grupo 9 fue el segundo en prevalencia, siguiendo al gen CTX-M-1 en bacterias de origen animal (Dandachi *et al.*, 2018). Los mismos grupos se encontraron en *E. coli* asociado con el ganado lechero en Estados Unidos (Afema *et al.*, 2018) y también en animales de granja y mascotas en China (Ho *et al.*, 2015). Respecto al grupo de CTX-M-25, hay informes sobre su detección esporádica en cepas bacterianas de entornos clínicos en lugares distantes como Estados Unidos, China (Huang *et al.*, 2015) e Israel (McGettigan *et al.*, 2009; Vervoort *et al.*, 2012), pero también de criaderos de pollos en Japón en 2017 (Yosapol *et al.*, 2017). Por otro lado, la información disponible sobre la variedad de los genes *bla*_{CTX-M} que circulan en bacteriófagos es más limitada. Países como España (Brown-Jaque *et al.*, 2018; Larrañaga *et al.*, 2018) y Túnez (Colomer-Lluch, Calero-Cáceres, *et al.*, 2014) reportaron los grupos 1 y 9 en bacteriófagos de muestras clínicas, aguas residuales y vegetales, mientras que en la India (Mohan Raj *et al.*, 2018), el grupo 1 se detectó en fagos de muestras ambientales.

El hallazgo en este trabajo de genes *bla*_{CTX-M} pertenecientes a 4 de los 5 grupos en la fracción de bacteriófagos, particularmente los grupos 9 y 25 menos prevalentes en nuestra región, sugiere que existe una subestimación de estos alelos entre los patógenos bacterianos y podría indicar el surgimiento local de estas variantes. La mayor diversidad observada en la fracción de bacteriófagos podría atribuirse a la mayor estabilidad de los fagos en el ambiente en comparación con las bacterias (Hata *et al.*, 2013; Barrios *et al.*, 2018). La detección de una secuencia divergente del grupo 2, que se asoció a otras secuencias de origen ambiental, da sustento a la hipótesis del ambiente como un reservorio natural de genes de resistencia. En

Discusión

cuanto a la eficacia de los mecanismos involucrados en el reclutamiento y la movilización de los alelos *bla*_{CTX-M-9} y 25 de fagos a bacterias (incluidos los elementos genéticos móviles involucrados) se requiere una investigación más profunda. La diversidad encontrada entre los genes *bla*_{CTX-M} podría asociarse con las plataformas genéticas responsables de su reclutamiento y movilización. Ha sido documentado que al menos dos tipos de secuencias de inserción (IS) contribuyen con la movilización y expresión de genes *bla*_{CTX-M}: elementos *ISCR1*, asociados con *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} – los prevalentes en este trabajo (Toleman *et al.*, 2006) y *ISEcp1*, relacionado con *bla*_{CTX-M-1}, 8 y 25 – los minoritarios en nuestras muestras (Poirel *et al.*, 2005).

No es sorprendente la detección *bla*_{TEM-1}, una de las primeras betaclactamasas descritas, de la cual derivan varios alelos de espectro extendido como la *bla*_{TEM-116}. (Vignoli *et al.*, 2005) La presencia de alelos *bla*_{TEM-116} se ha descrito previamente en *E. coli* enteropatógena de Uruguay, aunque su prevalencia en nuestra región no se ha explorado en detalle. Es más llamativo el hallazgo de un alelo probablemente relacionado con el recientemente descrito *bla*_{TEM-229} (GenBank: MG821356).

La búsqueda y caracterización de los genes que codifican TEM entre los agentes patógenos merece un estudio más a fondo, ya que su presencia suele permanecer desatendida en comparación con otras enzimas clínicamente importantes, suponiendo que todas las betalactamasas TEM asociadas con las BLEE y las carbapenemasas son TEM-1. Sin embargo, en este trabajo se observó la presencia de dos variantes de espectro extendido: la altamente prevalente TEM-116 y la variante recientemente asignada, TEM-229.

