



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)
ÁREA BIOLOGÍA. SUB-ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**ANÁLISIS DE LAS FUENTES DE CONTAMINACIÓN FECAL MEDIANTE EL
USO DE INDICADORES VIRALES ESPECIE ESPECÍFICOS EN LAS
CUENCAS DE LOS RÍOS SANTA LUCÍA Y URUGUAY**

Estudiante: VIVIANA BORTAGARAY GALLUZO

Tutor: MATÍAS VICTORIA MONTERO

Co-Tutor: FERNANDO LÓPEZ TORT

Setiembre de 2018, Salto, Uruguay

*A la memoria de mi abuela Maruja,
quien me enseñó que con trabajo y
amor, todo se puede lograr.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la educación pública uruguaya, por permitirme alcanzar una formación de posgrado mediante PEDECIBA y por la posibilidad de formar parte de un equipo maravilloso de trabajo liderado por el Dr. Rodney Colina en el Laboratorio de Virología Molecular de Salto. También agradezco a la actual campaña de descentralización y regionalización de la UDELAR por la que pude formarme y trabajar en mi ciudad (Salto). Agradecer a CSIC por financiar el proyecto que me permitió desarrollar mi trabajo de maestría y en especial a las Dras. Mabel Berois y Claudia Piccini por colaborar en el proyecto.

A mis tutores: los Dres. Matías Victoria y Fernando López Tort, por todas las horas que me dedicaron, por la paciencia y por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencias.

A mis compañeros del laboratorio que me bancan todos los días y en especial a Leticia Maya, que un día se acordó que había una salteña que era bióloga, consiguió mi teléfono y desde ese día estoy aquí.

A mi familia, la de Salto y la de Buenos Aires por todo su apoyo y muy en especial a mi esposo y compañero de camino que me hizo el aguante siempre y muy especialmente a mi Lorenzo que se bancó varias semanas sin su mamá porque andaba de cursos por otras ciudades.

También quiero agradecer a Beatriz Centurión, mi profesora de didáctica, por su paciencia y comprensión.

Agradecer especialmente a las Dras. Marize Miagostovich y Viviana Mbayed por brindarme amablemente controles positivos para mis ensayos y también a las Dras. María del Pilar Díaz y Sonia Pou por la colaboración en los análisis estadísticos.

También agradecer a los integrantes del tribunal: Dra. Claudia Piccini, Dr. Rodrigo Puentes y Dr. Santiago Mirazo por su participación.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Virología Ambiental.....	8
1.2 Virus entéricos y su transmisión hídrica.....	10
1.3 Rastreo de la fuente microbiana (MST).....	11
1.4 Técnicas de concentración y detección viral.....	16
1.5 Adenovirus.....	19
1.5.1 Clasificación.....	19
1.5.2 Replicación viral.....	19
1.5.3 Epidemiología.....	20
1.6 Poliomavirus.....	22
1.6.1 Clasificación.....	22
1.6.2 Replicación.....	23
1.6.3 Epidemiología.....	24
1.7 Rotavirus.....	27
1.7.1 Clasificación.....	27
1.7.2 Replicación.....	28
1.7.3 Epidemiología.....	30
2. HIPÓTESIS.....	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo general.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1 Puntos de muestreo.....	37
4.2 Concentración viral.....	39
4.3 Estandarización de las PCR cuantitativas.....	39
4.4 Extracción del ácido nucleico y síntesis del ADN copia (ADNc).....	40
4.5 PCR cuantitativa (qPCR).....	40
4.6 PCR cualitativa (cPCR).....	42
4.7 ICC-qPCR.....	45
4.8 Secuenciación y análisis filogenético.....	46
4.9 Coliformes fecales.....	46
4.10 Análisis estadístico.....	47
4.11 Variables Ambientales.....	47
5. RESULTADOS.....	48
6. DISCUSIÓN.....	68
7. PERSPECTIVAS.....	79
8. BIBLIOGRAFÍA.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de transmisión de los virus entéricos.....	9
Figura 2. Regiones agropecuarias del Uruguay.....	34
Figura 3. Puntos de muestreo en el Río Santa Lucía y Uruguay.....	38
Figura 4. Validación del método de concentración viral.....	48
Figura 5. Estandarización de la qPCR de HAdV.....	49
Figura 6. Estandarización de la qPCR de PAdV.....	49
Figura 7. Estandarización de la qPCR de HPyV.....	50
Figura 8. Estandarización de la qPCR de BoPyV.....	50
Figura 9. Estandarización de la cPCR de HAdV.....	51
Figura 10. Estandarización de la cPCR de BoPyV.....	51
Figura 11. Estandarización de la cPCR de HPyV.....	52
Figura 12. Concentración de HAdV, HPyV, BoPyV y RVA según el punto de muestreo, la fecha de colecta y las variables ambientales para el Río Santa Lucía.....	58
Figura 13. Concentración de HAdV, BoPyV y RVA según el punto de muestreo, la fecha de colecta y las variables ambientales para el Río Uruguay.....	60
Figura 14. Árbol filogenético de HAdV detectados mediante la ICC-qPCR.....	64
Figura 15. Árbol filogenético del RVA detectado durante el monitoreo.....	65
Figura 16. Cuantificación de los coliformes fecales según el punto de muestreo y la fecha de colecta para los ríos Santa Lucía y Uruguay.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de HAdV, HPyV, BoPyV y RVA detectados en los ríos Santa Lucía y Uruguay.....	53
Tabla 2. Cuantificación de HAdV, HPyV, BoPyV y RVA detectados en los ríos Santa Lucía y Uruguay.....	55
Tabla 3. Modelo de regresión logística para los virus humanos (HAdV, HPyV) y animales (BoPyV).....	62

RESUMEN

La contaminación fecal de las cuencas hidrográficas puede originar consecuencias graves para el medio ambiente y la salud pública. Es fundamental que estas fuentes de contaminación fecal sean rápida y precisamente identificadas para desarrollar estrategias de remediación. Este trabajo tuvo como objetivos determinar el origen, ya sea humano, bovino o porcino, de las diferentes fuentes de contaminación fecal en aguas de las cuencas del Río Santa Lucía y del Río Uruguay, mediante el uso de indicadores virales especie-específicos así como también analizar los Rotavirus (RV) presentes en esas aguas superficiales. Entre junio de 2015 y mayo de 2016, se realizó un muestreo mensual en seis puntos geográficos diferentes en la cuenca del Río Santa Lucía y en cuatro de la cuenca del Río Uruguay, constituyendo un total de 120 muestras. Para la concentración viral se utilizó el método de adsorción-elución con membrana cargada negativamente y para la extracción de los ácidos nucleicos el kit *QIAmp Cador Pathogen*. Para RV se realizó la síntesis del cDNA con iniciadores hexaméricos randómicos. Luego se efectuó la detección y la cuantificación de Adenovirus Humano (HAdV) y Porcino (PAdV), Poliomavirus Humano (HPyV) y Bovino (BoPyV) y RV del grupo A (RVA) por PCR cuantitativa (qPCR). RVA fue el más frecuentemente detectado con 37% de positividad (44/120), seguido de HAdV con 18% (21/120), BoPyV con 10% (12/120) y HPyV en un 3% (3/120), mientras que no se detectó PAdV. La concentración media para RVA fue de 1,5E+05 copias genómicas por litro (cg/L), para HAdV fue de 1,5E+04 cg/L, para BoPyV fue de 1,1E+04 cg/L y para HPyV fue de 1,8E+02 cg/L. Para poder identificar a los HAdV infectivos utilizamos la técnica de Cultivo Celular integrado a la qPCR (ICC-qPCR), donde dos de 10 muestras inoculadas resultaron infectivas y pertenecientes al HAdV especie B subtipo 3 mediante el análisis filogenético. Estos resultados identificaron una contaminación fecal tanto humana como bovina que impacta negativamente en la calidad del agua de estos ríos, sugiriendo carencias en el descarte de los desechos de materia fecal de las ciudades y de las áreas ganaderas de estas cuencas siendo un riesgo constante para las personas que habitan allí o utilizan sus aguas para diferentes propósitos como por ejemplo la recreación y el riego.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Virología Ambiental

La Virología Ambiental es una disciplina dentro del área de la Virología que estudia a los virus presentes en diferentes matrices encontradas en el ambiente como pueden ser las aguas ambientales, siendo estas superficiales, subterráneas, oceánicas y residuales urbanas; en fómites como por ejemplo en superficies hospitalarias; en alimentos, principalmente aquellos que se consumen crudos o semicrudos como las ostras; y en el aire. Esta disciplina también estudia la persistencia de estos virus y su circulación en el ambiente y a través de cuales vías pueden llegar a entrar en contacto con un individuo susceptible poniendo su salud en riesgo (Asano & Cotruvo, 2004; Sattar et al., 2004; Carter et al., 2005; Verreault et al., 2008; Sinclair et al., 2009).

Una de las principales líneas de investigación dentro de la Virología Ambiental es el análisis de la presencia de los virus entéricos humanos y su transmisión hídrica. Estos virus conforman una lista muy extensa y diversa y que aún no se conoce en su totalidad (Aw et al., 2014). En este sentido, esta disciplina estudia, entre otras cosas, la incidencia y comportamiento de los virus en las distintas matrices acuáticas, el riesgo de infección de un individuo que entra en contacto con estas aguas, la eficiencia de los procesos de tratamiento y desinfección de aguas residuales y también aporta conocimiento al monitoreo rutinario de la calidad del proceso de potabilización del agua (Bosch et al., 1998; Carter et al., 2005; Bosch et al., 2008).

El agua residual contiene principalmente virus entéricos excretados por pacientes pediátricos o adultos mayores con gastroenteritis aguda (GA), que son los grupos etarios más afectados por estos virus, pero también contiene: i) virus excretados por individuos de todas las edades, sean estos sintomáticos o asintomáticos, ii) virus de origen animal, debido a que las personas generalmente desechan las heces de los animales domésticos en la red de saneamiento de sus hogares; siendo que algunas de estas cepas animales puede tener un potencial zoonótico importante, como por ejemplo el Rotavirus (RV) del grupo A (RVA). El agua residual es una de las fuentes de diseminación de virus entéricos más importante, en las cuales grandes

volúmenes en altas concentraciones de estos virus son eliminados diariamente a través del sistema de saneamiento hacia las redes de aguas cloacales y plantas de tratamiento de agua residual (cuando existen), para luego ser volcadas a cuerpos receptores en el ambiente como son los ríos, arroyos, lagos, estuarios, mares y océanos. Muchos de estos cuerpos de agua luego son utilizados como fuente de agua de consumo humano, para riego en campos de agricultura, para lavado de frutas y hortalizas (que generalmente se consumen crudos), para el cultivo de alimentos (por ejemplo, mariscos que generalmente también se consumen crudos o semicrudos) y para actividades recreacionales (zonas de playa, pesca y deportes acuáticos). De esta manera, los virus entéricos de transmisión hídrica son una de las principales causas de enfermedades relacionadas con el agua ya que luego de ser excretados por personas afectadas, llegan al cuerpo receptor y de éste nuevamente a la población cerrando el ciclo de transmisión (Figura 1) (Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998, 2008; Carter, 2005).

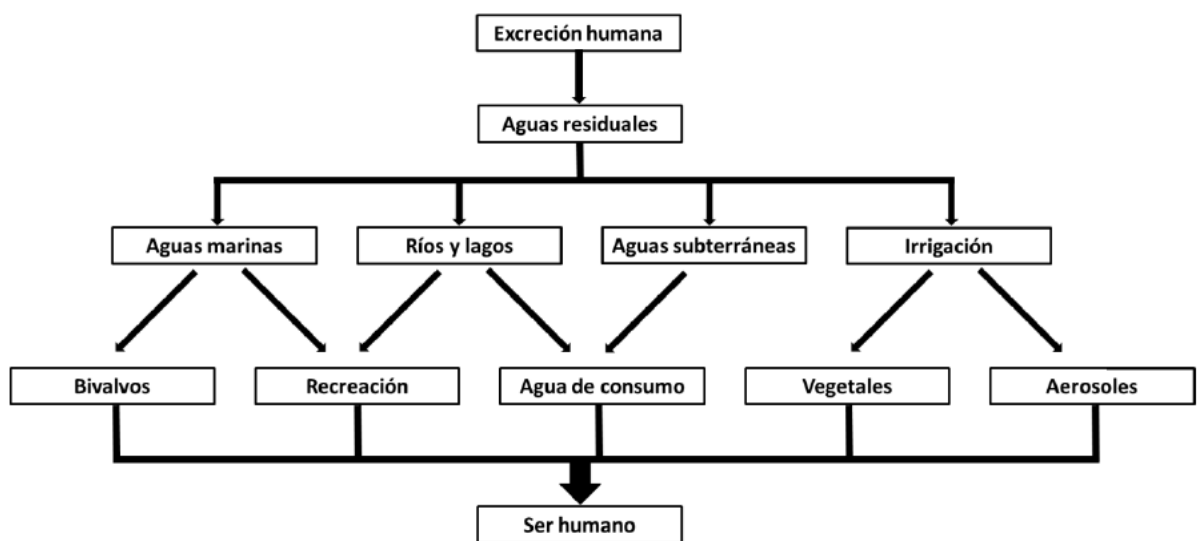


Figura 1. Esquema que representa las principales rutas de transmisión de los virus entéricos entre humanos a través del vertido de aguas residuales a sus cuerpos receptores (adaptado de Bosch et al., 1998).

Es por lo anteriormente expuesto, que la contaminación fecal de las aguas ambientales impacta directamente en la salud pública y la economía de los países (Roslev & Bukh, 2011). Las aguas ambientales son susceptibles a la

contaminación fecal por una amplia gama de fuentes puntuales y difusas. Las fuentes puntuales de contaminación fecal son aquellas que provienen de una causa o actividad claramente identificable en un punto o área definida de una cuenca, como lo son los efluentes de industrias y aguas residuales urbanas y de tambos o criaderos de cerdos. Por otro lado, las fuentes difusas de contaminación fecal son las provenientes de actividades que ocupan áreas importantes y extensas, como lo son la ganadería extensiva. Como resultado de las numerosas fuentes potenciales de contaminación, muchos cuerpos de agua con frecuencia contienen trazas de materia fecal originadas a partir diferentes especies (Roslev & Bukh, 2011).

La identificación rápida y precisa de las fuentes de contaminación fecal es esencial para una evaluación correcta de los riesgos para la salud humana, y para la implementación de medidas de remediación de la contaminación. Para esto se han desarrollado diferentes herramientas para establecer el rastreo de la fuente microbiana (*Microbial Source Tracking*, MST) en ambientes acuáticos, principalmente a través de la identificación de indicadores bacterianos y virales asociados con la materia fecal de un hospedero específico (Wong et al., 2012).

De esta manera, la vigilancia ambiental de los virus entéricos, principalmente mediante el uso de técnicas moleculares, es una herramienta muy útil y potente para obtener un panorama completo de la diversidad genética viral que circula y puede poner en riesgo la salud de los individuos de la población. Así, se pueden obtener datos que reflejen por si solos (o complementen estudios realizados con muestras clínicas de pacientes con gastroenteritis aguda), los virus entéricos que están infectando una población específica en un tiempo y lugar determinado, permitiendo realizar estudios de epidemiología molecular de estos virus en dicha población. (Metcalf et al., 1995; Bosch et al., 1998, 2008; Carter et al., 2005).

1.2 Virus entéricos y su transmisión hídrica

Los virus entéricos son un grupo de virus que infectan y eventualmente replican en el tracto gastrointestinal del hospedero causando diferentes enfermedades tales como gastroenteritis, encefalitis o hepatitis virales. Estos

virus se transmiten a través de la ruta fecal oral siendo excretados en altas concentraciones en la materia fecal de los individuos infectados y llegando muchas veces a contaminar diferentes cuerpos de agua a través del impacto de las aguas residuales, resultando en una nueva fuente de infección. Por estas características, estos virus presentan lo que se denomina transmisión hídrica (Bosch et al., 2008).

Los virus entéricos han sido propuestos como promisorias herramientas para el estudio del MST. La principal ventaja que tiene su utilización como marcadores de MST es que estos virus entéricos de diferentes especies hospedadoras son identificados y diferenciados en base al análisis de genes virales especie-específicos, además de ser más resistentes que los indicadores bacterianos a condiciones adversas del ambiente (Chan et al., 2006).

Existen actualmente identificados más de 150 virus entéricos, de los cuales los más frecuentemente reportados con riesgo para la salud humana son los Adenovirus (AdV), Polyomavirus (PyV), Enterovirus (EV), Norovirus (NoV), RVA y los virus de la hepatitis A y E (HAV y HEV) (Katayama et al., 2002; Borchardt et al., 2003; Haramoto et al., 2005; Fong et al., 2007; Xagorarakis et al., 2007; Kuo et al., 2010).

Cabe resaltar que numerosos estudios a nivel mundial evidencian la resistencia de los virus entéricos a los diversos tratamientos realizados para mejorar la calidad del agua residual previo a su descarga en los cursos naturales de agua como por ejemplo los ríos. También se ha demostrado que incluso éstos pueden conservar su capacidad infectiva en los efluentes resultantes de los diferentes tratamientos (Morsy El-Senousy et al., 2007; Schlindwein et al., 2010; Francy et al., 2012; Kitajima et al., 2014).

1.3 Rastreo de la fuente microbiana (MST)

Dentro de la Virología Ambiental existe un tipo de análisis conocido como MST por sus siglas en inglés "*Microbial Source Tracking*" o en español rastreo de la fuente microbiana. Este tipo de estudio tiene como objetivo determinar el origen de las fuentes puntuales de contaminación fecal en las aguas ambientales (Wiggins et al., 1996; Parveen et al., 1997; Hagedorn et al.,

1999; Scott et al., 2005; Field & Samadpour., 2007; Stoeckel & Harwood., 2007; Harwood et al., 2009).

El surgimiento de esta área de investigación se deriva de la necesidad de: i) determinar cuál es el origen (por ejemplo, humano, canino, bovino, porcino) de la contaminación fecal, ii) hasta donde influye la contaminación fecal en la salud humana o que riesgo presenta para ésta, y iii) determinar la carga de los indicadores de contaminación fecal en los cuerpos de agua para poder así tomar medidas para reducir o eliminar las fuentes de contaminación fecal (Field & Samadpour, 2007; Harwood et al., 2009).

Los métodos de MST más comúnmente utilizados se basan principalmente en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), donde se pueden incluir por ejemplo marcadores de *Bacteroides* específicos del huésped (Bernhard & Field, 2000; Gourmelon et al., 2007), marcadores de genes de toxina / virulencia (Khatib et al., 2003; Scott et al., 2005), y marcadores específicos del huésped (es decir, virus de humanos y animales) (Fong et al., 2005; McQuaig et al., 2006).

Más de 100 tipos de virus entéricos podrían estar presentes en aguas ambientales debido a la contaminación fecal (Lee & Kim, 2002; Haramoto et al., 2005). Se ha informado que estos virus pueden permanecer infectivos por períodos prolongados (de 100 a 130 días) en aguas ambientales (Wetz et al., 2004).