En resumen, en este trabajo de Tesis se implementaron diferentes técnicas para evaluar la contaminación viral en aguas residuales y superficiales, se desarrollaron herramientas virológicas para establecer si la contaminación se asocia a un origen humano, bovino o aviar y se abordó la caracterización de los bacteriófagos como vehículos de genes de resistencia antimicrobiana en aguas residuales. La aplicación de estas metodologías en diversas muestras hídricas permitió presentar resultados pioneros en la caracterización de la contaminación viral de aguas en nuestro país, mediante el estudio de virus muy diversos, que tienen como hospedadores al hombre, distintos animales y bacterias.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados presentados en este trabajo apoyan la aplicabilidad de los F-ARN como indicadores de contaminación fecal, aunque su detección en aguas superficiales es variable.
- Frente a un mismo tratamiento de efluentes, los bacteriófagos y los HPyV mostraron una menor reducción que las bacterias coliformes.
- Ambos indicadores virales resultaron ser mejores predictores del comportamiento de los virus patógenos entéricos en aguas residuales pero no en aguas superficiales.
- Se ha demostrado que el HPyV, el BPyV y el AdV son indicadores útiles para el rastreo de la contaminación fecal humana, bovina y aviar y que la metodología implementada es altamente sensible.
- Este trabajo contribuye con una descripción inicial de los poliomavirus bovinos 1, 2 y 3 y adenovirus aviar en Argentina.
- Se han encontrado genes codificantes de β -lactamasas TEM y CTX-M no sólo en el ADN asociado a bacterias, sino también en el asociado a bacteriófagos mediante una detección molecular directa de GRA en muestras de aguas residuales, sin aislamiento microbiano previo. Esto podría sugerir un potencial rol de los fagos en la transferencia horizontal de GRA.
- Se han encontrado variantes de TEM y CTX-M no prevalentes en la región como TEM229 y CTX-M 9 y 25
- La diversidad de CTX-M encontrada en los bacteriófagos sugiere que los fagos podrían usarse como "reporteros" de los GRA que están circulando entre la población bacteriana.
- El uso concomitante de distintas herramientas evaluadas en este trabajo brindará una información integrada con respecto a la contaminación de aguas.

8. RESUMEN

Numerosos brotes de gastroenteritis virales alrededor del mundo han sido causados directa o indirectamente por aguas contaminadas. Sin embargo, la calidad microbiológica de las aguas se evalúa mediante indicadores bacterianos que no siempre correlacionan con la presencia de virus patógenos contaminantes. Existe un consenso general sobre la necesidad de utilizar indicadores microbiológicos alternativos, subrogantes de virus patógenos, que se sumen a los actuales.

Se han propuesto distintos marcadores virales como indicadores de contaminación fecal y de la presencia de virus en distintas matrices hídricas.

El objetivo general de este trabajo es estudiar la contaminación virológica en muestras de aguas superficiales y en efluentes cloacales e industriales, desarrollando metodologías específicas para este fin.

En este trabajo se evaluó: - la utilidad de los bacteriófagos F-ARN y de los poliomavirus humanos (HPyV) como indicadores de contaminación fecal/viral, - su comportamiento frente a los tratamientos a los que son sometidos los efluentes y - la correlación con la presencia de un agente patógeno viral (norovirus, NoV), en comparación con los indicadores tradicionales (coliformes termotolerantes). Además, se implementó la detección molecular de HPyV, poliomavirus bovinos (BPyV) y adenovirus aviar (AdV aviar) para determinar el origen de la contaminación microbiana.

Se recolectaron 52 muestras de efluentes crudos y tratados de plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP) provenientes de actividades domésticas humanas, mataderos de animales para el consumo (bovinos, equinos), granjas de cerdos y aves de corral y una industria láctea. Además, se recolectaron 12 muestras de aguas superficiales. La cuantificación de los marcadores virales se realizó mediante un ensayo de doble capa de agar para los bacteriófagos, por PCR en tiempo real cuantitativa para los HPyV y NoV y por la técnica del número más probable (NMP) o filtro membrana para los coliformes. Para determinar el origen humano o animal de la contaminación se realizaron PCRs *multiplex* anidadas de punto final dirigidas a HPyV, BPyV y AdV aviar.

Los indicadores bacterianos fueron detectados y cuantificados en todas las muestras de aguas residuales domésticas, industriales y superficiales, con valores mayores a 10^3 NMP/100 ml en

Resumen

aguas residuales y valores entre $1,60 \times 10^3$ a $5,20 \times 10^5$ UFC/100 ml en aguas superficiales. Los bacteriófagos alcanzaron títulos de $4,33 \times 10^2$ a $4,40 \times 10^4$ UFP/ml en los efluentes crudos y $6,33 \times 10^1$ a $7,37 \times 10^3$ UFP/ml en los efluentes tratados y de 6 a 290 UFP/ml en las aguas superficiales, con escasa detección en los residuos industriales de origen equino.

La evaluación de la eficacia de tratamiento en las plantas de aguas residuales domésticas e industriales mostró una tendencia de menor reducción de los bacteriófagos y de los HPyV con respecto a las bacterias indicadoras frente a un mismo tratamiento.

En las aguas domésticas, los indicadores propuestos F-ARN y HPyV se correlacionaron significativamente con un patógeno viral humano, norovirus, mientras que el indicador bacteriano no lo hizo, por lo que fueron mejores predictores del comportamiento de los virus patógenos entéricos en dichas matrices. En las aguas superficiales no se encontró ninguna correlación entre las concentraciones de los indicadores virales y bacterianos ni tampoco entre los indicadores y norovirus. Proponemos distintos factores que afectan la dinámica de estos parámetros en aguas superficiales, a diferencia de lo que ocurre en las aguas residuales.

Por otro lado, los BPyV fueron detectados con una prevalencia del 100 % en los efluentes del matadero bovino y 66 % en la industria láctea. Los HPyV se encontraron presentes en todas las muestras de aguas domésticas y en 2 muestras del matadero bovino y 1 de las aguas residuales de la industria láctea. El AdV aviar sólo fue detectado en granjas de aves de corral. Análisis de secuenciación demostraron que las detecciones fueron específicas.

En cuanto a los bacteriófagos, además de su uso potencial como indicadores virales de contaminación y de eficacia de los tratamientos de efluentes, se analizó su posible rol en la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana (GRA) en el ambiente. Se analizaron los alelos de β -lactamasas TEM y CTX-M diseminados en aguas residuales por medio de bacterias o bacteriófagos, mediante detección molecular directa de GRA, sin crecimiento microbiano previo. Los genes *bla*_{TEM} se detectaron con una alta frecuencia en genomas bacterianos y de fagos, siendo *bla*_{TEM-116} el más prevalente, mientras que también se encontró un tipo recientemente descrito, *bla*_{TEM-229}. Por otro lado, detectamos 4 de los 5 grupos de los genes *bla*_{CTX-M} (*bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{CTX-M1}, y *bla*_{CTX-M25}). La detección de algunos de estos alelos fue inesperada según los GRA de circulación regional en patógenos clínicos. La diversidad de CTX-M encontrada en los bacteriófagos sugiere que los fagos podrían usarse como "reporteros" de los GRA que están circulando entre la población bacteriana.

En resumen, en este trabajo de Tesis se implementaron diferentes técnicas para evaluar la contaminación viral en aguas residuales y superficiales, se desarrollaron herramientas