Frecuentemente, la calidad microbiológica de las aguas ambientales es evaluada por medio de la utilización de indicadores fecales bacterianos tales como *Escherichia coli*, *Enterococcus* y *Clostridium perfringens*. La presencia de elevados niveles de estos indicadores sugiere una contaminación fecal y riesgos potenciales para la salud pública. Sin embargo, muchas veces es difícil asociar la bacteria indicadora a una fuente particular de contaminación debido a la naturaleza ubicua de estos microorganismos. Es por esto que el uso de los virus indicadores de contaminación fecal especie-específicos son una herramienta alternativa para evaluar la contaminación fecal (Gordon 2001; Field & Samadpour, 2007). Identificar el origen de la contaminación fecal también puede ayudar en la remediación y esfuerzos de prevención de la contaminación con el objetivo de mejorar la calidad del agua (Hughes et al., 2017).

Actualmente se sugiere realizar en paralelo tanto el análisis de los virus entéricos (utilizados como indicadores virales) como el análisis de los indicadores bacterianos, ya que no existe una clara correlación entre estos dos tipos diferentes de indicadores de contaminación fecal. El análisis clásico de los indicadores bacterianos debería ser complementado con el análisis de estos virus para poder obtener un panorama más completo de los riesgos de infección que presentan los diferentes cuerpos acuáticos para el humano ya sea mediante su uso recreativo, para riego o consumo (Wyn-Jones et al., 2011; Hewitt et al., 2013).

El estudio de MST se puede realizar mediante dos estrategias básicas: las estrategias conocidas como “dependientes de la biblioteca”, las cuales abarcan análisis que requieren la recopilación y la tipificación de muchos aislamientos de fuentes bacterianas indicadoras de contaminación con algún atributo de identificación, como por ejemplo: la resistencia a algún antibiótico (Parveen et al., 1997; Harwood et al., 2000), la utilización de la fuente de carbono (Hagedorn et al., 1999), o el tipo genético (Parveen et al., 1997; Moore et al., 2005). Por otro lado, se encuentran los análisis conocidos como “independientes de la biblioteca”, que se basan en una característica particular de una especie o tipo de bacteria específica, como por ejemplo, una región variable del gen 16S rRNA de los *Bacteroides* (Bernhard & Field, 2000b).

Para realizar los estudios de MST, se debe tener en cuenta el número y rango de las fuentes de contaminación fecal, o de las especies que suponemos son las contaminantes ya que deben elegirse deliberadamente según el cuerpo de agua que estemos analizando así como también las preguntas particulares asociadas con él (Harwood & Stoeckel, 2011).

Aguas ambientales incluyendo lagos, ríos y arroyos son frecuentemente susceptibles a la contaminación fecal por parte de un rango amplio de fuentes puntuales o difusas, con contribuciones potenciales de especies salvajes, animales domésticos y seres humanos (Roslev & Bukh, 2011).

La contaminación por animales domésticos incluye residuos fecales de mascotas y de la industria pecuaria, así como la escorrentía superficial agrícola. Los residuos fecales humanos pueden entrar en las aguas ambientales a través de desbordes de fosas sépticas, fugas de alcantarillado y de los sistemas sépticos, plantas de tratamiento de aguas residuales y de las

salidas de aguas residuales industriales. Como resultado de las numerosas fuentes potenciales de contaminación, muchos cuerpos de agua frecuentemente contienen trazas de material fecal de diferentes fuentes (Roslev & Bukh, 2011).

Las herramientas de MST han sido desarrolladas para el rastreo de la fuente de contaminación fecal en ambientes acuáticos por medio de la identificación de indicadores microbianos o químicos asociados a la materia fecal de un hospedero específico (Wong et al., 2012).

La elevada estabilidad molecular y funcional de los virus entéricos indicadores de contaminación fecal en el ambiente, la especificidad del hospedero y la alta prevalencia a nivel mundial a lo largo del año, permiten el uso de metodologías de biología molecular altamente sensibles, específicas y rápidas como la PCR cuantitativa (qPCR) y cualitativa (cPCR) para la identificación y cuantificación viral específica (Bofill-Mas et al., 2013). Actualmente, basado en las características mencionadas anteriormente, son utilizados los AdV y PyV que infectan diferentes mamíferos (humano, bovino y porcino) como marcadores virales especie-específicos para realizar estudios de MST en diferentes matrices ambientales (Hernroth et al., 2002; Pal et al., 2006; Hundesa et al., 2009). La principal limitación de la detección viral por qPCR, es su incapacidad para diferenciar entre virus infecciosos y no infecciosos. Sin embargo, el Cultivo Celular Integrado a la qPCR (ICC-qPCR) es una técnica ampliamente utilizada para detectar a los virus infecciosos con alta sensibilidad (Cromeans et al., 2008).

Un indicador viral comúnmente utilizado de la contaminación fecal humana en el agua y para evaluar la eficacia del tratamiento de aguas residuales, es el AdV humano (HAdV) (Harwood et al., 2005; Bofill-Mas et al., 2013). La utilidad de HAdV como indicador virológico de la calidad del agua se atribuye a: (1) su estabilidad, persistencia y amplia distribución en diferentes matrices acuáticas, como aguas residuales, ríos y agua potable (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006; Haramoto et al., 2007; Katayama et al., 2008; Dong et al., 2010); (2) su alta resistencia a los rayos ultravioleta (UV) para su desinfección (Thurston-Enriquez et al., 2003; Nwachuku et al., 2005; Linden et al., 2007); (3) su mayor abundancia en relación con otros virus entéricos en el ambiente (Katayama et al., 2008; La Rosa et al., 2010; Simmons & Xagorarakis, 2011; Poma et al.,

2012); (4) la disponibilidad de ensayos de cultivo y herramientas de detección molecular y la facilidad de detección en comparación con los virus de genoma de ARN (Jiang, 2006; Ogorzaly et al., 2013a); y (5) que sea el ser humano el hospedero específico (pudiéndose inferir contaminación fecal humana donde sea detectado) (Fong & Lipp, 2005; Wong et al., 2012).

En los últimos años, muchos trabajos han estudiado a los PyV humanos (HPyV) como indicadores fecales especie-específicos, ya que son excretados persistentemente por individuos infectados con y sin síntomas clínicos por intermedio de las heces y la orina (Bofill-Mas et al., 2001). Por lo tanto, han sido propuestos como indicadores de contaminación de aguas residuales debido a su prevalencia en el medio ambiente, la resiliencia ambiental y por ser especie-específicos; siendo comúnmente detectados en todas las áreas geográficas a lo largo del año (Pina et al., 1998; Koralnik et al., 1999; Bofill-Mas et al., 2000, 2006, 2013; Albinana-Gimenez et al., 2009; Schlindwein et al., 2010; Kokkinos et al., 2011; Rodríguez-Manzano et al., 2012). En un estudio realizado utilizando la técnica de PCR, Harwood y colaboradores (2009) observaron que el HPyV fue el marcador humano más específico entre varias herramientas analizadas para MST.

Algunos estudios también utilizan indicadores fecales virales no humanos para rastrear otras fuentes de contaminación fecal de diferentes orígenes como puede ser la bovina, ovina, porcina y aviar (Hundesda et al., 2009, 2010; Carratalá et al., 2012; Rusiñol et al., 2013). Los Poliomavirus Bovino (BoPyV) y Ovino (OPyV) tienen una amplia distribución entre el ganado, aunque no producen enfermedades clínicamente graves (Hundesda et al., 2010; Rusiñol et al., 2013).

El AdV porcino (PAdV), es un virus de ADN bicatenario que es abundantemente excretado en las heces de los cerdos por lo que se ha sugerido como un indicador y marcador para el rastreo de las fuentes de contaminación fecal de origen porcino en aguas ambientales (Jiménez-Clavero et al., 2003; Hundesda et al., 2009). Estudios realizados en mataderos de cerdos han demostrado que podrían ser utilizados como virus indicadores de contaminación fecal de origen porcino (Jones et al., 2017). Los PAdV están ampliamente distribuidos en la población porcina, pero no producen

enfermedades graves. Sumado a lo mencionado anteriormente, estos virus presentan una amplia distribución (Ishibashi & Yasue, 1984).

Una herramienta de MST útil debe ser sensible para estos virus, ya que a pesar de ser excretados en altas concentraciones en la materia fecal y orina, se encuentran generalmente diluidos en las aguas ambientales presentando bajas concentraciones virales (Stoeckel & Harwood, 2007; Harwood & Stoeckel, 2011).

1.4 Técnicas de concentración y detección viral

La detección de los virus en el medio ambiente requiere previamente de la concentración de partículas virales en pequeños volúmenes. La implementación de métodos de concentración viral a partir de diferentes matrices ambientales tales como aguas o sedimentos, constituyen una poderosa herramienta para lograr una eficiente detección de estos virus que, a pesar de ser excretados en altos títulos, se encuentran presentes en bajas concentraciones en la mayoría de los diferentes cuerpos de aguas, incapaces de ser detectados sin este paso previo de concentración (Albinana-Gimenez et al, 2009; Hamza et al., 2009).

La elección del método de concentración a ser utilizado está determinada por las características del agua, así como también el volumen de la muestra y las propiedades del virus. Por ejemplo, para virus tales como los Norovirus y Enterovirus, se ha observado una recuperación de manera más eficiente cuando se utilizan métodos de concentración con filtro (Cashdollar et al., 2013).

Una serie de técnicas de concentración se utilizan a menudo consecutivamente para reducir el volumen de la muestra. La concentración primaria se utiliza para reducir la mayor parte del volumen de la muestra de agua, generalmente en al menos 100 veces (100X). Al procesar muestras de agua de gran volumen (10-100 L) se utilizan filtros microporosos o ultrafiltración de fibra hueca (HFUF) comúnmente para una concentración primaria. En tales casos, el eluído primario tiene un volumen de 300 ml a 1,6 litros. El volumen de muestra se reduce aún más utilizando un paso de concentración secundaria (por lo general en al menos 10 veces, 10X), lo que mejora la representación de

la muestra y la precisión de la estimación de los números de virus que están presentes en el ambiente muestreado (Ikner et al., 2012; Brinkman et al., 2013). En un paso para una concentración terciaria se puede reducir el volumen de muestra aún más, particularmente para el análisis molecular donde se analiza un menor volumen de muestra en comparación con los métodos de cultivo (USEPA-1615, 2012). Los métodos utilizados para la concentración secundaria y terciaria incluyen la floculación orgánica, concentración con celita, precipitación con polietilenglicol (PEG), filtros y ultracentrifugación. Estos métodos también se usan como el principal método de concentración cuando son analizados volúmenes pequeños como lo son los estudios en aguas residuales no tratadas (1 L) y tratadas (1-10 L) (Rames et al., 2016).

En los métodos de adsorción-elución que utilizan filtros con carga electropositiva o electronegativa, el agua es filtrada a través de un disco o cartucho, los virus se adsorben en la superficie del filtro y luego se eluyen del filtro utilizando extracto de carne o un buffer alcalino (APHA, 2012). A pesar del diámetro del poro del filtro ser mayor que el diámetro de los virus estudiados, éstos se retienen en el filtro mediante las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que se dan entre los virus y el filtro. La mayoría de los virus tienen una carga negativa en aguas ambientales y se unen a los filtros con carga positiva. Para la adsorción a los filtros con carga negativa, el pH se reduce por debajo del punto isoeléctrico viral, de modo que la carga viral se vuelve positiva; o alternativamente se utilizan cationes multivalentes para la adsorción a través de puentes de sal (Gerba, 1984, APHA, 2012; Ikner et al., 2012).

Los filtros de cartucho se utilizan generalmente para la concentración primaria de muestras de agua de gran volumen (10-1000 litros) a partir de ríos y lagos. Los filtros de disco se utilizan para volúmenes más pequeños de hasta 10 litros. Una vez que tenemos los virus entéricos concentrados en pequeños volúmenes de nuestra muestra original, procedemos a la detección viral propiamente dicha. Los métodos de detección basados en cultivos celulares son actualmente los únicos métodos disponibles para detectar virus entéricos viables o infecciosos, y, por lo tanto, son más aceptados por la industria del agua para realizar los análisis cuantitativos de riesgo microbiológico (QMRA) (Keegan et al., 2009; Rodríguez et al., 2013b).

Los métodos de cultivo dependen de la capacidad de los virus de replicar en líneas celulares permisivas de mamíferos (Rames et al., 2016). La combinación de la metodología de detección viral de la PCR con el cultivo celular para detectar la infectividad viral en las líneas celulares, conocida como ICC-PCR, es más rápida y sensible en comparación con los enfoques convencionales que utilizan exclusivamente el cultivo celular (Fongaro et al., 2013; Ogorzaly et al., 2013a; Rodríguez et al., 2013b). Cuando el método se usa para detectar y cuantificar el ADN viral por qPCR también conocida como *PCR real time*, la prueba se conoce como ICC-qPCR. Cuando el ARN mensajero (ARNm) viral (producido por los intermediarios replicativos) es cuantitativamente detectado, la prueba se conoce como ICC-RT-qPCR, ya que el proceso incluye un paso intermedio de transcripción reversa. En el método ICC-RT-qPCR (Rodríguez et al., 2013b), la señal está relacionada con la concentración de virus infecciosos al cuantificar el ARNm viral. Ogorzaly y colaboradores (2013a) describen que la detección de muestras positivas para virus en cultivos celulares mediante qPCR es más sensible en comparación con la PCR tradicional. Además se han reportado límites de detección similares para la ICC-qPCR con respecto a la ICC-RT-qPCR (Rames et al., 2016).

Tanto la sensibilidad como la precisión en las estimaciones de los HAdV infectivos se ven afectados significativamente por la línea celular utilizada en el análisis. Esto se debe a que los serotipos de HAdV varían notablemente en su capacidad de propagarse en diferentes líneas celulares (Ogorzaly et al., 2015). La línea celular A549 (carcinoma de pulmón humano, Giard et al., 1973) a menudo se ha utilizado para cuantificar partículas infectivas de HAdV en agua. HAdV de las especies A, B y C infectan y replican en la línea celular A549 pudiendo ser detectados mediante técnicas moleculares (Ogorzaly et al., 2015). Para llevar a cabo la detección de los virus indicadores de contaminación fecal especie-específicos mediante el uso de qPCR, hay que tener en cuenta diversos aspectos importantes que incluyen los efectos de los inhibidores ambientales de las reacciones enzimáticas, la elección del método de extracción de ADN, los cebadores y la sonda seleccionada para el análisis. La sensibilidad de la qPCR puede verse afectada de manera importante por la presencia de inhibidores ambientales, como lo son

los ácidos húmico y fúlvico presentes en el agua (Aw & Rose, 2012; Schrader et al., 2012).

1.5 Adenovirus

1.5.1 Clasificación

Los AdV pertenecen a la familia *Adenoviridae*, poseen un genoma de ADN doble cadena de aproximadamente 35.000 pares de bases (pb) y una cápside icosaédrica sin envoltura de 90-100 nanómetros (nm) de diámetro con proyecciones en forma de fibra desde cada vértice que presenta 252 capsómeros. Las proteínas menores de la cápside son la IIIa, VIII y IX (Berk, 2013).

Esta familia está compuesta por 5 géneros que son: los *Mastadenovirus* que infectan mamíferos; los *Aviadenovirus* que infectan aves; los *Atadenovirus* que infectan aves, reptiles, rumiantes y marsupiales; los *Siadenovirus* que infectan aves y reptiles; y los *Ichtadenovirus* que infectan a los esturiones. Los adenovirus que infectan a los humanos están clasificados dentro de los *Mastadenovirus* que por su parte se divide en 7 especies que van de la A a la G (Berk, 2013).

Su genoma contiene una unidad de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), cuatro unidades de transcripción intermedia (IX, IVa2, L4 intermedio y E2 tardío) y una unidad de transcripción tardía que se procesa para generar 5 familias de mRNAs tardíos (L1-L5), los cuales son todos transcriptos por la ARN polimerasa II. En sus extremos posee repetidos invertidos que funcionan como orígenes de replicación. La unidad de transcripción tardía codifica para las proteínas estructurales, mientras que las otras dos unidades restantes codifican para las proteínas no estructurales implicadas en la replicación, traducción, transcripción, inducción de la apoptosis y en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Berk, 2013).

1.5.2 Replicación viral

Los adenovirus replican en el núcleo de la célula. Su ciclo replicativo se divide en 2 fases: una temprana y una tardía que comienza con la replicación del ADN viral (Berk, 2013).

Los eventos de la fase temprana comienzan tan pronto como el virus infeccioso interactúa con la célula hospedera. Estos incluyen la adsorción, la penetración, el movimiento de las partículas virales parcialmente sin recubrir a través del Complejo del Poro Nuclear (CPN), el transporte del ADN viral a través del CPN al núcleo y la expresión de un conjunto de genes tempranos. La fase temprana tiene como objetivos inducir a la célula a entrar en la fase S del ciclo celular y sintetizar productos génicos virales necesarios para la replicación del ADN. No existe una distinción funcional tan clara entre el fin de la fase temprana y el comienzo de la tardía ya que los genes tempranos continúan expresándose tardíamente y el promotor que controla la expresión de la unidad tardía de transcripción dirige un nivel basal de expresión al comienzo de la infección. La fase tardía comprende la replicación del ADN, la expresión de los genes tardíos y el ensamblado de la progenie viral. La replicación del ADN es semiconservativa y continua desplazando la hebra complementaria; además de las proteínas virales también requiere de las proteínas celulares (Berk, 2013).

La replicación del ADN viral, junto con la producción de grandes cantidades de polipéptidos virales estructurales, preparan el escenario para el ensamblaje de los nuevos viriones. Además de suprimir la traducción del ARNm de la célula huésped, estimula la traducción de ARNm virales tardíos y facilita el plegado del exón y el ensamblaje de los trímeros. Luego son importados al núcleo, donde ocurre el ensamblaje del virión. El ADN se empaqueta en cápsides de forma polarizada comenzando por el extremo izquierdo del genoma. Luego del ensamblaje de una progenie de alrededor de 100.000 viriones, ocurre la lisis celular, liberándolos para llevar a cabo otro ciclo de infección (Berk, 2013).

1.5.3 Epidemiología

Estudios realizados muestran que los adenovirus son responsables del 5% al 15% de los casos de gastroenteritis en recién nacidos y niños en edad preescolar (Özdemir et al., 2010; Tebruegge et al., 2012).

Los HAdV están asociados con varias enfermedades como ser gastroenteritis, enfermedades respiratorias, cistitis hemorrágica y conjuntivitis. Los HAdV subtipo 40 y 41 han sido documentados como uno de los principales agentes causales de gastroenteritis viral aguda en niños (Ariga et al., 2004). Son responsables de solo una pequeña porción de la morbilidad total en la población general, y de alrededor del 5% al 10% de las enfermedades respiratorias en niños. También son responsables de brotes epidémicos en hogares de ancianos y entre los militares. En pacientes inmunocompetentes, los adenovirus generalmente causan una infección aguda con un efecto leve. Sin embargo, en recién nacidos y pacientes inmunodeprimidos, los adenovirus pueden causar neumonía fulminante, hepatitis y/o encefalitis (Özdemir et al., 2010).

La infección por adenovirus puede ser causada por el consumo de alimentos o aguas contaminadas o por la inhalación de aerosoles de aguas contaminadas usadas con propósitos recreacionales o de riego (Wyn-Jones et al., 2011).

Los HAdV comprenden 7 especies con 52 tipos, los cuales son responsables de enfermedades respiratorias, entéricas (HAdV 40 y 41) e infecciones oculares (Jiang, 2006.). Han sido identificados como los virus entéricos con mayor prevalencia en muestras ambientales (Ariga et al., 2004).