Resumen

viroológicas para establecer si la contaminación se asocia a un origen humano, bovino o aviar y se abordó la caracterización de los bacteriófagos como vehículos de genes de resistencia antimicrobiana en aguas residuales. La aplicación de estas metodologías en diversas muestras hídricas permitió presentar resultados pioneros en la caracterización de la contaminación viral de aguas en nuestro país, mediante el estudio de virus muy diversos, que tienen como hospedadores al hombre, distintos animales y bacterias.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Afema, J.A., Ahmed, S., Besser, T.E., Jones, L.P., Sisco, W.M., and Davis, M.A. (2018) Molecular Epidemiology of Dairy Cattle-Associated Escherichia coli Carrying bla CTX-M Genes in Washington State. *Appl Environ Microbiol* **84**: 1–12.
- Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D., et al. (2014) Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **14**: 725–730.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. a a, et al. (2007) Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* **81**: 4130–4136.
- Allard, a., Albinsson, B., and Wadell, G. (1992) Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* **37**: 149–157.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation (1999) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Stand Methods* 541.
- Andilara, G.M., Avridou, A.M., Ambiri, M.L., Atopoulos, A. V, and Igas, F.R. (2006) THE USE OF BACTERIOPHAGES FOR MONITORING THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SEWAGE SLUDGE. **27**: 367–375.
- Autoridad del Agua (2003) Resolucion N° 336/2003.
- Balcazar, J.L. (2014) Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathog* **10**: e1004219.
- Barrios, M.E., Blanco Fernández, M.D., Cammarata, R.V., Torres, C., and Mbayed, V.A. (2018) Viral tools for detection of fecal contamination and microbial source tracking in wastewater from food industries and domestic sewage. *J Virol Methods* **262**: 79–88.
- Blanco Fernández, M.D., Barrios, M.E., Cammarata, R.V., Torres, C., Taboga, O.A., and Mbayed, V.A. (2017) Comparison of internal process control viruses for detection of food and waterborne viruses. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 4289–4298.

Bibliografía

- Blanco Fernández, M.D., Torres, C., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Barril, P. a, et al. (2011) Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina. *Infect Genet Evol* **11**: 1631–7.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., and Girones, R. (2000) Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* **66**: 238–245.
- Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Carratala, A., and Girones, R. (2010) Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology* **7**: 141.
- Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalá, A., Hundesa, A., and Girones, R. (2013) Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int* **2013**:.
- Borrego, J.J., Cornax, R., Preston, D.R., Farrah, S.R., McElhaney, B., and Bitton, G. (1991) Development and application of new positively charged filters for recovery of bacteriophages from water. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1218–1222.
- Brabban, A.D., Hite, E., and Callaway, T.R. (2005) Evolution of Foodborne Pathogens via Temperate Bacteriophage-Mediated Gene Transfer. *Foodborne Pathog Dis* **2**: 287–303.
- Brandão, M.A. da R., Lopes, A.T.S., Neta, M.T. da S., de Oliveira, R.B.F., Rezende, R.P., Albuquerque, G.R., et al. (2017) Microbiological Quality and Prevalence of β -Lactam Antibiotic Resistance Genes in Oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *J Food Prot* **80**: 488–496.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J.J., et al. (2018) Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *Int J Antimicrob Agents* **51**: 434–442.
- Brown, D., Lopman, B., Koopmans, M., van Duynhoven, Y., Hanon, F.-X., and Reacher, M. (2012) Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Dis* **9**: 90–96.
- Brown Jordan, A., Gongora, V., Hartley, D., and Oura, C. (2018) A Review of Eight High-Priority, Economically Important Viral Pathogens of Poultry within the Caribbean Region. *Vet Sci* **5**: 14.
- Bush, K. and Fisher, J.F. (2010) Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **65**:

Bibliografía

- 455–478.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014) Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ Sci Technol* **48**: 7602–7611.
- Cantón, R. and Coque, T.M. (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**: 466–475.
- Cantón, R., González-Alba, J.M., and Galán, J.C. (2012) CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* **3**:
- Ceysens, P. and Lavigne, R. (2010) Bacteriophages of *Pseudomonas*. 1041–1055.
- Charles, K.J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A., and Pedley, S. (2009) Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J Appl Microbiol* **106**: 1827–1837.
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y.N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M.S.J., et al. (2018) Genome hypermobility by lateral transduction. *Science (80-)* **362**: 207–212.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H., and Kim, S.J. (2009a) Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7745–7751.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H., and Kim, S.J. (2009b) Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7745–7751.
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., and Jofre, J. (2014) Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ Int* **73**: 167–175.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2014) Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **69**: 1265–1274.
- Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Carvin, R.B., Burch, T.R., Spencer, S.K., Lutz, M.A., et al. (2016) Human and Bovine Viruses and Bacteria at Three Great Lakes Beaches: Environmental Variable Associations and Health Risk.

Bibliografía

- Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Hughes, P.E., and Baldwin, A.K. (2014) Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: Hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Sci Total Environ* **490**: 849–860.
- Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z., and Rolain, J.M. (2018) Prevalence and emergence of extended-spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram negative bacteria of animal origin in the Mediterranean basin. *Front Microbiol* **9**: 1–26.
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., and Nagels, J.W. (1999) Inactivation of Faecal Indicator Micro- Organisms in Waste Stabilisation Ponds: Interactions of Environmental Factors With Sunlight. **33**: 1220–1230.
- Donnison, A.M. and Ross, C.M. (1995) SOMATIC AND F-SPECIFIC COLIPHAGES IN NEW ZEALAND WASTE TREATMENT LAGOONS. **29**: 1105–1110.
- Europea, C. Directiva Marco del Agua (2000/60/CE). Minist. Agric. Aliment. y Medio Ambient.
- Feltkamp, M.C.W., Kazem, S., van der Meijden, E., Lauber, C., and Gorbalenya, A.E. (2013) From Stockholm to Malawi: Recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol* **94**: 482–496.
- Fratini, M., Di Bonito, P., and La Rosa, G. (2014) Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? *Food Environ Virol* **6**: 1–12.
- Galán, J.C., González-Candelas, F., Rolain, J.M., and Cantón, R. (2013) Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: From the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Front Microbiol* **4**: 1–17.
- Generales, C. Tratamiento de Efluentes Líquidos Consideraciones Generales : Pretratamientos : Tratamientos Biológicos : 1–7.
- Gibney, K.B., O’Toole, J., Sinclair, M., and Leder, K. (2017) Burden of disease attributed to waterborne transmission of selected enteric pathogens, Australia, 2010. *Am J Trop Med Hyg* **96**: 1400–1403.
- Golomidova, A., Kulikov, E., Isaeva, A., Manykin, A., and Letarov, A. (2007) The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5975–5981.
- Haramoto, E., Fujino, S., and Otagiri, M. (2015) Science of the Total Environment Distinct

Bibliografia

- behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci Total Environ* **520**: 32–38.
- Hata, A., Kitajima, M., and Katayama, H. (2013) Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. 545–554.
- Havelaar A. H. and Pot-Hogbeem W. M. (1988) F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological aspects. *Wat Sci Technol* **20**, 399-407.
- Havelaar, A.H., Van Olphen, M., and Drost, Y.C. (1993) F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2956–2962.
- Hawkey, P.M. (2008) The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **62 Suppl 1**: 1–9.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2509–14.
- Hess, M. (2000) Detection and differentiation of avian adenoviruses: A review. *Avian Pathol* **29**: 195–206.
- Hlavsa MC, Roberts VA, Anderson AR, Hill VR, Kahler AM, et al (2011) Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water.
- Ho, P.L., Liu, M.C.J., Lo, W.U., Lai, E.L.Y., Lau, T.C.K., Law, O.K., and Chow, K.H. (2015) Prevalence and characterization of hybrid bla CTX-M among Escherichia coli isolates from livestock and other animals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **82**: 148–153.
- Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2004) Norovirus Outbreak among Primary Schoolchildren Who Had Played in a Recreational Water Fountain. *J Infect Dis* **189**: 699–705.
- Huang, S.Y., Pan, K.Y., Liu, X.Q., Xie, X.Y., Dai, X.L., Chen, B.J., et al. (2015) Analysis of the drug-resistant characteristics of Klebsiella pneumoniae isolated from the respiratory tract and CTX-M ESBL genes. *Genet Mol Res* **14**: 12043–12048.
- Hundesda, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodriguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., and Girones, R. (2010) Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods* **163**: 385–389.