En determinados estudios, se observaron que los adenovirus entéricos son el segundo factor de gastroenteritis aguda más frecuente después de los RVA en niños menores de 5 años de edad en países desarrollados (Sire et al., 2013; Bonkougou et al., 2013).

Los HAdV han sido encontrados en alta frecuencia y concentración en aguas residuales. La razón de esto es que muchos tipos de HAdV, pueden replicarse en el tracto gastrointestinal y son excretados en las heces (Bofill-Mas et al., 2006; Katayama et al., 2008).

Las infecciones por HAdV son comunes y presentan una distribución mundial. Aunque la mayoría de las especies de HAdV circulan mundialmente, los tipos predominantes difieren entre países o regiones geográficas, así como también cambian con el transcurso del tiempo (Lin et al., 2004; Ishiko et al., 2008; Ampuero et al., 2012). La transmisión de nuevas cepas a través de los continentes puede ocurrir y conducir al reemplazo de los tipos de HAdV hasta

ahora dominantes (Kajon et al., 2010). Los adenovirus también han demostrado ser resistentes a la desinfección, y, por lo tanto, también se han detectado en efluentes de aguas residuales tratadas, con tasas de detección a veces altas. En varios casos, más del 80% de las aguas residuales se han encontrado positivas para los adenovirus (Prado et al., 2011, Amdiouni et al., 2012, Wong et al., 2013).

Debido a la contaminación por heces humanas o aguas residuales en el medio ambiente, los HAdV parecen ser más comunes en países en desarrollo con malas condiciones sanitarias (Filho et al., 2007; Dey et al., 2011; Moyo et al., 2014). Sin embargo, la incidencia de las infecciones por HAdV es más alta en lugares cerrados aglomerados, como guarderías, internados, instalaciones geriátricas, campos de entrenamiento militar y hospitales. Las infecciones intrafamiliares también son comunes y los HAdV son frecuentes en pacientes inmunocomprometidos. Cada serotipo puede causar una infección única, lo que significa teóricamente que es posible adquirir más de 50 infecciones por adenovirus para obtener una inmunidad completa contra este virus. Los tipos más recientes reportados más comúnmente asociados a enfermedades humanas a nivel mundial son HAdV C1, C2, C5, B3, B7, B21, E4 y F41 (Barrero et al., 2012; Guo et al., 2012; Tabain et al., 2012; Yliharsila et al., 2013).

Debido a su amplia distribución mundial, los HAdV han sido detectados en diferentes países a diferentes concentraciones como ser en Brasil a concentraciones de $4.6E+07$ - $1.2E+09$ copias genómicas por litro (cg/L) en agua residual sin tratar (Schlindwein et al., 2010); en Italia en aguas residuales tratadas a concentraciones de $7.0E6+08$ cg/l (La Rosa et al., 2010); en Japón en agua residual sin tratar a concentraciones de $6,7$ - $11E+04$ cg/l (He & Jiang, 2005; Haramoto et al., 2007); en Nueva Zelanda en agua residual sin tratar y aguas residuales tratadas a concentraciones que rondan los $1.9E+04$ - $4.6E+06$ cg/L (Dong et al., 2010; Hewitt et al., 2013).

1.6 Poliomavirus

1.6.1 Clasificación

Los Poliomavirus (PyV) pertenecen a la familia *Polyomaviridae*, son virus icosaédricos pequeños y desnudos, con un genoma de ADN circular doble cadena de aproximadamente 5.000 pb que infectan diferentes especies de vertebrados. Su genoma codifica para 5 proteínas estructurales y 9 no estructurales (Hamza et al., 2018). El virus Poliomavirus JC (JCPyV) infecta exclusivamente al ser humano y está ampliamente distribuido en todo el mundo. Los dos primeros PyV humanos (HPyV) aislados fueron JCPyV y Poliomavirus BK (BKPyV) en 1971 de pacientes inmunocomprometidos (Moens et al., 2017).

Basados en su secuencia de ADN y según qué hospedero infectan, se dividen en 3 géneros *Orthopolyomavirus* y *Wukipolyomavirus* aislados de mamíferos, y *Avipolyomavirus* que infectan y replican en aves (Moens et al., 2017).

Los viriones de poliomavirus son partículas no envueltas de 45 a 50 nm de diámetro formadas por tres proteínas de la cápside denominadas VP1, VP2, y VP3. El virión contiene un cromosoma pequeño que presenta una estructura similar a la de la cromatina celular contenida en el nucleosoma con la particularidad de la ausencia de la histona H1 que se asocia con el genoma viral solo cuando está en la célula infectada. El genoma de los PyV se puede dividir en tres partes: la región temprana que codifica genes que se expresan antes del inicio de la replicación del ADN; la región tardía que codifica genes expresados luego de que comienza la replicación del ADN viral y la región reguladora que contiene el origen de la replicación del ADN, así como también los promotores de genes virales tempranos y tardíos. Los genomas de todos los poliomavirus codifican al menos dos proteínas reguladoras (antígeno tumoral grande y pequeño) (Moens et al., 2017).

1.6.2 Replicación

Los poliomavirus utilizan varias vías para ingresar a la célula y pasar a través de los endosomas hacia el retículo endoplásmico (RE). Después de unirse a los gangliósidos presentes en la superficie celular, el virus simio 40 (SV40) y BKPyV entran en la célula usando un camino que involucra la caveolina. El virus se integra por endocitosis a un orgánulo con pH neutro

llamado caveosoma y luego al RE. JCPyV entra a la célula en vesículas revestidas por clatrina. La cápside comienza a desensamblarse en el RE o el citosol, ya que debido a su tamaño no puede pasar a través del poro nuclear (Moens et al., 2017).

Se ha demostrado que las partículas de JCPyV no se desensamblan antes de que lleguen al poro nuclear y que esto requiere de una señal de localización nuclear de VP1 para ingresar al núcleo (Moens et al., 2017).

Después de que el genoma del poliomavirus ingresa al núcleo, sirve de molde para la transcripción por la ARN polimerasa II celular. Una vez dentro del núcleo, el genoma viral se envuelve en los nucleosomas que contienen la histona H1 además de las cuatro histonas del núcleo que están presentes en la partícula del virus (Moens et al., 2017).

La transcripción de los genes del poliomavirus se dirige por secuencias *cis acting* en la región reguladora. El promotor de JCPyV muestra actividad tejido específico que se correlaciona con los sitios de infección aguda. Mientras que los viriones de JCPyV pueden ingresar a muchos tipos de células, su rango de hospedero está restringido a aquellas células que tienen las proteínas de unión al ADN apropiadas. El promotor temprano de JCPyV contiene secuencias que actúan como promotores transcripcionales. Estas secuencias incluyen a la caja TATA, así como también a sitios de unión para los factores de transcripción (Moens et al., 2017).

El ensamblaje de poliomavirus comienza con la translocación de VP1, VP2 y VP3 en el núcleo y la formación de capsómeros (Moens et al., 2017). A pesar de que el mecanismo mediante el cual las progenies virales son liberadas de las células aún es poco entendido. Determinados estudios han evidenciado que los Poliomavirus pueden provocar lisis celular en células infectadas (Allison & Black, 1967; Norkin & Ouellette, 1976), mientras que otros estudios indican que las partículas virales se pueden desprender de las células intactas (Allison & Black, 1967; Clayson et al., 1989; Evans et al., 2015).

1.6.3 Epidemiología

De los nueve HPyV que se conocen, sólo 4 se han asociado a diferentes patologías: Virus JC, BK, poliomavirus de las células de Merkel (MC) y el

poliomavirus asociado a la Tricodisplasia Espinulosa (TE) (Feng et al 2008). El HPyV asociado a la TE realiza una infección latente en la médula ósea y en los riñones de los individuos infectados siendo excretados en la orina de pacientes saludables (Bofill-Mas et al., 2013).

Los HPyV se detectan en todo el mundo y generalmente la primoinfección tiene lugar en edad preescolar-escolar salvo para el JCPyV que ocurre en promedio entre los 12 a 14 años de edad. Para el BK y el JC se han detectado valores de seroprevalencia en la población general de 94 y 75%, respectivamente (Egli et al., 2009).

En el caso de JC, se ha detectado su ADN en individuos inmunocompetentes en muestras de médula ósea, bazo, tejido renal, nódulos linfáticos, tejido óseo y tracto gastrointestinal (Ricciardiello, 2000; Kato et al., 2004). Por su parte, se ha detectado ADN del BK, en múltiples órganos y tejidos, entre los que se destacan los tejidos urogenitales (como el cérvix uterino y la próstata), el bazo y el tejido óseo (Pietropaolo et al., 2003).

El BKPyV se ha asociado con diversas patologías, principalmente la nefropatía intersticial y la cistitis hemorrágica en trasplantados renales y de médula ósea, respectivamente. Recientemente se ha relacionado con la aparición de encefalitis (Lopes da Silva, 2011) y más raramente, con el desarrollo de neumonía (Galan et al. 2005). Por su parte, el JCPyV es el agente etiológico de la Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LEMP), que afecta a inmunocomprometidos, especialmente a pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en etapa C3 del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (etapa avanzada) (Carson et al., 2009). También puede afectar a las células granulares del cerebelo provocando una patología denominada neuropatía de las células granulares asociada al JC que cursa con atrofia cerebelar en la neuroimagen y es causa adquirida de ataxia subaguda (d'Arminio Monforte et al., 2004).

Los HPyV clásicos (JCPyV y BKPyV) se distribuyen en todo el mundo según lo demuestran niveles detectables de anticuerpos circulantes en la mayoría de la población sana (Moens et al., 2013). La mayoría de los individuos adultos muestran niveles detectables de anticuerpos contra los HPyV descritos, lo que sugiere infecciones persistentes (Moens et al., 2013). Estos virus parecen establecer infecciones persistentes, generalmente

temprano en la vida, después de lo cual permanecen latentes en las amígdalas, el tracto urinario, las amígdalas linfoides y la médula ósea.

Los HPyV son marcadores de contaminación ambiental altamente específicos de humanos con una alta prevalencia (Taguchi et al., 1982). Los virus se eliminan principalmente en la orina, pero también en las heces, y se han reportado altos títulos en las aguas residuales municipales (Bofill-Mas et al., 2000). Alrededor de un cuarto de la población humana arroja ADN de JCPyV por la orina en concentraciones variables y los niveles de excreción viral en las aguas residuales pueden aumentar a medida que aumentan las poblaciones inmunodeprimidas (Yogo et al., 1990; McQuaig et al., 2009).

Actualmente se ha informado de la presencia de HPyV en aguas ambientales (aguas superficiales, aguas subterráneas, agua potable, agua de mar) que sufren el impacto de las aguas residuales. JCPyV y BKPyV se describieron por primera vez en aguas residuales en 2000 (Bofill-Mas et al., 2000). Desde entonces, se ha informado la presencia de JCPyV y/o BKPyV en aguas residuales de todo el mundo a concentraciones tan altas como $10E + 08$ cg/L y en matrices de agua superficiales afectadas por las descargas de aguas residuales aunque en concentraciones más bajas debido a los factores de dilución. En biosólidos producidos en plantas de tratamiento de aguas residuales, JCPyV está presente en concentraciones de hasta $10E+3$ cg/gr (Bofill-Mas et al., 2006). JCPyV ha sido propuesto como un indicador viral de contaminación fecal humano debido a su alta prevalencia en aguas residuales de todas las áreas geográficas, a la persistente excreción de la población humana, su elevada estabilidad en el medio ambiente y por ser específico del ser humano. Todas estas características hacen de JCPyV una herramienta potencial de MST ya que indica específicamente la presencia de contaminación fecal humana (Bofill-Mas et al., 2000, 2013). Además de los JCPyV, otros poliomavirus tales como poliomavirus bovino (BoPyV) y ovino (OPyV) han sido propuestos como herramientas de MST (Hundesá et al., 2010; Rusiñol et al., 2013). También se han descrito recientemente otros HPyV en muestras de aguas residuales y otras muestras ambientales impactadas por las descargas de aguas residuales. MCPyV, *Karolinska Institut* PyV (KIPyV) y *Washington University* PyV (WUPyV) fueron detectados en muestras de aguas residuales y aguas contaminadas en 2010 (Bofill-Mas et al., 2010), y, desde entonces,

algunos de ellos se informaron en varias matrices acuáticas. El HPyV 6, otro nuevo HPyV descrito recientemente en muestras de piel humana fue detectado en una muestra de agua residual por *Next Generation Sequencing* (NGS) en 2011 (Cantalupo et al., 2011).

1.7 Rotavirus

1.7.1 Clasificación

Los *Rotavirus* constituyen un género dentro de la familia *Reoviridae*. Son virus con genoma ARN doble hebra con 11 segmentos genómicos que van de 667 a 3302 pb de longitud. Cada segmento codifica para una proteína (excepto el 11). El virión no presenta envoltura y posee simetría icosaédrica, con un diámetro de 100 nm y tres cubiertas proteicas. Presenta 6 proteínas estructurales (VP1 a 6) y 6 proteínas no-estructurales (NSP1 a 6) (Estes & Greenberg, 2013).

El género *Rotavirus* se divide en 9 especies o grupos denominados con las letras A a I y con la siguiente nomenclatura: RVA a RVI (ICTV, 2017). Esta clasificación de los RV en especies o grupos fue inicialmente establecida en base a determinantes antigénicos presentes en la proteína VP6, lo que fue recientemente corroborado mediante análisis filogenéticos basados en su secuencia aminoacídica (Matthijnssens et al., 2012).

Los RVA, B y C infectan tanto humanos como otros mamíferos, mientras que los RVD a RVG han sido encontrados solo en mamíferos no-humanos y aves (Estes & Greenberg, 2013). El RVH fue incorporado recientemente como una nueva especie, siendo identificado primero en adultos humanos en China y Bangladesh, y más recientemente ha sido detectado en cerdos (en Japón, Brasil, África y Estados Unidos) y murciélagos (en África y Corea) (Wakuda et al., 2011; Matthijnssens et al., 2012; Marthaler et al., 2014; Molinari et al., 2014; Kim et al., 2016; Yinda et al., 2018). En tanto, el RVI ha sido recientemente detectado en perros en Hungría (Mihalov-Kovács et al., 2015). Los RVA a nivel mundial son responsables de más del 90% de los casos de gastroenteritis aguda (GA) que ocurren tanto en humanos como en animales domésticos de

producción pecuaria y de estimación (Estes & Greenberg, 2013). Se ha establecido un sistema de clasificación binaria para diferenciar las diferentes estirpes de RVA, que se basa en las propiedades inmunológicas (determinando serotipos) y genéticas (determinando genotipos) de los genes que codifican para las dos proteínas de la cápsida externa de la partícula viral, VP4 y VP7. El gen de la proteína VP4 define los serotipos/genotipos “P” (*P*, de sensible a *Proteasa*), en tanto que el gen de la proteína VP7 define los serotipos/genotipos “G” (*G*, de *Glicoproteína*). En lo que se refiere a la nomenclatura de este sistema de clasificación binario de RVA, la designación de los serotipos G coincide con la designación de los genotipos G, siendo respetada la siguiente regla: la letra “G” acompañada del número de serotipo/genotipo correspondiente. Por otro lado, una nomenclatura dual fue adoptada para la clasificación serológica y genética con base en la proteína VP4, ya que para el caso de VP4, al contrario de lo que ocurre con VP7, los serotipos y genotipos determinados a partir de esta proteína no coinciden. De esta forma, los serotipos son descriptos con la letra “P” acompañada del número de serotipo y/o número de genotipo correspondiente entre paréntesis recto. A modo de ejemplo, la cepa viral de RVA más prevalente en humanos a nivel global es clasificada de acuerdo a este sistema de la siguiente manera: G1P1A[8] (Estes & Greenberg, 2013).

La elevada variabilidad genética de los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 en RVA, ha determinado que actualmente se conozcan 51 genotipos P y 36 genotipos G, respectivamente (Estes & Greenberg, 2013; RCWG, 2018). Recientemente, el *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG) ha propuesto una nueva nomenclatura para todas las cepas del género *Rotavirus* (Matthijnssens et al., 2011). Por otro lado, actualmente también existe un nuevo sistema de clasificación para RVA basado en la secuencia de genomas completos. En el mismo se asignan diferentes genotipos para cada uno de los 11 segmentos genómicos, de acuerdo a valores de corte específicos de identidad nucleotídica para cada uno de los genes (Estes & Greenberg, 2013).

1.7.2 Replicación

La replicación de los RV ocurre en el tercio apical de los enterocitos maduros de las vellosidades de los primeros dos tercios del intestino delgado (Estes & Greenberg, 2013).

En primera instancia, durante el proceso de adsorción viral (proceso complejo que involucra a muchas proteínas y que todavía no fue completamente dilucidado), la tripsina pancreática del tracto gastrointestinal cliva la espícula viral (VP4), transformándola en VP5* y VP8*. El péptido VP8* sería el responsable de la primera interacción del virus con la célula huésped durante el proceso de adsorción viral (*binding receptor*). En algunos casos se observa la interacción de VP8* con proteínas celulares de membrana ricas en ácido siálico, pero se cree que otras proteínas de la superficie celular también actúan como receptores de este virus (Lopez & Arias, 2006).

Luego de la unión inicial de VP8*, el péptido VP5* actúa como co-receptor viral durante la adsorción (*post-binding receptor*), uniéndose a la integrina $\alpha 2\beta 1$. Luego, se cree que VP5* interaccionaría con la chaperona hsc70. La proteína VP7 también actuaría como *post-binding receptor*, ya que fue demostrado que también se une a las integrinas $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha \nu \beta 2$ (Lopez & Arias, 2006).

El mecanismo de penetración viral no ha sido aun totalmente dilucidado. Por lo cual, se proponen los siguientes mecanismos: i) endocitosis mediada por receptor, ii) penetración directa en *raft* lipídicos, que son microdominios lipídicos que poseen una alta densidad de glicoesfingolípidos y un conjunto específico de proteínas de superficie celular, tales como chaperonas e integrinas. Se cree que posiblemente más de un mecanismo de penetración actúe en el caso de RV (Isa et al., 2004). Una vez el virus ingresa al citosol, la concentración baja de Ca^{2+} que allí existe, desencadena la desestabilización de los trímeros de VP7 y la pérdida de la cápside externa. La pérdida de ésta, activa el complejo polimerasa (CP), formado por VP1 y VP3, en el *Core*, y los ARN(+) capeados (de cada segmento genómico de ARN doble cadena: ARN(+)/ARN(-)) son transcritos desde la partícula doblemente envuelta (*DLP*, del inglés: *Double-Layered Particle*) hacia el citosol, proceso conocido como *transcripción endógena* (Lawton et al., 1997). Este ARN(+) sirve tanto como ARN mensajero viral (ARNmv) para sintetizar las proteínas virales, así como

molde para producir el ARN(-) durante la replicación viral (Isa et al., 2004; Lopez & Arias, 2006).

Las proteínas sintetizadas y los ARN(+) son reunidos en el citosol de la célula infectada, formando un material amorfo denominado *Viroplasma*. El empaquetamiento del genoma se inicia cuando el CP se une al extremo 3' del ARN(+) viral. Se cree que existe una interacción entre los 11 segmentos genómicos, y que la proteína VP2 se organiza entorno a los mismos formando el *Core* y activando los CPs. La proteína VP6 reconoce el *Core* sintetizado y se ensambla sobre él formando la *DLP* (McDonalds & Patton, 2011; Estes & Greenberg, 2013).