Bibliografía

- Hundesda, A., Maluquer De Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., and Girones, R. (2006) Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7886–7893.
- IAWPRC (1991) Study Group on Health Related Water Microbiology Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* **25** 529–545.
- International Committee on Taxonomy of Viruses.
- International Organization for Standardization (2001) ISO 10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ivami.
- Iván, R., Novelo, M., San, L., and Cedillo, P. (2010) Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. **26**: 327–335.
- Jiang, S., Noble, R., and Chu, W. (2001) Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol* **67**: 179–184.
- Jiang, S.C., Chu, W., and He, J.W. (2007) Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6468–6474.
- Jones, T.H., Muehlhauser, V., and Thériault, G. (2014) Comparison of ZetaPlus 60S and nitrocellulose membrane filters for the simultaneous concentration of F-RNA coliphages, porcine teschovirus and porcine adenovirus from river water. *J Virol Methods* **206**: 5–11.
- Kassem, A., Schöpflin, A., Diaz, C., Weyers, W., Stickeler, E., Werner, M., and Zur Hausen, A. (2008) Frequent detection of merkel cell polyomavirus in human merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* **68**: 5009–5013.
- Katayama, H., Shimasaki, A., and Ohgaki, S. (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1033–9.
- Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., et al. (2013) Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLoS One* **8**: 1–7.

Bibliografía

- Lambden, P.R., Caul, E.O., Ashley, C.R., Clarke, I.N., Lambden, P.R., Caul, E.O., et al. (2016) Sequence and Genome Organization of a Human Small Round-Structured (Norwalk-Like) Virus Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2880716> JSTOR is a not-for-profit service that helps scho. **259**: 516–519.
- Larrañaga, O., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Gómez-Gómez, C., Blanch, A.R., Rodríguez-Rubio, L., and Muniesa, M. (2018) Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ Int* **115**: 133–141.
- Larrea-murrell, J.A., Rojas-badía, M.M., Romeu-álvarez, B., and Heydrich-pérez, M.R.M. (2013) Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas : revisión de la literatura. **44**: 24–34.
- Lewis, G.D. and Metcalf, T.G. (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* **54**: 1983–8.
- Lizasoain, A., Tort, L.F.L., García, M., Gillman, L., Alberti, A., Leite, J.P.G., et al. (2018) Human enteric viruses in a wastewater treatment plant: evaluation of activated sludge combined with UV disinfection process reveals different removal performances for viruses with different features. *Lett Appl Microbiol* **66**: 215–221.
- Lodder, W.J., Van Den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., and De Roda Husman, A.M. (2010) Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5965–5971.
- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li, T.Y., Ye, Z.M., Zhang, D.S., et al. (2010) High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5972–5976.
- Luby, S.P., Gupta, S.K., Sheikh, M. a., Johnston, R.B., Ram, P.K., and Islam, M.S. (2008) Tubewell water quality and predictors of contamination in three flood-prone areas in Bangladesh. *J Appl Microbiol* **105**: 1002–1008.
- Mallory, M.L., Lindesmith, L.C., Graham, R.L., and Baric, R.S. (2019) GII.4 human norovirus: Surveying the antigenic landscape. *Viruses* **11**: 12–14.
- Marti, E., Variatza, E., and Balcázar, J.L. (2014) Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin*

Bibliografia

Microbiol Infect **20**:

Mattia, D.D. and Manikonda, K. (2018) Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff MMWR Editorial Board. *Surveill Summ MMWR* **6262**: 2009–2015.

McGettigan, S.E., Hu, B., Andreacchio, K., Nachamkin, I., and Edelstein, P.H. (2009) Prevalence of CTX-M β -lactamases in Philadelphia, Pennsylvania. *J Clin Microbiol* **47**: 2970–2974.