La proteína NSP4 se inserta en la membrana del RE como una proteína transmembrana. El dominio citoplasmático de NSP4 se une a las *DLP* mediante su unión a VP6, para enseguida unirse también a VP4 y VP7 que también se encuentran insertadas en la membrana del RE, propiciando de esta forma el brotamiento de la *DLP* hacia el lumen del RE y la formación de *DLP* con envoltura transitoria, que enseguida pierde esta envoltura formándose finalmente la partícula viral madura triplemente envuelta o *TLP* (del inglés: *Triple-Layered Particle*) (McDonalds & Patton, 2011; Estes & Greenberg, 2013).

Luego del egreso del virión de la célula, la tripsina pancreática del tracto gastrointestinal cliva VP4 en VP8* y VP5*, lo que finalmente resulta en la formación del virión completo e infeccioso (Estes & Greenberg, 2013).

Estudios *in vitro* indican que el virus puede salir de la célula a través de la lisis celular o mediante la utilización de una vía secretora (Musalem & Espejo, 1985; Jourdan et al., 1997; Trask et al., 2012).

1.7.3 Epidemiología

Los RVA son la causa principal de GA en países sin vacunación y ocupa hasta el quinto lugar en países vacunados (Miagostovich et al., 2008; Bofill-Mas et al., 2013). Es importante destacar que eventualmente los RVA pueden ser más prevalentes en muestras de aguas ambientales que los AdV y PyV. Esto puede deberse a la alta frecuencia que presentan los RVA en diferentes poblaciones y a su excreción en altas concentraciones en la materia fecal de los individuos infectados (Miagostovich et al., 2008; Bofill-Mas et al., 2013).

Los RVA son la principal causa de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, siendo responsables del 30% a 50% de esta enfermedad en todo el mundo incluyendo altas tasas de hospitalización y mortalidad en países en desarrollo (Estes & Greenberg, 2013). A pesar de que una vacunación masiva universal contra los RVA ha reducido las tasas de mortalidad significativamente, este virus causa cerca de 200.000 muertes por año en niños menores de cinco años de edad (Estes & Greenberg, 2013). Los RVA con los genotipos G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G2P[4] son considerados los más prevalentes en el mundo, responsables por el 75% de los casos (Bányai et al. 2012).

La enfermedad causada por RVA tiene una distribución mundial, pero con diferentes características epidemiológicas en diferentes regiones climáticas. Los países templados por lo general presentan períodos de aparición de gastroenteritis asociada a RV en los meses de invierno y primavera. En las áreas tropicales, la estacionalidad no es tan marcada, manifestándose por casos esporádicos y/o brotes durante todo el año (Levy et al., 2009; Patel et al., 2011).

En varios países como Albania, Bélgica, Canadá, China, Finlandia, Francia, Grecia, Italia, Rusia, Suecia, Turquía y los Estados Unidos, se han notificado brotes asociados con RVA por la contaminación de aguas superficiales por aguas residuales (Divizia et al., 2004; Gallay et al., 2006; Martinelli et al., 2007; Koroglu et al., 2011; Mellou et al., 2014; Braeye et al., 2015). Los datos sobre la ocurrencia de RVA en muestras ambientales se han generado principalmente mediante estudios llevados a cabo en países en desarrollo, donde el RVA todavía tiene una morbilidad significativa en comparación con los países desarrollados. La alta ocurrencia de RVA observada en estanques o arroyos contaminados urbanos en ciudades con alta densidad de población se relaciona con varios factores, incluyendo la precariedad de la vivienda y la falta de saneamiento en algunas áreas geográficas (Rodríguez-díaz et al., 2009; Rutjes et al., 2009; Wong et al., 2009; Victoria et al., 2010; Fumian et al., 2010, 2011; Prado et al., 2011; Vieira et al., 2012).

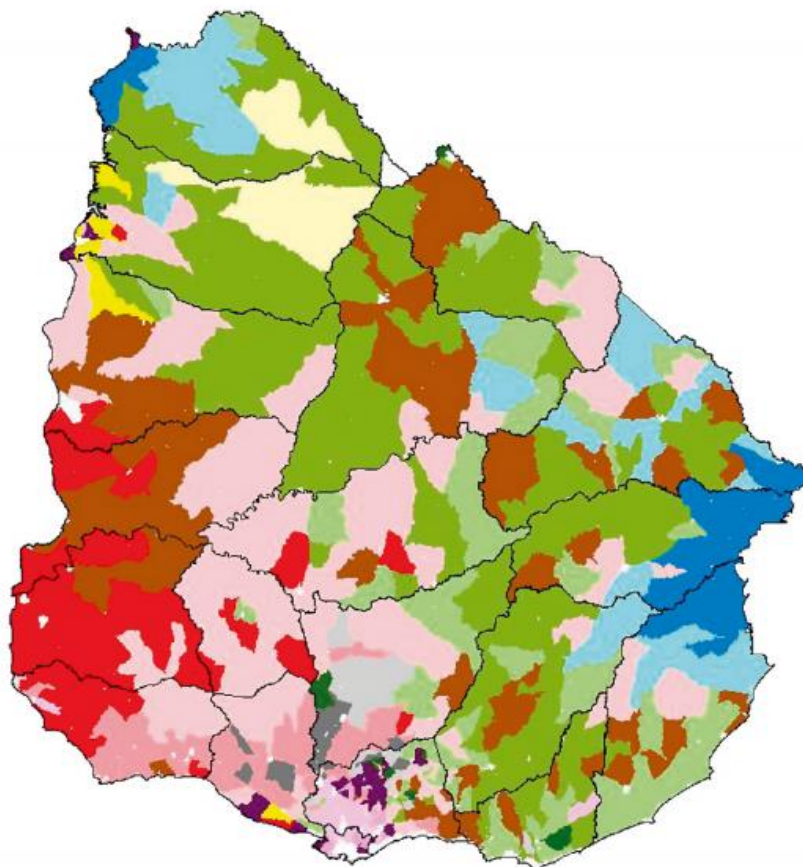
Diversos estudios que han utilizado datos sobre la excreción de RVA en heces y su ocurrencia en aguas residuales crudas y tratadas, muestran la transmisión de $2E+18$ partículas virales RVA de aguas residuales a aguas superficiales a nivel global por año, de las cuales 87 % son producidos por la población urbana (Kiulia et al., 2015).

Se ha demostrado la presencia de RVA en aguas superficiales en varios países, principalmente en ríos, arroyos y lagos. La detección de RVA (9% a 100%) y su diversidad genética, fueron descritas en diferentes regiones, informando concentraciones de RVA que van desde 30 a $3E+7$ cg/L. Es importante señalar que la estacionalidad puede haber afectado estos resultados debido a factores como la excreción y la variabilidad climática que influye en los flujos en los ríos (Kiulia et al., 2015). Bajo diferentes escenarios hidrológicos del Río Negro en Brasil, como ejemplo, los RVA se detectaron más comúnmente durante la temporada de inundaciones (Vieira et al., 2016).

2. HIPÓTESIS

Desde hace ya muchos años, pero particularmente desde el año 2013 ha sido evidenciada una preocupación pública concerniente con la contaminación de los cauces de agua superficial de la cuenca del río Santa Lucía, utilizados para la captación y generación de agua potable que abastece a la ciudad de Montevideo y al departamento de Canelones, donde se concentran dos tercios de la población del país. A raíz de esta preocupación, que tomó importancia nacional, fue relatado un informe por los decanos de las Facultades de Química, Ciencias, Agronomía e Ingeniería de la Universidad de la República sobre la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía determinando el estado de situación (Informe, 2013). En dicho informe se expresa que el 80% de la contaminación con nutrientes (eutrofización) y de demanda biológica de oxígeno, se debe a fuentes difusas; estas son las provenientes de actividades agropecuarias, entre las que se destacan las explotaciones lecheras (tambos). El restante 20% proviene de fuentes puntuales, constituidas por los efluentes de industrias y las aguas residuales urbanas de las ciudades localizadas en dicha cuenca. Este informe también indica que existen fuentes puntuales de contaminación por actividades de confinamiento animal tales como *feed-lots*, tambos, criaderos de aves y cerdos, sobre las cuales la información es escasa. Este informe propone, entre otras recomendaciones, realizar un monitoreo de la calidad del agua de esta cuenca para así obtener un análisis detallado y preciso sobre el impacto de la contaminación que presenta el río. Además de lo anteriormente mencionado, la cuenca del río Santa Lucía es conocida como la cuenca lechera de nuestro país ya que en esa zona se concentra el mayor número de tambos del Uruguay, como se puede apreciar en el Mapa Agropecuario (Figura 2) (Anuario Agropecuario Estadístico, 2017).

MAPA 3
REGIONES AGROPECUARIAS
EN EL AÑO 2011.



Fuente: MGAP-DIEA con base
Censo General Agropecuario
2011.

Figura 2. Mapa que muestra las regiones agropecuarias del Uruguay según el censo agropecuario estadístico del 2011 (Anuario Agropecuario Estadístico, 2017).

Por otro lado, respecto a la calidad del río Uruguay, existen estudios sistemáticos de la calidad microbiológica del agua en la región de Fray Bentos llevados a cabo por la empresa UPM a través del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) que indican niveles de coliformes termotolerantes esporádicamente superiores al máximo permitido para aguas recreacionales; así como también estudios realizados por la Universidad Tecnológica Nacional localizada en Concepción del Uruguay, Argentina, que indican una elevada contaminación bacteriana en la región de esa ciudad (Cardini et al., 2001; UPM, 2013).

Además de lo anteriormente expuesto, se han realizado diversos estudios en diferentes zonas de nuestro país en aguas residuales, como por ejemplo en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Melo, Treinta y Tres habiéndose detectado Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Adenovirus y Bocavirus (Lizasoain et al., 2015; Tort et al., 2015; Salvo et al.,

2018). Cabe destacar que las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos vuelcan sus aguas residuales casi o sin tratamiento al río Uruguay.

Por todo lo anteriormente expuesto, nuestra hipótesis plantea una contaminación fecal de las aguas superficiales originada tanto por el ser humano presente en las ciudades localizadas en ambas cuencas así como también una contaminación fecal animal principalmente de origen bovino por la presencia de tambos y *feed-lots*, también localizados en esas cuencas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar el origen, ya sea humano, bovino o porcino, de las diferentes fuentes de contaminación fecal en aguas superficiales de las cuencas del Río Santa Lucía y del Río Uruguay.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estandarizar la metodología de adsorción-elución con membrana cargada negativamente para realizar la concentración viral a partir de las aguas superficiales colectadas en las cuencas del Río Santa Lucía y del Río Uruguay.

3.2.2 Estandarizar las técnicas de PCR cualitativa y cuantitativa para la detección, caracterización molecular y cuantificación de HAdV, PAdV, HPyV y BoPyV.

3.2.3 Estandarizar la técnica de ICC-qPCR para los HAdV a fin de determinar la viabilidad viral.

3.2.4 Realizar un monitoreo por el período de un año de los virus utilizados como marcadores especie específicos de contaminación fecal (HAdV, PAdV, HPyV y BoPyV), y de RVA (principal agente etiológico viral de GA infantil mundialmente), en diferentes puntos de colecta de los ríos Santa Lucía y Uruguay.

3.2.5 Establecer la epidemiología molecular para cada virus detectado en el monitoreo.

3.2.6 Determinar la viabilidad viral de los HAdV detectados durante el monitoreo por medio de la utilización de la ICC-qPCR.

3.2.7 Determinar el grado de dispersión temporal y espacial de los virus indicadores y su asociación con diferentes variables ambientales detectados durante el monitoreo realizado en el Río Uruguay y en el Río Santa Lucía.

3.2.8 Realizar la comparación entre la contaminación fecal bacteriana y viral.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Puntos de muestreo

La cuenca del Río Santa Lucía se localiza al sur del país y posee una superficie de 13.310 km² abarcando parte de los departamentos de Montevideo, Canelones, San José, Flores, Florida y Lavalleja. Esta cuenca abastece de agua para consumo al 60% de la población uruguaya, además de ser utilizada para riego de las plantaciones de los departamentos mencionados anteriormente (Delbene, 2010).

El Río Uruguay conforma una amplia cuenca hidrográfica fronteriza constituyendo un importante modelo geográfico para estudiar el impacto de la actividad humana en aguas superficiales. Este río tiene un largo de 1.838 km, de los cuales 1.262 km están localizados en territorio brasilero. Los restantes 576 km están localizados entre Uruguay y Argentina constituyendo la frontera entre ambos países. En su cauce existen cinco represas para la generación de energía y en sus riberas viven 975.000 habitantes (C.A.R.U. 2013). Vale destacar que en el departamento de Salto se encuentra la Represa Binacional de Salto Grande que produce el 50% de la energía consumida por todo el Uruguay y el 7% de la energía consumida en la Argentina. (Salto Grande, 2018).

Para este trabajo se realizaron colectas mensuales por el período de un año comprendido entre junio 2015 y mayo 2016 en seis puntos de la cuenca del río Santa Lucía y en cuatro puntos del río Uruguay. En cada punto se colectó 500 mililitros de agua superficial en un frasco estéril que fue inmediatamente conservada en frío hasta su traslado al laboratorio, colectándose un total de 120 muestras. El monitoreo sobre el Río Uruguay como se puede observar en la Figura 3 (imagen A), fue realizado en cuatro puntos: aguas arriba de la Represa de Salto Grande (31°16'2.84"S, 57°54'58.28"O), aguas abajo de dicha represa (31°17'13.01"S, 57°56'30.64"O), en el punto de la toma de agua para consumo por parte de la planta potabilizadora de la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE) en la ciudad de Salto (31°21'34.14"S, 57°59'10.63"O) y aguas abajo de dicha ciudad (31°24'25.61"S, 57°59'49.03"O). Vale resaltar que del punto más austral al más

septentrional de este muestreo hay una distancia aproximada de 29 km (Google Earth).

Las colectas en la cuenca del río Santa Lucía, como se puede apreciar en la Figura 3 (imagen B), se realizaron en seis puntos, todos localizados aguas arriba de la planta potabilizadora de agua de OSE para consumo de las poblaciones de Montevideo y Canelones, ubicada en la localidad denominada Aguas Corrientes: Río Santa Lucía Chico aguas abajo de la ciudad de Florida (34° 7'1.00" S, 56°13'17.83"O), Paso Pache (34° 21'50.46" S, 56°14'59.70"O), Río Santa Lucía aguas arriba (34°26'30.95"S, 56°24'3.62"O) y aguas abajo (34°27'20.85"S, 56°24'50.58"O) de la ciudad de Santa Lucía, Río Santa Lucía aguas arriba de la toma de agua para consumo por parte de la planta potabilizadora de OSE de la localidad de Aguas Corrientes (34°30'51.94"S, 56°23'47.31"O) y en el arroyo Canelón Grande (34°29'50.6"S 56°22'13.8"W).

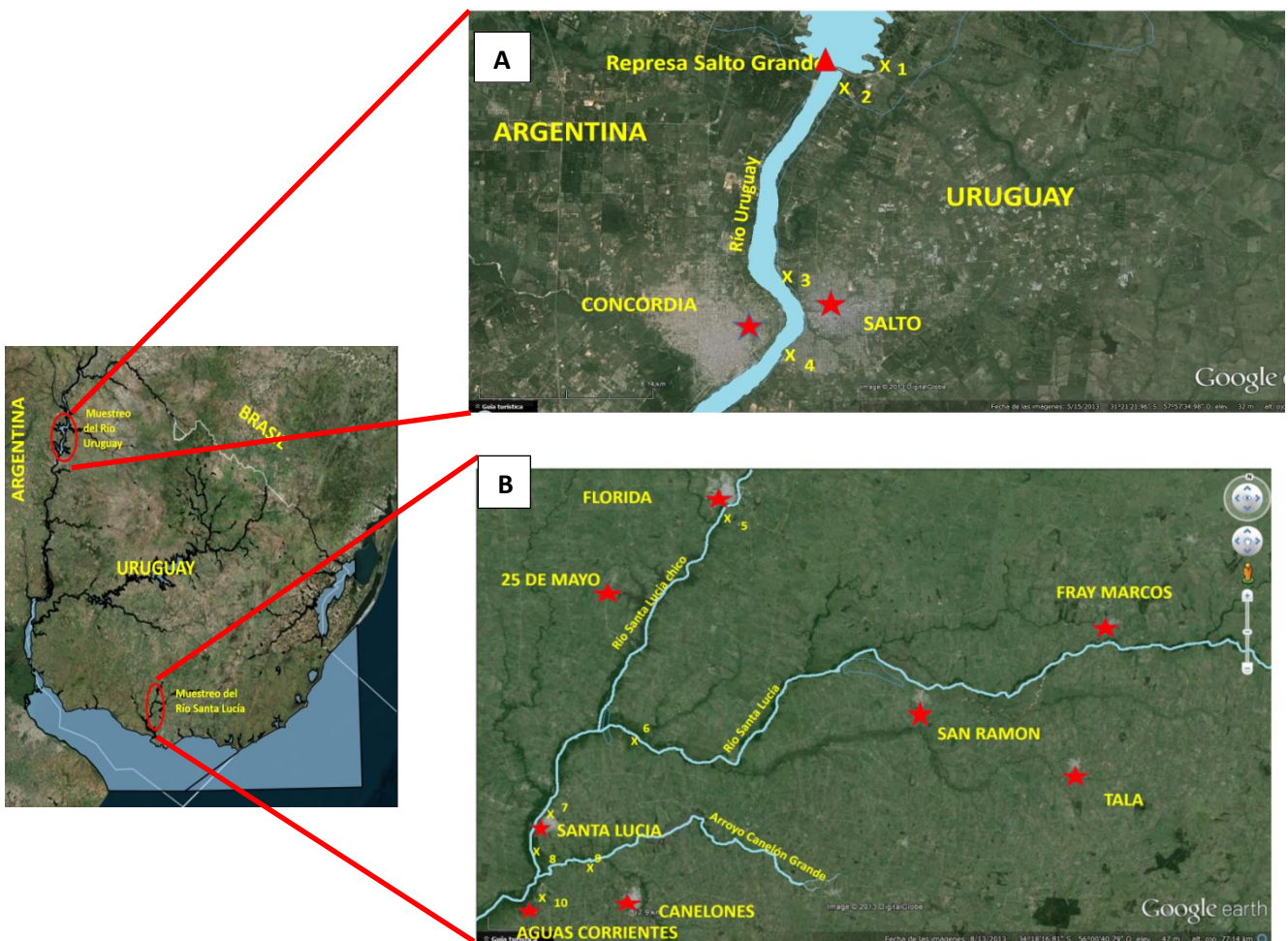


Figura 3. Mapa mostrando los puntos de muestreo de agua superficial. En el río Uruguay (A): aguas arriba de la represa de Salto Grande (SG) (1), aguas abajo de la represa de SG (2), toma de agua de OSE de la ciudad de Salto (3), aguas abajo de la ciudad de Salto (4). En el río Santa Lucía (SL) (B): aguas abajo de la ciudad de Florida (5), Paso Pache (6), aguas arriba de la ciudad de SL (7), aguas abajo de SL (8), arroyo Canelón Grande (9), toma de agua de OSE en Aguas Corrientes (10). Estrellas rojas: ciudades. Triángulo rojo: represa de Salto Grande.

4.2 Concentración viral

La concentración viral de las muestras se realizó a partir de 500 ml de agua superficial mediante el método de adsorción-elución con membrana cargada negativamente según el protocolo descrito por Haramoto y colaboradores (2009). Se siguió el siguiente protocolo: Inicialmente se adicionó $MgCl_2$ a la muestra hasta obtener una concentración final de 25 mM y se filtró a través de una membrana cargada negativamente de tipo HA de 47 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,45 μm . Posteriormente, se adicionaron y se filtraron 200 ml de H_2SO_4 0,5 mM (pH 3,0) y se colocó la membrana en una placa de Petri, donde la elución del virus de la membrana se llevó a cabo mediante la adición de 4 ml de NaOH 1 mM (pH 10,8) agitando durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 40 μL de H_2SO_4 50 mM y 40 μL de Tampón TE 100X (pH 8,0) para neutralizar la solución.

4.3 Estandarización de las PCR cuantitativas

Para lograr las curvas estándares para cuantificar cada uno de los virus de este estudio se clonaron los blancos de amplificación en vector pJET1.2/blunt para generar cantidades conocidas de ADN plasmídico molde a ser usadas como estándares. Para ello se utilizó el kit “CloneJET PCR Cloning” (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, MD) y bacterias E. coli XL-1 Blue competentes. Los insertos fueron obtenidos para HAdV, PAdV, BoPyV y HPyV. El análisis de las colonias obtenidas fue realizado mediante rastreo por PCR utilizando los cebadores específicos para cada amplicón. Los clones positivos fueron crecidos en medio LB con ampicilina durante toda la noche en agitador a 37°C para luego extraer el ADN plasmídico, lo cual se realizó por el método de

lisis alcalina. La estimación de la cantidad obtenida de ADN plasmídico fue realizada mediante la cuantificación a través de espectrofotómetro.

Se corroboró la correcta extracción de ADN plasmídico mediante PCR y los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1%. Luego, se procedió a realizar las diluciones seriadas estándares (1E+8 a 1E+0) y se realizó con las mismas las PCR cuantitativas para cada virus. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y se incluyeron controles negativos en cada experimento. Se obtuvo una curva estándar para cada virus. Se calculó el coeficiente de linealidad y la pendiente de cada curva.

4.4 Extracción del ácido nucleico y síntesis del ADN copia (ADNc)

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit comercial QIAmp Cador Pathogen (QIAGEN®, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Exclusivamente para la detección y cuantificación de RVA se realizó la transcripción reversa del ARN viral con cebadores randómicos hexaméricos pd(N)6 (SBS Genetech Co. Ltd., Shanghai, China) y con la transcriptasa reversa *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™, Carlsbad, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente para la transcripción reversa, se prepararon los tubos con 10 µl de RNA extraído y se le adicionaron 4 µl de cebadores randómicos hexaméricos pd(N)6 [50 ng/µl]. Se incubaron durante 5 minutos (min) a 95 °C y luego a 0 °C por 4 min y se adicionaron 36 µl del mix que contenía 20,5 µl de H₂O (*RNAse/DNAse free*), 10,0 µl de *5X Reaction Buffer*, 5,0 µl de *dNTPs* 10 mM y 0,5 µl de *SuperScript™ II RT* (200 U/µl). Luego se incubó la reacción en un termociclador siguiendo el siguiente programa según las recomendaciones del fabricante de la RT: 25 °C por 10 min (hibridación de pd(N)6), 42 °C por 1 hora (retrotranscripción), 70 °C durante 10 min (inactivación de la enzima RT) y 4 °C hasta el momento de retirar los tubos del termociclador.

4.5 PCR cuantitativa (*qPCR*)

Para la detección y cuantificación de las estirpes virales indicadoras de contaminación fecal especie-específicas, así como también para RVA,

utilizamos la técnica de *qPCR* con tecnología TaqMan® (Holland et al., 1991). Se utilizó el kit *SensiMix™ II Probe* (BIOLINE Reagents Ltd, Inglaterra) y el termociclador *Rotor Gene Q II* (Qiagen®, Pleasanton, USA), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Para la detección y cuantificación de HAdV se utilizó un juego de cebadores degenerados AdF y AdR y la sonda Ad que amplifican una región conservada del gen del exón de HAdV siguiendo el protocolo descrito por Hernroth et al. (2002). Brevemente, a 5 µl de molde se le adicionaron 5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *2X SensiMix™ II Probe*, 1 µl del cebador AdF (10 µM), 1 µl del cebador AdR (10 µM) y 0,5 µl de la sonda Ad (10 µM) marcada con el fluoróforo *FAM*. El ciclado comprende una desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 10 seg e hibridación/extensión a 60 °C durante 50 seg.

Para la detección y cuantificación de RVA se utilizó el juego de cebadores NSP3F y NSP3R con la sonda NSP3 marcada con el fluoróforo *FAM* que amplifica una región altamente conservada de la proteína no estructural NSP3 siguiendo el protocolo descrito por Zeng y colaboradores (2008). Brevemente, por cada tubo se adicionaron 5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *2X SensiMix™ II Probe*, 1 µl del cebador NSP3 F (10 µM), 1 µl del cebador NSP3 R (10 µM), 0,5 µl de la sonda NSP3 (10 µM) y 5 µl de ADNc. El ciclado comprende una desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguida de 45 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 10 seg e hibridación/extensión a 60 °C por 1 min.

Para detectar y cuantificar los PAdV en las muestras colectadas se utilizaron los cebadores PAdVF y PAdVR con la sonda Q-PAdV-P que amplifica una región de 68 pb según el protocolo descrito por Hundesa y colaboradores (2009). Brevemente, por cada tubo se adicionaron 2,9 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 10 µl de *2X SensiMix™ II Probe*, 0,8 µl del cebador PAdV F (10 µM), 0,8 µl del cebador PAdV R (10 µM), 0,5 µl de la sonda Q-PAdV-*FAM-BHQ* (10 µM) y 5 µl de molde. El ciclado comprende una desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 10 seg e hibridación/extensión a 60 °C por 50 seg.

BoPyV fue detectado y cuantificado mediante la amplificación de un segmento de 77 pb del gen VP1 por los cebadores QB-F1-1 y QB-R1-1 con la

sonda QB-P1-2 según lo describe Hundesa y colaboradores (2010). Brevemente, por cada tubo se adicionaron 5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de 2X *SensiMix™ II Probe*, 1 µl del cebador QB-F1-1 (10 µM), 1 µl del cebador QB-R1-1 (10 µM), 0,5 µl de la sonda QB-P1-2-VIC-BHQ (10 µM) y 5 µl de molde. El ciclado comprende una desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 10 seg e hibridación/extensión a 60 °C por 50 seg

Los HPyV fueron detectados y cuantificados utilizando el juego de cebadores JE3F y JE3R con la sonda JE3P siguiendo el protocolo descrito por Pal y colaboradores (2006). Brevemente, por cada tubo se adicionaron 3,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 10 µl de 2X *SensiMix™ II Probe*, 1 µl del cebador JE3F (10 µM), 1 µl del cebador JE3R (10 µM), 0,5 µl de la sonda JE3P marcada con *FAM* (10 µM) y 5 µl de molde. El ciclado comprende una desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 15 seg e hibridación/extensión a 60 °C por 60 seg.

Aquellas muestras que presentaron resultado negativo en la *qPCR* fueron analizadas nuevamente en una dilución 1:10 a partir del ácido nucleico extraído para diluir posibles inhibidores enzimáticos presentes en las muestras ambientales.

4.6 PCR cualitativa (cPCR)

Para amplificar las muestras de HAdV positivas por *qPCR* se realizó una *nested PCR* según Allard y colaboradores (2001). Para el primer *round* (fragmento amplificado esperado de 301 pb) se utilizaron 5 µl de ADN molde, 4,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, USA); 1 µl de DMSO; 1 µl del cebador hex1deg (10 µM) y 1 µl del cebador hex2deg (10 µM) con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 5 min. Para el segundo *round* (fragmento amplificado esperado de 171 pb), se utilizaron 2 µl del producto de amplificación del primer *round*, 7,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, USA); 1 µl de DMSO; 1 µl del cebador hex3deg (10 µM) y 1 µl del cebador hex4deg (10 µM) con un ciclado de una

etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 5 min. Se visualizó en un gel de agarosa al 2% en 100 ml de TAE 1X conteniendo 5 µl del intercalante de ácidos nucleicos *GoodView®* (SBS®, Beijing, China).

Para amplificar las muestras de BoPyV positivas por *qPCR* se realizó una *nested PCR* según Hundesa y colaboradores (2006). Para el primer *round* (fragmento amplificado esperado de 527 pb) se utilizaron 5 µl de ADN molde, 4,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1 µl del cebador VP1F (10 µM) y 1 µl del cebador VP1R (10 µM) con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de la siguiente manera: 92 °C por 1 min, 58 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 7 min. Para el segundo *round* (fragmento amplificado esperado de 263 pb), se utilizan 2 µl del producto de amplificación del primer *round*; 7,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*; 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, USA); 1 µl de DMSO; 1 µl del cebador VP2F (10 µM) y 1 µl del cebador VP2R (10 µM) con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de la siguiente manera: 92 °C por 1 min, 58 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 7 min. Se visualizó en un gel de agarosa al 2% en 100 ml de TAE 1X conteniendo 5 µl del intercalante de ácidos nucleicos *GoodView®* (SBS®, Beijing, China).

Para amplificar las muestras de HPyV positivas por *qPCR* se realizó una *nested PCR* según Bofill-Mas y colaboradores (2000). Para el primer *round* (fragmento amplificado esperado de 737 pb) se utiliza 5 µl de ADN molde, 4 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1,25 µl del cebador EP1A (10 µM) y 1,25 µl del cebador EP2A (10 µM) con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 7 min. Para el segundo *round* (fragmento amplificado esperado de 668 pb), se utilizaron 2 µl del producto de amplificación del primer *round*; 7 µl de H₂O µl *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1,25 µl del cebador P1A (10µM) y 1,25 µl del cebador P2A (10 µM) con una etapa inicial

de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 7 min. Se visualizó en un gel de agarosa al 2% en 100 ml de TAE 1X conteniendo 5 µl del intercalante de ácidos nucleicos *GoodView®* (SBS®, Beijing, China).

Para la amplificación de las muestras positivas por qPCR para RVA se realizaron dos *nested* PCR. Para el genotipo G se realizó un primer *round* (fragmento amplificado esperado de 904 pb) con un volumen total de mix de reacción de 25 µl conteniendo 4,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1 µl del primer *forward* 9con1 (10 µM); 1 µl del primer *reverse* 9con2 (10 µM); 5 µl de cDNA, con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min (Das et al., 1994; Fischer et al., 2000). El segundo *round* (fragmento amplificado esperado de 881 pb) consta de un volumen total de mix de reacción de 25 µl conteniendo 8,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, USA); 1 µl de DMSO; 1 µl del primer *forward* VP7-F (10 µM); 1 µl del primer *reverse* VP7-Rdeg (10 µM); 1 µl del producto de la amplificación del primer *round*, con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min (OMS, 2009; Iturriza-Gómara et al., 2001). Se visualizó en un gel de agarosa al 2% en 100 ml de TAE 1X conteniendo 5 µl del intercalante de ácidos nucleicos *GoodView®* (SBS®, Beijing, China). Para el genotipo P se realizó un primer *round* (fragmento amplificado esperado de 876 pb) con un volumen total de mix de reacción de 25 µl conteniendo 4,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de *Mango mix™* (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1 µl del primer *forward* 4con3 (10 µM); 1 µl del primer *reverse* 4con2 (10 µM); 5 µl de cDNA, con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 45 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min (Gentsch et al., 1992). El segundo *round* (fragmento amplificado esperado de 663 pb) consta de un volumen total de mix de reacción de 25 µl conteniendo 8,5 µl de H₂O *RNAse/DNAse free*, 12,5 µl de

*Mango mix*TM (Bioline, Estados Unidos); 1 µl de DMSO; 1 µl del primer *forward* VP4F (10 µM); 1 µl del primer *reverse* VP4R (10 µM); 1 µl del producto de amplificación del primer *round*, con un ciclado de una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de la siguiente manera: 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min; con una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min (OMS, 2009; Iturriza-Gómara et al., 2001). Se visualizó en un gel de agarosa al 2% en 100 ml de TAE 1X conteniendo 5 µl del intercalante de ácidos nucleicos *GoodView*[®] (SBS[®], Beijing, China).

4.7 ICC-qPCR

La ICC-qPCR se realizó como se describió previamente por Rigotto y colaboradores (2005) y se aplicó para verificar la infectividad de los HAdV que habían sido detectados y cuantificados previamente en las muestras de agua de río por *qPCR*. Con esta finalidad se utilizaron células de la línea celular A549, que son células permisivas derivadas de carcinoma de pulmón humano gentilmente donadas por la Dra. Marize Miagostovich del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental (LVCA) del Instituto Oswaldo Cruz en Río de Janeiro, Brasil. Las muestras de agua seleccionadas para la infección fueron tratadas previamente con 2 µl de antibiótico (estreptomina-penicilina 100 U/ml) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) y 2 µl de anfotericina (100 mg/ml) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania). Estas muestras se inocularon concentradas y en dilución 1:2 por duplicado en placas que contenían monocapas de las células A549 en medio *DMEM/Ham's F-12* con L-Glutamina (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) suplementado con Bicarbonato de Sodio (7,5%, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), L-Glutamina (200 mM, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), Anfotericina (100 mg/ml) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania), Triptosa fosfato (1 X, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), aminoácidos no esenciales (100 X, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), piruvato de sodio (100 mM, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania) y penicilina-estreptomina (100 X, Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania). Previo a la infección se lavó la monocapa celular con PBS, luego se adicionó la muestra y se incubó la placa de 24 pocillos

durante 1 hora a 37 °C agitándola cada 10 minutos. Luego, se retiró el sobrenadante y se lavó la monocapa tres veces con PBS y en cada pocillo de la placa se adicionó 1 ml de medio de cultivo con 2% de suero fetal bovino (SFB) (GE HealthCare, Reino Unido) inactivado a 56 °C por 60 minutos. Las muestras fueron incubadas durante 7 días en una estufa a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO₂. Luego de dicha incubación las placas se congelaron y descongelaron 3 veces por centrifugación (10 min a 14000 rpm) se extrajo el sobrenadante donde se encuentran las partículas virales. Posteriormente, se realizó la extracción del ácido nucleico con el kit comercial previamente mencionado y finalmente se realizó la *qPCR* para detectar las partículas infectivas de HAdV que tuvieron la capacidad de replicarse en las células A549.

4.8 Secuenciación y análisis filogenético

Las muestras positivas por *qPCR* para HAdV se amplificaron mediante *nested PCR* tal como lo describe Allard y colaboradores (2001) para su posterior purificación y secuenciación. Los amplicones se purificaron usando *PureLink™ Quick Gel Extraction y PCR Purification Combo kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) y secuenciados en la plataforma de secuenciación de Macrogen (Seúl, Corea del Sur) en un secuenciador *ABI3730XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, California Estados Unidos). Los electroferogramas se editaron con el programa *SeqMan* (DNASTar Lasergen, Wisconsin, Estados Unidos) y se alinearon con las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos NCBI utilizando el programa *MUSCLE* (Edgar, 2004). Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa *MEGA 7* (Kumar et al., 2016) utilizando el método *Neighbor-Joining* con valor 1000 de apoyo de *Bootstrap* de acuerdo con el modelo de sustitución nucleotídica indicado por el *JModelTest* (Guindon & Gascuel 2003; Darriba et al., 2012) para las muestras positivas en la ICC-qPCR. Para la muestra ambiental positiva para RVA, los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el método de *Maximum likelihood* con el modelo *Tamura Nei + G + I* con 1000 réplicas de *Bootstrap*, utilizando el programa *MEGA 7.0*.

4.9 Coliformes fecales

Los coliformes fecales se cuantificaron por el método de filtración en membrana. Un volumen de 100 ml de la muestra, se filtró a través de una membrana de tipo HA de 47 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,45 µm. Luego estas membranas se incubaron por triplicado en medio selectivo para coliformes fecales M FC agar (Merck®, Darmstadt, Alemania) según las indicaciones del fabricante por 24 horas en estufa a $44.5\text{ °C} \pm 0.2\text{ °C}$ (Geldreich et al., 1965, EPA, 2002). Luego se contaron las colonias y se realizó un promedio entre las 3 placas de la misma muestra informándose el resultado en unidades formadoras de colonia por 100 mililitros (UFC/100 ml).

4.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en colaboración con las Dras. María del Pilar Díaz y Sonia Pou de la Universidad Nacional de Córdoba utilizando el programa *STATA v 14.1* (StataCorp, LLC, Texas, Estados Unidos). Las pruebas de proporciones y la prueba t de *Student* se utilizaron para el análisis de las frecuencias de los virus y la cuantificación, respectivamente, con un valor de significancia de 0,05. Se utilizó un análisis de regresión logística para determinar la influencia de las variables ambientales sobre la presencia de los virus en las aguas superficiales.

4.11 Variables Ambientales

Las variables ambientales que se tuvieron en cuenta en este estudio son la lluvia acumulada, la temperatura media y el nivel del río. La temperatura media del día de la colecta se obtuvo de la página web del Instituto Nacional de Meteorología (INUMET, 2017). La lluvia acumulada se calculó como el promedio de lluvia medido el día de la colecta más 3 días antes de la misma.

Los niveles del río Santa Lucía fueron gentilmente cedidos por OSE que mide el nivel de éste en Aguas Corrientes, lugar de donde se toma el agua para ser potabilizada para consumo. Los niveles del Lago de Salto Grande y del río Uruguay fueron gentilmente cedidos por la Prefectura Naval con Sede en Salto.

5. RESULTADOS

Se logró estandarizar la metodología de concentración viral a partir de aguas superficiales mediante la adsorción viral a la membrana cargada negativamente. Esto posibilitó la detección posterior de los virus entéricos estudiados. La inoculación y posterior detección del fago PP7 (utilizado como control interno del proceso) en las muestras, permitió validar la técnica de adsorción con membrana cargada negativamente para la concentración viral a partir de muestras de aguas superficiales. Las siete muestras de agua superficial inoculadas con PP7 fueron detectadas por qPCR presentando un CT en el rango de 28 a 32 (Figura 4).