Minutilli, E. and Mulè, A. (2016) Merkel cell polyomavirus and cutaneous Merkel cell carcinoma. *Futur Sci OA* **2**: FSO155.

Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R.H., An, P., Pipas, J.M., Jain, K., et al. (2014) Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis* 1–5.

Mohan Raj, J.R., Vittal, R., Huilgol, P., Bhat, U., and Karunasagar, I. (2018) T4-like Escherichia coli phages from the environment carry bla CTX-M. *Lett Appl Microbiol* **67**: 9–14.

Motes, C.M. De, Clemente-casares, P., Hundesa, A., Martín, M., and Girones, R. (2004) Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. **70**: 1448–1454.

Murphy, H.M., THOMAS, M.K., SCHMIDT, P.J., MEDEIROS, D.T., McFADYEN, S., and PINTAR, K.D.M. (2016) Estimating the burden of acute gastrointestinal illness due to Giardia, Cryptosporidium, Campylobacter, E. coli O157 and norovirus associated with private wells and small water systems in Canada. *Epidemiol Infect* **144**: 1355–1370.

Nairn, C., Lovatt, A., and Galbraith, D.N. (2003) Detection of infectious Bovine polyomavirus. *Biologicals* **31**: 303–306.

Nappier, S. P. Status of EPA's Ambient WaterQuality Criteria for Coliphage. Webinar (2015).

Nappier S., E. (2015) Review of Coliphages As Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality 820-R-15-098. 6.

Nappier, S.P. (2015) Status of EPA's Ambient WaterQuality Criteria for Coliphage. *Webinar*.

Nasimul Ahsan (2006) Polyomaviruses and Human Diseases. In, *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

Bibliografía

- Ozawa, K., Oka, T., Takeda, N., and Hansman, G.S. (2007) Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* **45**: 3996–4005.
- Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., et al. (2003) Bloodstream Isolates from Seven Countries : Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3554–3560.
- Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., et al. (2005) Method for Isolation of Bacteroides Bacteriophage Host Strains Suitable for Tracking Sources of Fecal Pollution in Water. *71*: 5659–5662.
- Pedrero, S.P. (2001) Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos.
- Peretti, A., Fitzgerald, P.C., Bliskovsky, V., Buck, C.B., and Pastrana, D. V. (2015) Hamburger polyomaviruses. *J Gen Virol* **96**: 833–839.
- Petterson, S., Grøndahl-Rosado, R., Nilsen, V., Myrmel, M., and Robertson, L.J. (2015) Variability in the recovery of a virus concentration procedure in water: Implications for QMRA. *Water Res* **87**: 79–86.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., et al. (1998) The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* **249**: 307–315.
- Poirel, L., Decousser, J., and Nordmann, P. (2005) IS Ecp1B -Mediated Transposition of bla CTX-M in Escherichia coli. **49**: 1–4.
- Poma, H.R., Rajal, V.B., Blanco Fernández, M.D., Barril, P.A., Giordano, M.O., Masachessi, G., et al. (2013) Evaluation of concentration efficiency of the Pseudomonas aeruginosa phage PP7 in various water matrixes by different methods. *Environ Monit Assess* **185**: 2565–2576.
- Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., and Almeida, A. (2012) Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *J Environ Monit* **14**: 64.
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., et al. (2014a) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples.

Bibliografía

- Antimicrob Agents Chemother* **58**: 606–609.
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., et al. (2014b) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 606–609.
- Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J., and Wuertz, S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* **41**: 1411–1422.
- Rezaeinejad, S., Vergara, G.G.R. V, Woo, C.H., Lim, T.T., Sobsey, M.D., and Gin, K.Y.H. (2014) Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Res* **58**: 122–131.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci Total Environ* **447**: 345–360.
- Rossen, A., Rodríguez, M.I., Laura, A., Conti, R., Fortunato, M.S., Bustamante, A., et al. (2008) Indicadores bacterianos de contaminación fecal en el embalse San Roque (Córdoba , Argentina). **330**: 325–330.
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., et al. (2014) Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res* **59**: 119–129.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., et al. (2011) Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl Environ Microbiol* **77**: 6884–6888.
- Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., et al. (2012) Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 6003–6005.
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., and Gerba, C.P. (2009) Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *J Appl Microbiol* **107**: 1769–1780.
- Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P. a, and Davies-Colley, R.J. (2002) Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1122–1131.