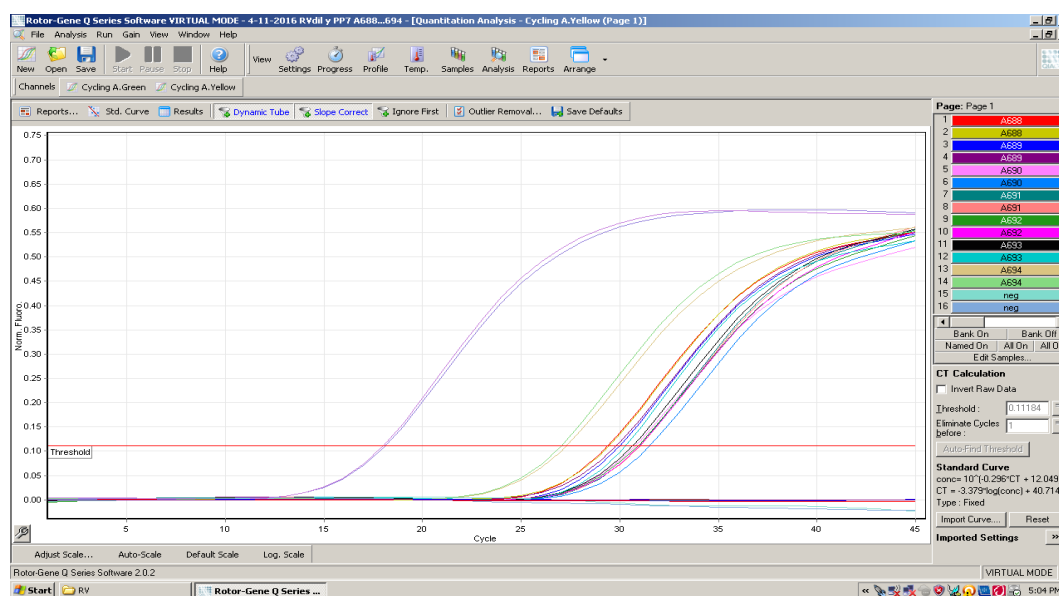


Figura 4. Validación del método de concentración. Resultado de la qPCR de la inoculación de 7 muestras de agua superficial con PP7.

Con el fin de realizar la detección y cuantificación viral de HAdV, BoPyV, PAdV, HPyV, se realizaron las correspondientes qPCR para poner a punto dichas técnicas. Para RVA, no se realizó puesta a punto en este caso, ya que previamente fue estandarizada la qPCR para dicho virus en nuestro laboratorio. La eficiencia de la amplificación de la Real Time PCR para cada virus se demostró mediante la amplificación de alícuotas por duplicado en diluciones seriadas en un factor de 10 de cada ADN plasmídico estándar a partir de la

dilución 1E+08. Las curvas estándares resultantes presentaron fuertes coeficientes de correlación r^2 para cada uno de los virus (figuras 5, 6, 7 y 8).

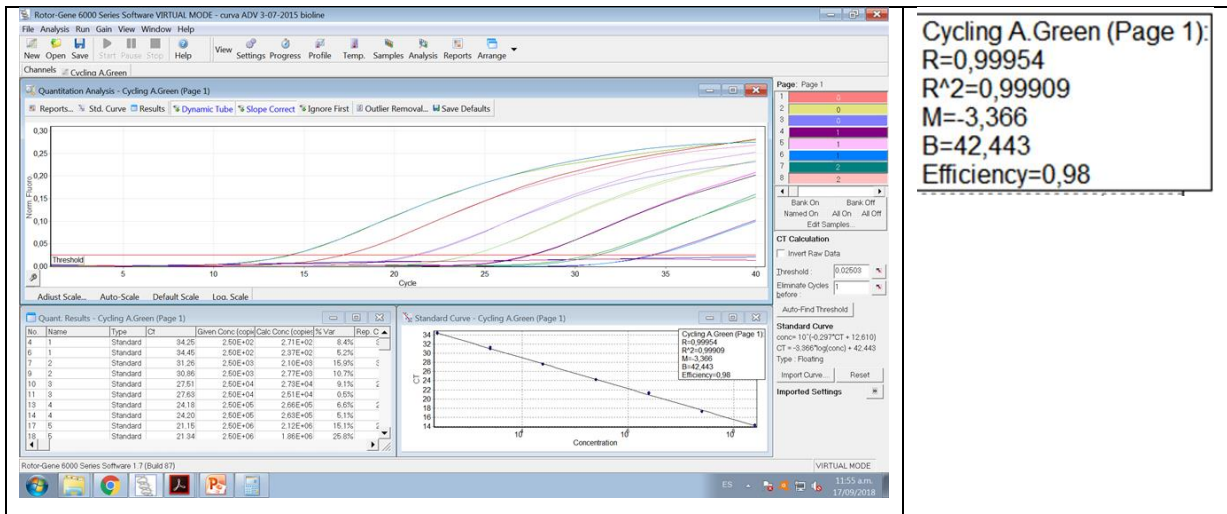


Figura 5. Estandarización de la qPCR para Adenovirus humano.

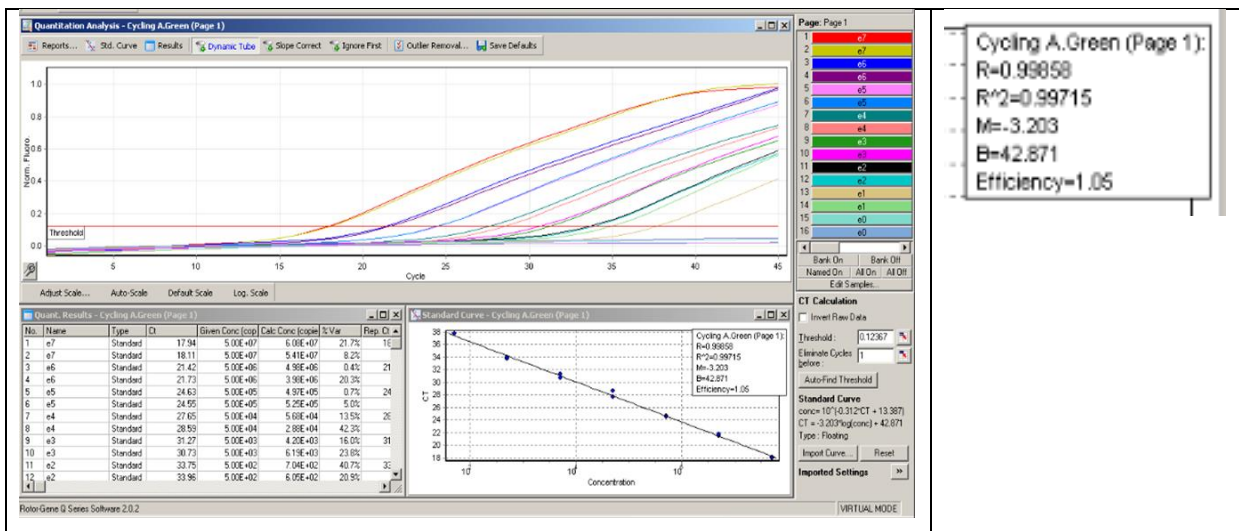


Figura 6. Estandarización de la qPCR para Adenovirus porcino

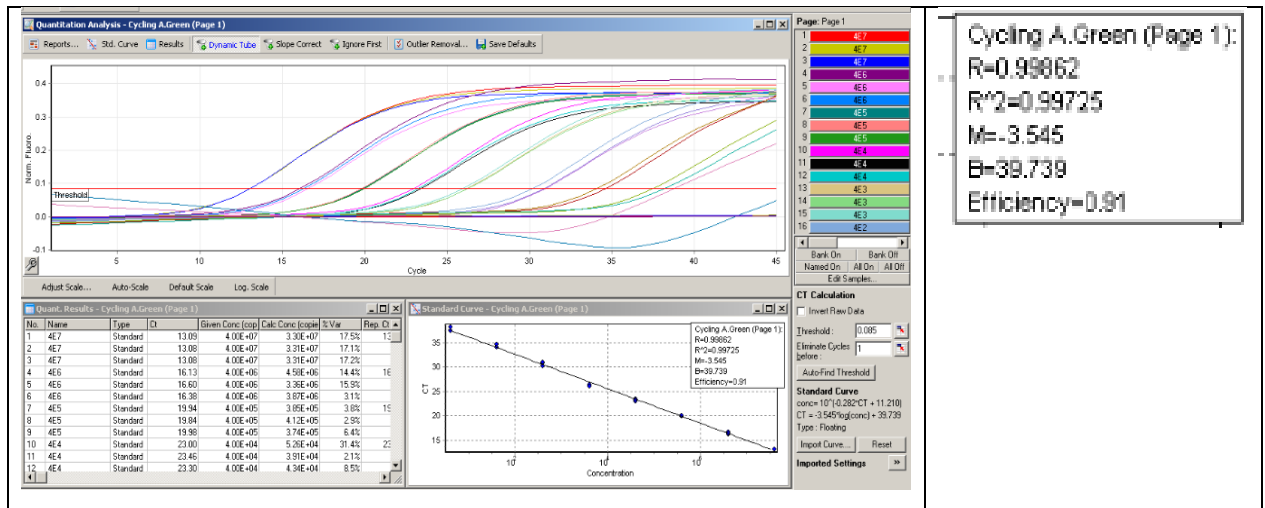


Figura 7. Estandarización de la qPCR para Poliomavirus humano

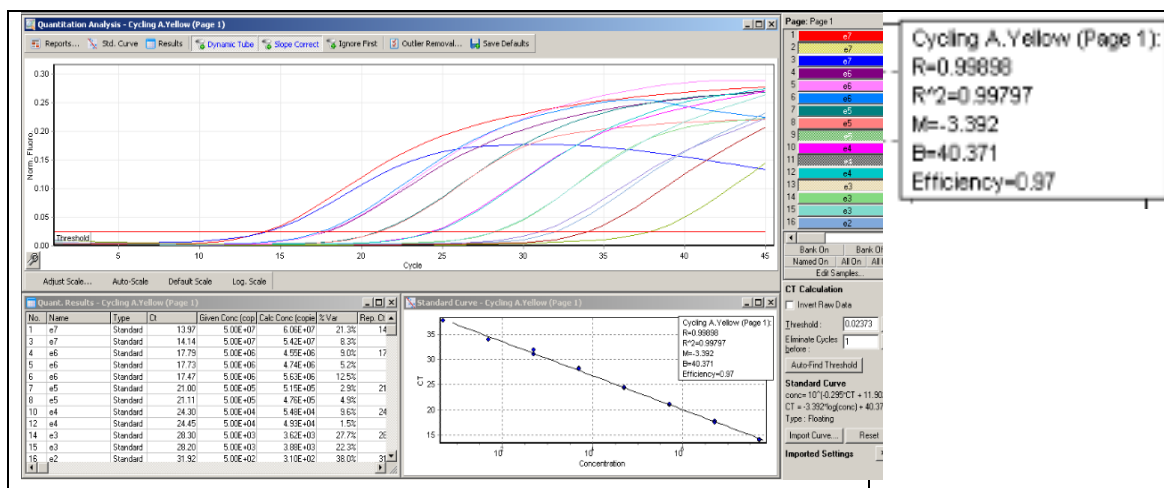


Figura 8. Estandarización de la qPCR para Poliomavirus bovino

Con el fin de estudiar la epidemiología molecular de los virus detectados, se procedió a la puesta a punto de las nested PCR para HAAdV, BoPyV, HPyV. Las nested PCRs para los G y P tipos de RVA ya estaban estandarizadas y puestas a punto en nuestro laboratorio. En todos los casos se observó la banda del amplicón a la altura esperada en la electroforesis en gel de agarosa para cada uno de los virus (HAAdV, BoPyV, HPyV) (Figuras 9, 10 y 11).

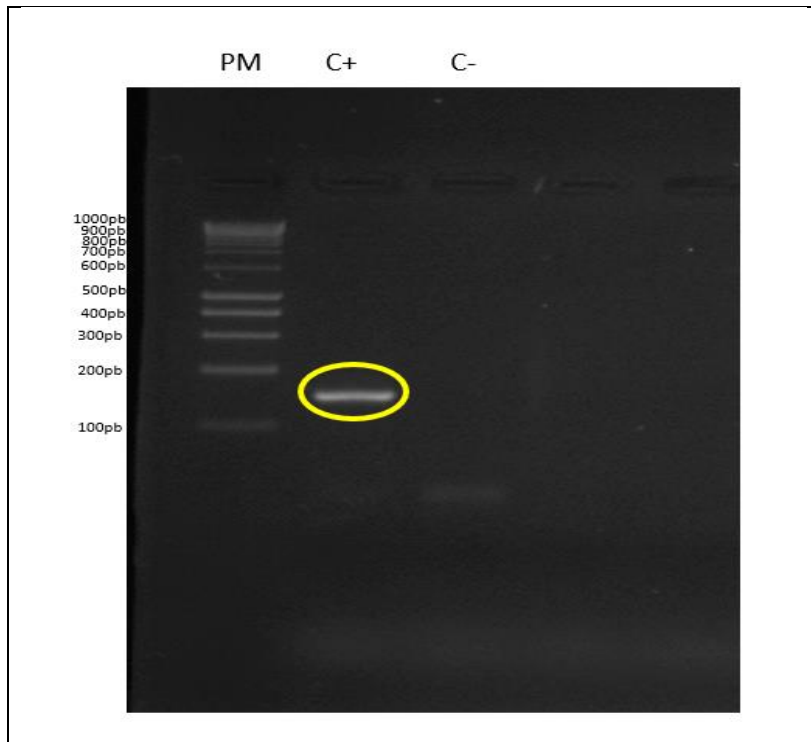


Figura 9. Estandarización de la PCR anidada para la amplificación de un segmento de 171 pb para HAAdV. Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con GoodView®. PM: peso molecular, C+: control positivo; C-: control negativo

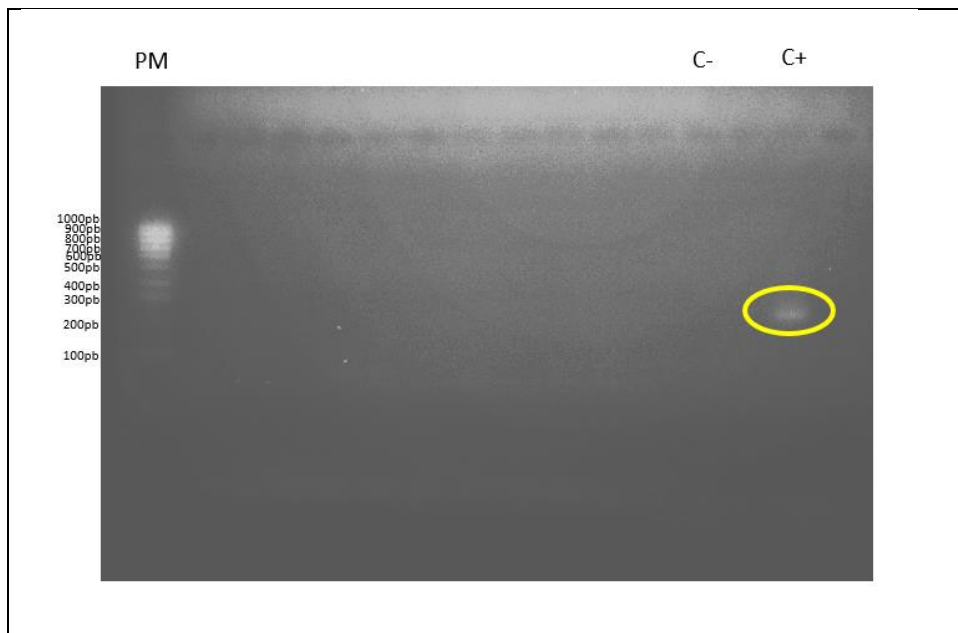


Figura 10. Estandarización de la PCR anidada para la amplificación de un segmento de 263 pb para BoPyV. Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con GoodView®. PM: peso molecular, C+: control positivo; C-: control negativo.

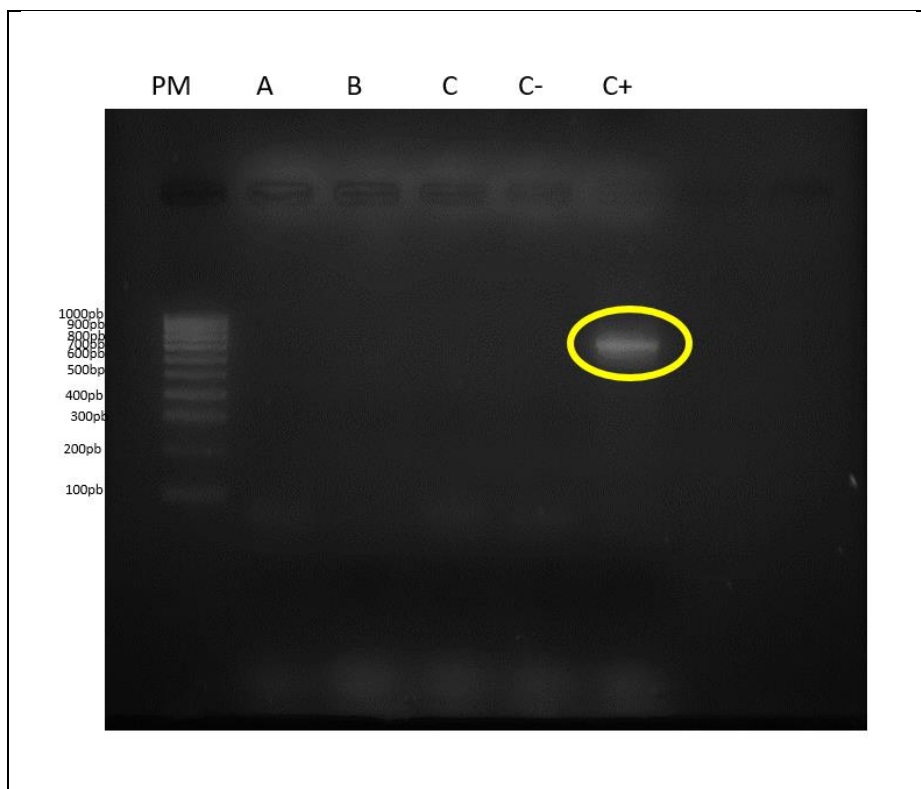


Figura 11. Estandarización de la PCR anidada para la amplificación de un segmento de 668 pb para HPyV. . Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con GoodView®. PM: peso molecular, C+: control positivo; C-: control negativo. Carriles A, B, C: muestras negativas.

En la Tabla 1 se observa la frecuencia de las muestras positivas detectadas por qPCR para cada uno de los virus analizados en ambas cuencas. Del total de 120 muestras colectadas en los ríos Uruguay y Santa Lucía, el 38% (45/120) de las muestras fueron positivas para RVA. En un 18% de las muestras se detectó HAdV (21/120), un 11% fue positivo para BoPyV (13/120) y un 3% de las muestras fue positivo para HPyV (3/120). Para las muestras colectadas en el Río Uruguay (n=48) la frecuencia de los virus estudiados fue la siguiente: el 38% (18/48) de las muestras fueron positivas para RVA, un 8% (4/48) fue positivo para BoPyV. En el 6% (3/48) de las muestras se encontró HAdV y en esta cuenca no fueron detectados ni los PAdV ni los HPyV. En el total de muestras colectadas en el río Santa Lucía (n=72), se encontró un 38% (27/72) de muestras positivas para RVA, seguido de un 25% (18/72) para HAdV, mientras que 13% (9/72) de las muestras fueron positivas para BoPyV y un 4% (3/72) para HPyV. De forma similar a lo

observamos en la cuenca del río Uruguay, en esta cuenca tampoco se observó la presencia de PAdV, indicador de contaminación fecal de origen suino.

Tabla 1. Frecuencia de HAdV, HPyV, BoPyV y RVA detectados en los ríos Santa Lucía y Uruguay entre junio de 2015 y mayo de 2016.

Río	HAdV		HPyV		BoPyV		RVA	
	Frecuencia (%)	95% IC*	Frecuencia (%)	95% IC*	Frecuencia (%)	95% IC*	Frecuencia (%)	95% IC*
Uruguay (n=48)	6	[1;17]	0	-	8	[2;20]	38	[24;53]
Sta Lucia (n=72)	25	[15;37]	4	[9;12]	13	[6;22]	38	[26;50]
Total (n=120)	18	[11;25]	3	[0.5;7]	11	[6;18]	38	[29;47]

* IC intervalo de confianza al 95%, dentro del rango dado se encuentra el valor real con un 95% de certeza.

Inicialmente RVA fue positivo en un 26% (31/120) de las 120 muestras analizadas a partir del concentrado puro, posteriormente, cuando el ácido nucleico de las muestras negativas para este virus fue analizado a partir de la dilución de 1:10 del ácido nucleico, encontramos RVA en un 16% (14/89) de estas muestras negativas. En ambas cuencas, el virus detectado con mayor frecuencia fue RVA, mientras que el virus indicador de contaminación fecal especie-específico mayormente detectado fue HAdV, este resultado nos indica una mayor contaminación de origen humano tomando ambas cuencas en conjunto. Con respecto al río Uruguay, el indicador de contaminación fecal especie-específico que más se detectó mediante las técnicas utilizadas fue BoPyV evidenciando una mayor contaminación de origen bovino.

En el río Santa Lucía, HAdV fue detectado con mayor frecuencia que BoPyV ($p = 0,0273$) y HPyV ($p = 0,002$). Además, BoPyV presentó una mayor frecuencia de detección en comparación con HPyV ($p = 0,0352$). Por otro lado, considerando las muestras colectadas en el Río Uruguay, tanto HAdV como

BoPyV fueron detectadas con mayor frecuencia que HPyV ($p = 0,0392$ y $p = 0,0205$, respectivamente).

En la Tabla 2 se observan las medias de las concentraciones en copias genómicas por litro obtenidas mediante qPCR. La concentración media para HAdV detectada en el río Uruguay fue de $1,6E+4$ cg/L, en el mismo orden que lo detectado en el río Santa Lucía. Para HPyV la concentración media fue de $1,8E+2$ cg/L encontrada únicamente en la cuenca del río Santa Lucía. La concentración media para BoPyV fue de $6,9E+3$ cg/L en el Río Uruguay y de $1,5E+4$ cg/L en el río Santa Lucía. Para RVA la concentración media en el Río Uruguay fue de $1,8E+5$ cg/L mientras que para la colecta del Río Santa Lucía fue de $9,5E+4$ cg/L.

Tabla 2. Cuantificación de HAdV, HPyV, BoPyV y RVA expresada en copias genómicas por litro (cg/L) detectados en los ríos Santa Lucía y Uruguay entre junio de 2015 y mayo de 2016.

	HAdV			HPyV			BoPyV			RVA		
	Media (SD)	Mín	Máx	Media (SD)	Mín	Máx	Media (SD)	Mín	Máx	Media (SD)	Mín	Máx
Uruguay	$1,6 \times 10^4$ ($2,1 \times 10^4$)	113	40100	-			$6,9 \times 10^3$ ($8,9 \times 10^3$)	360	19600	$1,8 \times 10^5$ ($1,9 \times 10^5$)	7200	650000
Sta Lucia	$1,5 \times 10^4$ ($1,4 \times 10^4$)	630	46900	$1,8 \times 10^2$ (0)	180	180	$1,5 \times 10^4$ ($3,1 \times 10^4$)	319	93400	$9,5 \times 10^4$ ($1,1 \times 10^5$)	1800	399000
Total	$1,5 \times 10^4$ ($1,5 \times 10^4$)	113	46900	$1,8 \times 10^2$ (0)	180	180	$1,2 \times 10^4$ ($2,6 \times 10^4$)	319	93400	$1,3 \times 10^5$ ($1,5 \times 10^5$)	1800	650000

SD: desvío estándar; Mín: mínimo; Máx: máximo.

En la Figura 12 se observan las cuantificaciones de los virus estudiados según los puntos de muestreo y el mes de colecta de las muestras para la cuenca del río Santa Lucía y las diferentes variables ambientales registradas durante el período de muestreo: precipitación acumulada, temperatura media y altura del río.

Podemos observar que RVA no muestra una marcada estacionalidad ya que está distribuido de forma similar en meses fríos y cálidos (Figura 12A). En agosto de 2015 (creciente del río) y abril de 2016, este virus se encontró en todos los puntos muestreados, mientras que en los meses de octubre de 2015, diciembre de 2015 y enero de 2016 no fue detectado en ninguno de los puntos. En junio de 2015 este virus fue detectado aguas debajo de Florida y en Paso Pache, y en julio de 2015 se repite la detección en el primer punto y en el Arroyo Canelón grande. En setiembre de 2015 fue detectado en todos los puntos excepto Paso Pache y aguas arriba de la ciudad de Santa Lucía, mientras que en noviembre de 2015 fue detectado aguas abajo de Florida y Santa Lucía. En febrero de 2016 se detectó en todos los puntos salvo aguas abajo de Florida y arriba de Santa Lucía, observándose en esta colecta el río bajo y con materia orgánica en el Arroyo Canelón Grande. En marzo de 2016 solamente fue detectado aguas abajo de Florida y en mayo de 2016 además de este punto también fue detectado en la toma de agua de OSE. Este virus presentó concentraciones similares en la mayoría de los meses y lugares colectados que fue en torno de $10E+5$ cg/L con la excepción del muestreo realizado en febrero de 2016 y ciertos puntos de abril de 2016 donde la concentración fue aproximadamente de $10E+4$ cg/L.

BoPyV (Figura 12B) fue detectado en varios puntos de colecta en junio de 2015: en Paso Pache, aguas arriba y abajo de Santa Lucía. En julio y agosto de 2015 y en mayo de 2016 fue detectado en el punto de la toma de agua de OSE. En octubre de 2015 y en abril de 2016 fue detectado aguas abajo de Florida, mientras que en marzo de 2016 fue detectado en Paso Pache. En setiembre, noviembre y diciembre de 2015, enero y febrero de 2016, BoPyV no fue detectado en ninguno de los puntos muestreados. La concentración de este virus presentó un rango de $10E+2$ cg/L a $10E+5$ cg/L.

HAdV (Figura 12C) fue detectado en todos los puntos únicamente en el muestreo de julio de 2015. En junio de 2015 se detectó en el Arroyo Canelón

Grande y en la toma de agua de OSE, punto en el que también se detecta en agosto de 2015. En setiembre de 2015, HAdV fue detectado en 4 puntos diferentes mientras que en octubre de 2015 también se detectó en 4 lugares diferentes coincidiendo los puntos aguas abajo y arriba de la ciudad de Santa Lucía. En abril de 2016 se detectó aguas abajo de Florida, mientras que en los meses de noviembre y diciembre de 2015 y enero, febrero, marzo y mayo de 2016 no fue detectado en ninguno de los puntos muestreados. HAdV presentó concentraciones que variaron de $10E+3$ cg/L a $10E+4$ cg/L.

En lo que se refiere a HPyV, este fue solamente detectado en tres ocasiones correspondientes a los meses de junio, setiembre y octubre de 2015 aguas abajo de Florida, Aguas Corrientes y Paso Pache, respectivamente, con similar concentración en torno de $10E+2$ cg/L (Figura 12D).

En cuanto a las variables ambientales, se puede observar que el nivel del río se mantuvo constante a lo largo de todo el período de estudio salvo en el mes de agosto de 2015 cuando el río estaba crecido. La temperatura presentó una media esperada para el registro de temperaturas observadas en esta región del país y se observaron tres picos de lluvia acumulada en los meses de agosto y noviembre de 2015 y marzo de 2016 (Figura 12E).

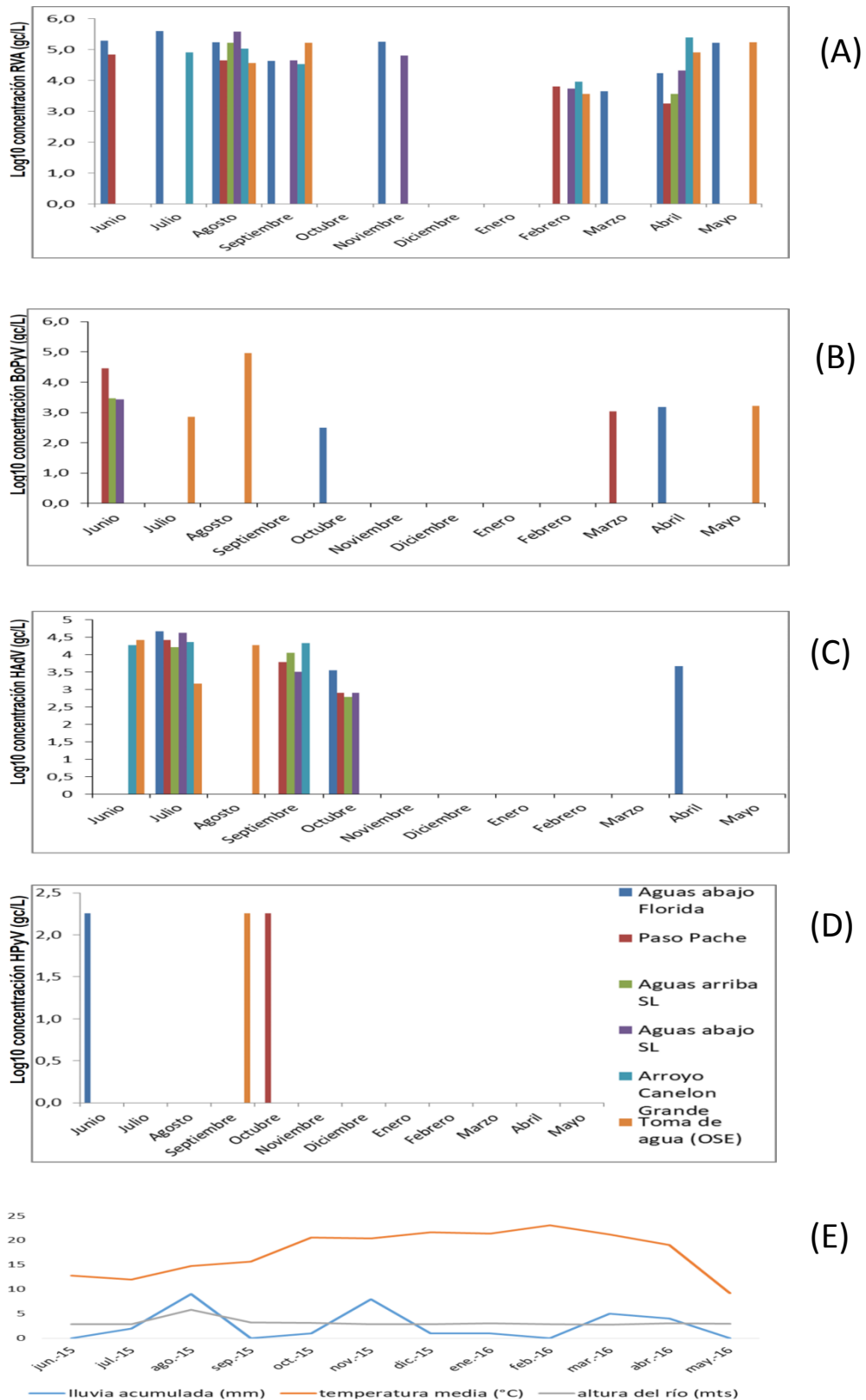


Figura 12. Concentración de los virus detectados según los puntos de muestreo y las fechas de las colectas para el río Santa Lucia. **(A):** RVA, **(B):** BoPyV, **(C):** HAAdV, **(D):** HPyV, **(E):** descripción de las variables ambientales durante el período de estudio.

En la Figura 13 se observan las cuantificaciones de los virus estudiados según los puntos de muestreo y el mes de colecta de las muestras para la cuenca del río Uruguay y diferentes variables ambientales registradas durante el período de muestreo: precipitación acumulada, temperatura media y altura del río.

RVA (Figura 13A) muestra una marcada y clara estacionalidad en los meses fríos donde las temperaturas fueron menores a 20 °C (de junio a octubre de 2015) habiéndose detectado en todos los puntos muestreados. Durante los meses de abril y mayo de 2016 fue detectado en el punto correspondiente a la toma de agua de OSE, mientras que en el primero también fue detectado en el Parque del Lago (aguas arriba de la Represa de Salto Grande) al igual que en setiembre 2015. Durante el período comprendido entre los meses de noviembre de 2015 a marzo de 2016, este virus no fue detectado en ningún punto muestreado. Vale resaltar que la concentración de RVA fue relativamente constante con un valor aproximado de $10E+4$ cg/L.

HAdV (Figura 13B) fue detectado en julio de 2015 en el Parque del Lago, en agosto de 2015 en el punto aguas abajo de la ciudad de Salto y en setiembre de 2015 en el punto agua abajo de la represa de Salto Grande; mientras que en el resto de los meses no fue detectado en ninguno de los puntos muestreados. Este virus presentó una concentración variable entre $10E+2$ cg/L y $10E+4$ cg/L.

En lo que se refiere a BoPyV (Figura 13C), este fue detectado en julio y agosto de 2015 en la toma de agua de OSE, en octubre de 2015 aguas abajo de la represa y en febrero de 2016 aguas arriba de la represa, pero en ninguna de las colectas fue detectado aguas abajo de Salto lugar donde se localiza uno de los frigoríficos de ganado bovino y ovino de la zona noroeste del país.

En lo que se refiere al nivel del río Uruguay, en julio de 2015, de octubre a diciembre de 2015 y en abril de 2016 presentó períodos de inundaciones superando su cota normal de 5 metros.

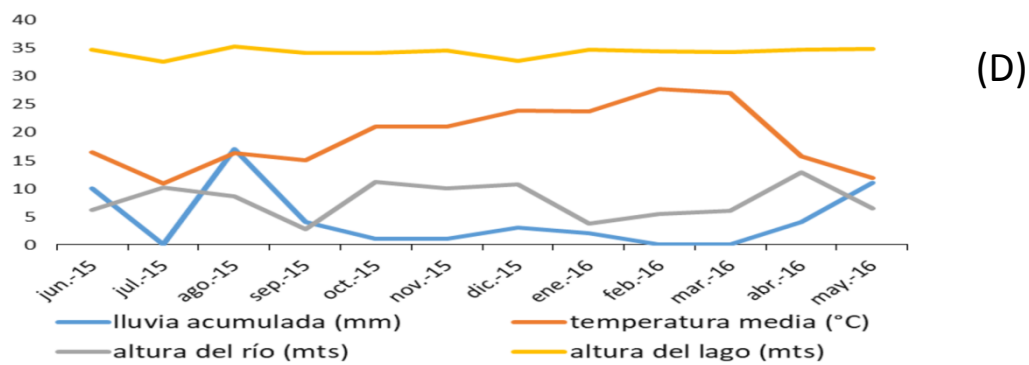
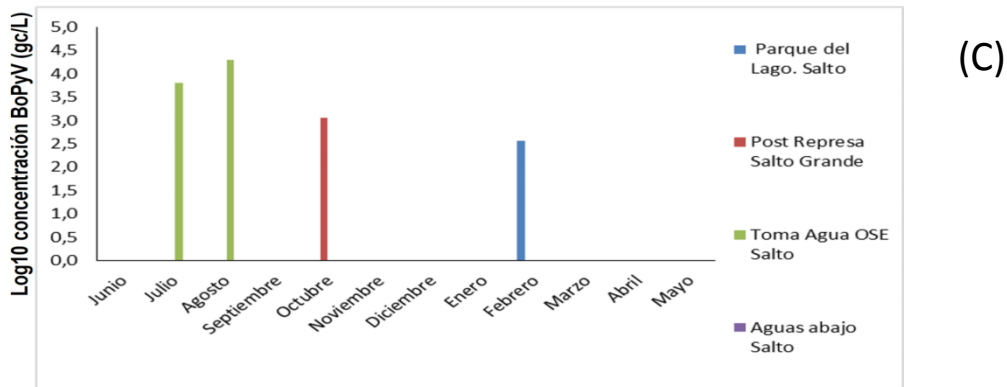
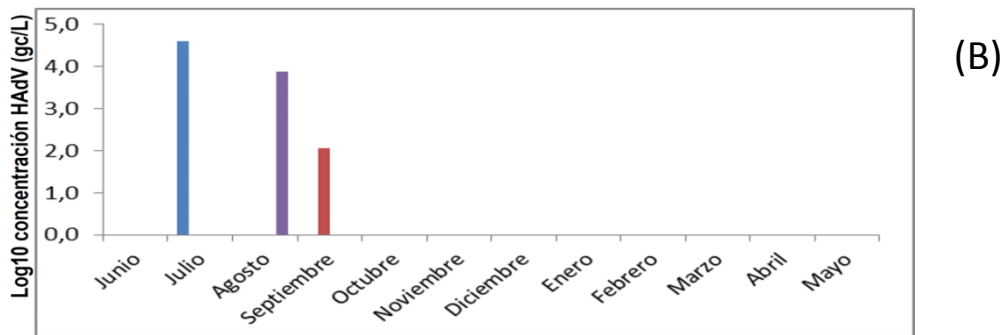
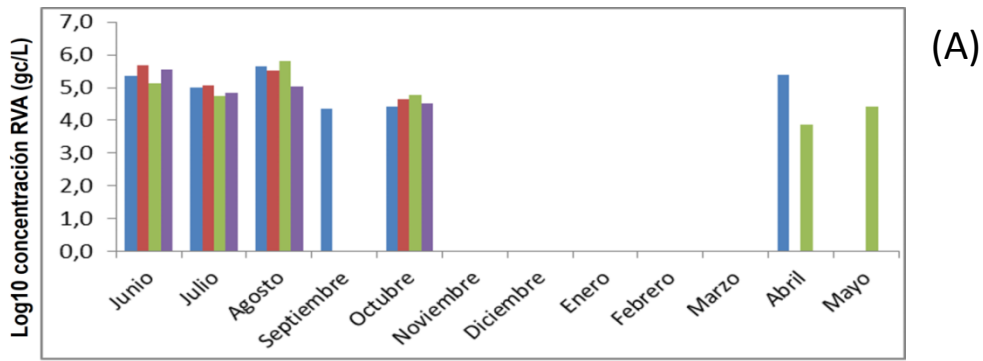


Figura 13. Concentración de los virus detectados según los puntos de muestreo y las fechas de la colecta para el río Uruguay. **(A):** RVA, **(B):** HAdV, **(C):** BoPyV, **(D):** descripción de variables ambientales durante el período de estudio.

Para poder realizar predicciones de la presencia de estos virus con relación a las variables ambientales como la temperatura y las precipitaciones, se realizó un análisis de regresión logística seguido del cálculo de los criterios de información de Akaike (AIC) para determinar el mejor modelo adecuado a nuestros datos (Tabla 3). Este análisis se realizó para indicadores virales de contaminación fecal humana (HAdV y/o HPyV) y el indicador viral de contaminación fecal bovina (BoPyV). De acuerdo con este análisis, existe una tendencia de cinco veces más chance de detectar estos virus humanos en días de baja precipitación (0-4 mm) en comparación con días con precipitaciones más elevadas (4-17 mm) ($p = 0,063$). De una manera similar existen siete y seis veces más chance de encontrar estos virus indicadores humanos en días más fríos ($<20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($p = 0,001$) y en ríos menos caudalosos y más angostos (río Santa Lucía) ($p = 0,012$), respectivamente.