Bibliografía

- Soller, J.A., Schoen, M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., and Ashbolt, N.J. (2010) Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Res* **44**: 4674–91.
- Sorrequieta, A. (2004) “Aguas Residuales : Reuso y Tratamiento . Lagunas de estabilización : una opción para Latinoamérica”. 23, 24.
- Tacão, M., Correia, A., and Henriques, I. (2012) Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: Anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4134–4140.
- Theng-Theng Fong† and Erin K. (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 357–371.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006) ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 296–316.
- Torres, C., Barrios, M.E., Cammarata, R.V., Cisterna, D.M., Estrada, T., Martini Novas, S., et al. (2016) High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Sci Total Environ* **542**: 192–202.
- USEPA. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality.
- Utsumi, T., Lusida, M.I., Dinana, Z., Wahyuni, R.M., Yamani, L.N., Juniastuti, et al. (2017) Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol* **55**: 1–7.
- Vergara, G.G.R. V, Goh, S.G., Rezaeinejad, S., Chang, S.Y., Sobsey, M.D., and Gin, K.Y.H. (2015) Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. *Water Res* **79**: 39–47.
- Vervoort, J., Baraniak, A., Gazin, M., Sabirova, J., Lammens, C., Kazma, M., et al. (2012) Characterization of Two New CTX-M-25-Group Extended-Spectrum β -Lactamase Variants Identified in Escherichia coli Isolates from Israel. *PLoS One* **7**: 1–7.
- Viau, E.J., Goodwin, K.D., Yamahara, K.M., Layton, B.A., Sassoubre, L.M., Burns, S.L., et al. (2011) Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams-Associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res* **45**: 3279–3290.

Bibliografía

- Vignoli, R., Varela, G., Mota, M.I., Cordeiro, N.F., Power, P., Ingold, E., et al. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol* **43**: 2940–2943.
- Vinjé, J. (2015) Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol* **53**: 373–381.
- Wang, Q., Zeng, X., Yang, Q., and Yang, C. (2018) Identification of a bacteriophage from an environmental multidrug-resistant *E. coli* isolate and its function in horizontal transfer of ARGs. *Sci Total Environ* **639**: 617–623.
- Wilhelmi, I., Roman, E., and Sánchez-Fauquier, a. (2003) Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* **9**: 247–262.
- Wilrich C and Wilrich PT. (2009) Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J AOAC Int (J AOAC INT)*.
- Wong K1; Xagorarakis I. Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Wyn-Jones, A.P. and Sellwood, J. (2001) A review: Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* **91**: 945–962.
- Yahya, M., Hmaied, F., Jebri, S., Jofre, J., and Hamdi, M. (2015) Bacteriophages as indicators of human and animal fecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. *J Appl Microbiol*.
- Yosapal, M., Sugiyama, M., and Asai, T. (2017) The occurrence of CTX-M-25-producing Enterobacteriaceae in day-old broiler chicks in Japan. *J Vet Med Sci* **79**: 1644–1647.
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., and Monroe, S.S. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**: 312–323.

10 ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Los resultados de este trabajo de Tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos científicos:

Barrios ME, Blanco Fernández MD, Cammarata RV, Torres C, Mbayed VA. Viral tools for detection of fecal contamination and microbial source tracking in wastewater from food industries and domestic sewage. *J Virol Methods* 262:79-88, 2018. *Se adjunta separata.*

Barrios ME, Blanco Fernández MD, Cammarata RV, Torres C, Power P, Mbayed VA. Antibiotic resistance genes into bacterial and bacteriophages fraction isolated from domestic and industrial wastewaters. *Se adjunta resumen.*