Tabla 3. Modelo de regresión logística para los virus humanos (HAdV y HPyV) y animales (BoPyV) según las condiciones ambientales.

Covariables	Virus humanos (modelo I, AIC=97,12)			BoPyV (modelo II, AIC=87,51)		
	OR	[95% IC]	valor p	OR	[95% IC]	valor p
Precipitación (mm³)						
4-17	Ref.	-	-	-	-	-
0-4	4,51	[0,92;22,10]	0,063	1,19	[0,30;4,75]	0,493
Temperatura (°C)						
≥20	Ref.	-	-	-	-	-
<20	7,4	[2,22;24,46]	0,001	2,5	[0,72;8,65]	0,148
Río						
Uruguay	Ref.	-	-	-	-	-
Santa Lucía	5,6	[1,47;21,40]	0,012	1,6	[0,44;5,47]	0,493

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Para evaluar si los HAdV detectados en el muestreo eran infectivos se realizó la técnica de ICC-qPCR. El cultivo celular con células A549 fue infectado con las diez muestras positivas (en diluciones 1:2) para HAdV por *qPCR* que presentaron las concentraciones más elevadas. Dos (A390 y A391) de las diez muestras cultivadas fueron positivas por *qPCR*. Posteriormente, estas muestras positivas por ICC-qPCR fueron amplificadas mediante una *nested PCR*, secuenciadas y analizadas filogenéticamente. Estas cepas según los análisis filogenéticos realizados, corresponden a HAdV de la especie B subtipo 3 (Figura 14), que están asociados con conjuntivitis, cistitis hemorrágicas y enfermedades respiratorias. Estas dos muestras pertenecen a la colecta realizada en el mes de julio 2015 en la cuenca del río Santa Lucía en los puntos de Paso Pache y aguas arriba de la ciudad de Santa Lucía con una temperatura promedio del día de la colecta de 12 °C y 2 mm de lluvia acumulada.

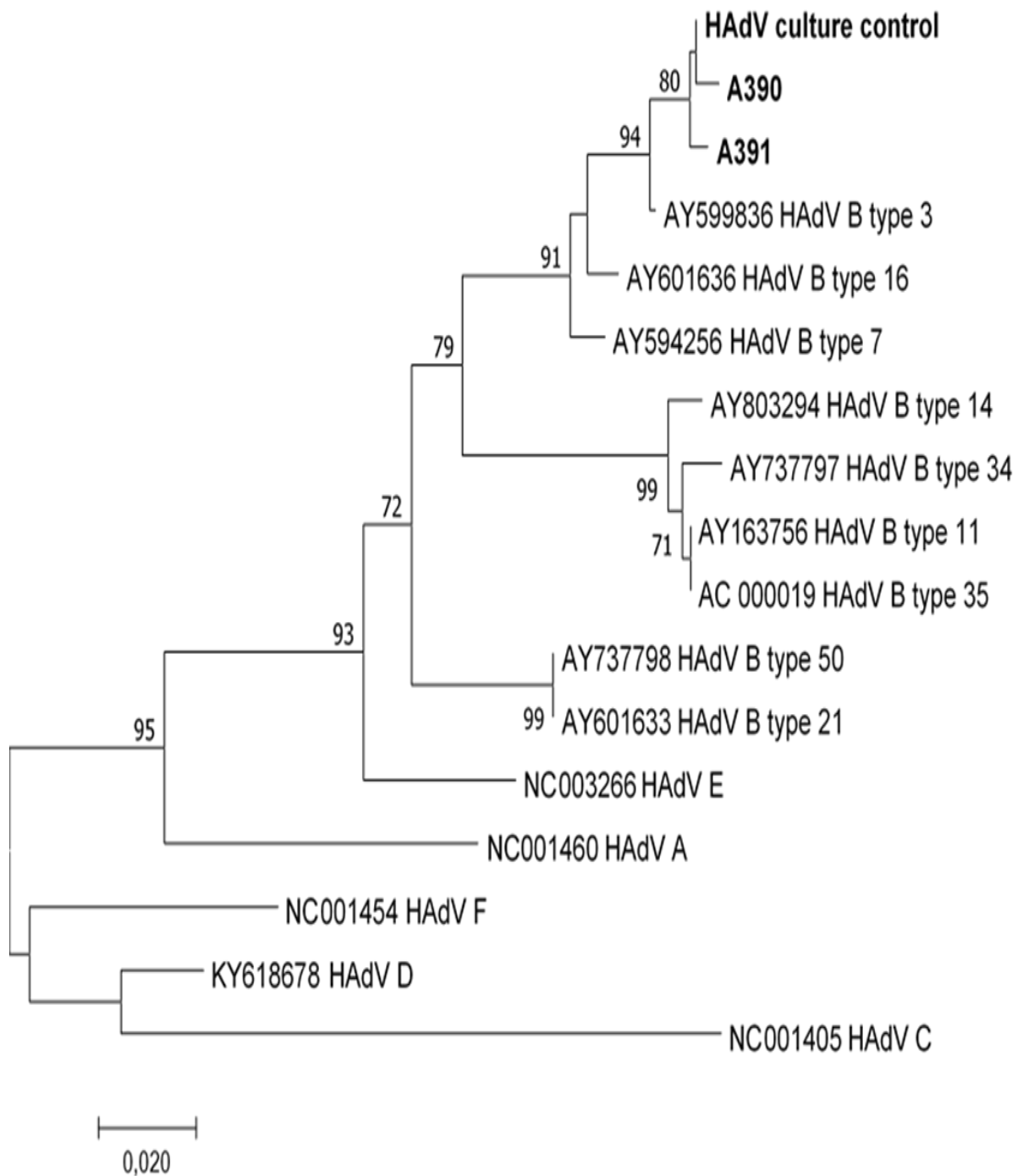


Figura 14. Árbol filogenético de HAdV obtenidos de muestras positivas por la ICC-qPCR. HAdV Culture control: Control Positivo de HAdV utilizado en el ensayo de ICC-qPCR. Las estirpes de referencias están presentadas por su número de acceso seguido de la especie y el tipo de HAdV.

Todas las muestras positivas por *qPCR* para los virus HAdV, BoPyV, HPyV y RVA fueron sometidas al ensayo de PCR cualitativo con la finalidad de realizar el estudio de la epidemiología molecular de cada virus. De todos los ensayos realizados, solo obtuvimos la amplificación para RVA en una única muestra la cual fue exitosamente secuenciada y analizada filogenéticamente.

En la Figura 15 se observa la única secuencia de RVA (A379) que se logró amplificar por *nested PCR*. Esta corresponde a la colecta de junio de 2015 aguas abajo de la ciudad de Florida. El análisis filogenético corresponde al gen que codifica VP4 que nos indica el P tipo de la cepa secuenciada. En el árbol podemos observar que nuestra cepa agrupa con cepas de RVA humano del tipo P [8] y pertenece al linaje III.



Figura 15. Árbol filogenético basado en el gen VP4 (P-tipo) de la cepa de RVA (A379) obtenida en el presente estudio. Las cepas de referencia de RVA están indicadas por el número de acceso seguido del código de identificación propuesto por el *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG).

Los coliformes fecales fueron analizados en las muestras colectas en ambas cuencas como se puede observar en la Figura 16. Para facilitar la

visualización en la gráfica se estableció igual a 300 UFC/100 ml aquellas muestras que presentaron crecimiento bacteriano confluyente.

En cuanto a la colecta del río Santa Lucía (Figura 16A), los coliformes fecales fueron detectados en todos los puntos muestreados, presentando una mayor concentración y frecuencia aguas abajo de la ciudad de Florida y en el arroyo Canelón Grande. En el punto aguas abajo de Santa Lucía, aunque los coliformes fecales fueron observados en la mayoría de las colectas, las concentraciones fueron generalmente más bajas que en el punto aguas abajo de la ciudad de Florida. En Aguas Corrientes, donde OSE toma el agua para ser potabilizada, se detectaron en todos los meses muestreados, no superando en ninguno de los puntos las 250 UFC/100ml con la excepción de la colecta realizada en el mes de agosto de 2015.

En el río Uruguay (Figura 16B), se puede observar que a excepción de los meses de marzo y abril de 2016, los coliformes fecales fueron detectados en todos los puntos analizados, con una sugerente concentración mayor aguas abajo de la ciudad de Salto.

Puede observarse que principalmente en la cuenca del río Santa Lucía, aunque también en la cuenca del río Uruguay, los HAdV fueron detectados en muchas muestras que no presentaron crecimiento bacteriano confluyente.

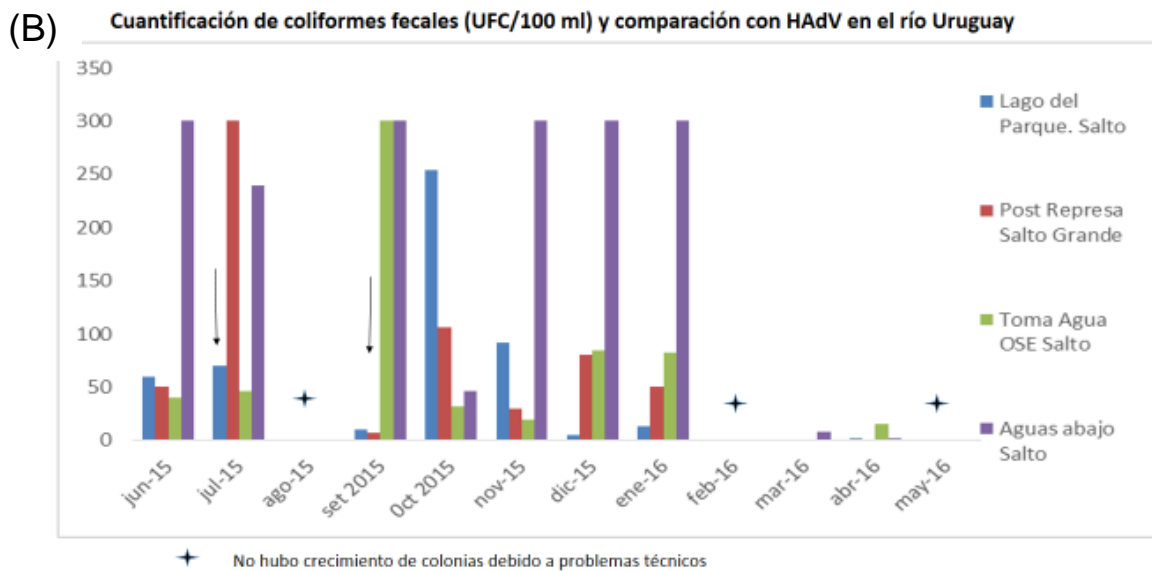
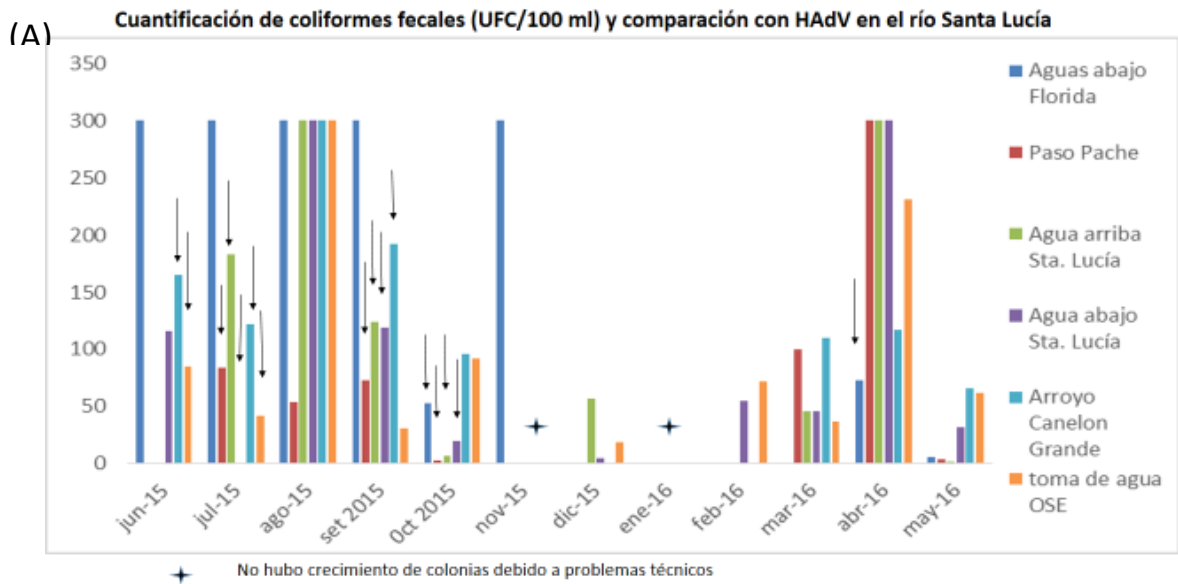


Figura 16. Coliformes fecales expresados en Unidades Formadoras de Colonia por 100 ml (UFC/100 ml) analizados en el muestreo del río Santa Lucía (A) y del río Uruguay (B). Las flechas indican los HAdV detectados en cada colecta donde no se evidenció un crecimiento bacteriano confluyente.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo fueron analizadas un total de 120 muestras de agua superficial discriminadas en 48 pertenecientes a la colecta realizada en el Río Uruguay y 72 pertenecientes a la colecta del Río Santa Lucía para determinar el origen de la contaminación fecal utilizando los HAdV, HPyV, BoPyV y PAdV como virus indicadores de contaminación fecal especie-específica. En forma paralela también se estudió la presencia de los RVA ya que son los principales virus entéricos responsables de las gastroenteritis agudas sobre todo en niños pequeños de todo el mundo aunque una vacuna de RVA está aprobada e incluida en los calendarios de vacunación de la mayoría de los países de América Latina. Sin embargo, en nuestro país no está incluida de forma gratuita en el calendario de vacunación, por lo que se la debe comprar presentando un costo elevado (vacunas, MSP).

En el presente estudio se pudo observar la presencia de contaminación fecal de origen humano y bovino mediante la detección de virus indicadores que son especie-específicos en ambas cuencas. Evidenciando que tanto las poblaciones humanas que descargan sus desechos en dichos ríos, como la producción ganadera presente allí, están provocando un deterioro constante y paulatino en la calidad del agua de estas cuencas.

Los RVA son excretados en las heces de individuos infectados en altas concentraciones (hasta 10^{11} virus/gramo de materia fecal), tienen una baja dosis infectiva (entre 10 y 100 viriones infectivos), y su estructura molecular los hace muy estables en ambientes acuáticos por largos períodos de tiempo, así como muy resistentes a las condiciones adversas del medio ambiente (Ansari et al., 1991; Espinosa et al., 2008; Estes & Greenberg, 2013). Estudios realizados en nuestro país en aguas residuales mostraron una marcada estacionalidad en RVA en la región norte de nuestro país siendo detectados principalmente en los meses de invierno, coincidiendo con 2 picos epidemiológicos en la misma región (Tort et al., 2015a y b). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a RVA en el río Uruguay sugieren que este virus presenta una marcada estacionalidad, pudiendo ser detectado solo en los meses fríos, mientras que en la cuenca del río Santa Lucía este virus fue detectado tanto en meses fríos como cálidos del año.

Diversos estudios indican que en regiones templadas como la de Uruguay, las enfermedades causadas por RVA ocurren más frecuentemente en invierno y su detección en el ambiente también tiene un pico en esta época del año (Cook et al., 1990; Estes & Greenberg, 2013). Otros estudios de la región sugieren que los individuos infectados asintomáticos juegan un rol importante en el mantenimiento de la circulación del virus durante los meses calurosos (Barril et al., 2015).

Los riesgos de contaminación por RVA varían según la época del año siendo un factor clave el ciclo hidrológico del río en estudio. Los virus presentan transporte dinámico, lo que se refleja en aumentos de casos de gastroenteritis asociados a períodos de inundación (Vieira et al., 2016). En el caso del río Uruguay, que contamos con registros históricos de variación del nivel del río, que fueron aportados por la Prefectura Naval de la ciudad de Salto, no encontramos una clara asociación entre los niveles altos del río (inundaciones) y un aumento en la frecuencia de RVA. Lo que puede estar relacionado a que este aumento del nivel del río ocurrió en meses cálidos, o, que al haber un gran caudal en el río, el virus estaba presente pero en concentraciones menores y en nuestra toma de muestra no fue detectado.

Al analizar la frecuencia de detección de RVA en la cuenca del río Santa Lucía, podemos observar que las poblaciones humanas que allí habitan, como son las ciudades de Florida, Canelones y Santa Lucía, están expuestas durante todo el año a contraer infecciones gastrointestinales causadas por este virus mediante la utilización de este río para actividades de recreación y riego. En estudios realizados en nuestro país en muestras clínicas y aguas residuales se han detectado cepas con genotipo P[8] (Tort et al., 2015a; 2015b). Este mismo P-tipo fue el detectado en el presente estudio en la cuenca del Río Santa Lucía en el punto de muestreo correspondiente a aguas abajo de la ciudad de Florida. Aunque no se obtuvo el G-tipo, el P obtenido (P[8]) es de origen humano y el linaje III también corresponde a humanos, además de tener en cuenta que fue detectado aguas abajo de la ciudad de Florida. Podemos inferir que la estirpe obtenida es de origen humano y la población de Florida estaría impactando directamente en la calidad del agua del río Santa Lucía en ese punto.

RVA fue el virus más detectado, lo que no es sorprendente, ya que si observamos lo que sucede en Brasil, donde el programa nacional de vacunación de RVA fue implementado en 2006 (Carvalho-Costa et al., 2011), éste continúa siendo uno de los contaminantes virales más importantes observado en muestras ambientales (Assis et al., 2015; Elmahdy et al., 2016; Vieira, et al., 2016). En nuestro país aún no tenemos en nuestro esquema de vacunación gratuita dicha vacuna, por lo que no sorprende que este virus esté circulando en nuestra población en una alta frecuencia (Tort et al., 2015; MSP, 2018).

Podemos establecer que se ha logrado detectar RVA en muestras de agua superficial tanto en el río Uruguay como en el río Santa Lucía sugiriendo que las poblaciones que viven sobre estos ríos están en constante exposición a este agente, en posición vulnerable a contraer infecciones gastrointestinales agudas que, en el caso de los niños pequeños puede provocar casos graves con hospitalización y eventualmente fallecimientos (Estes & Greenberg, 2013; Tort et al., 2015a; 2015b).

Por otro lado, en Uruguay los parámetros microbiológicos que se consideran para establecer si cierto curso de agua está apto para consumo, riego o recreación, son los bacterianos como ser los coliformes fecales que son usualmente considerados para determinar la calidad del agua (Artículo 253/79 del Poder Ejecutivo). Sin embargo, existe fuerte evidencia que demuestra la ausencia de correlación entre el nivel de contaminación bacteriano y viral en matrices acuáticas (Bosch et al., 1998; Pusch et al., 2005; Payment & Locas, 2011), por lo cual, basarse únicamente en indicadores de origen bacteriano podría significar un riesgo importante para la salud humana y animal en tanto se desconoce totalmente la posible fuente de contaminación viral que está afectando dicho cuerpo de agua. Vale resaltar que en el decreto mencionado anteriormente, para aguas destinadas para el abastecimiento de agua potable a poblaciones se establece que el nivel de los coliformes fecales no deberá exceder el límite de 2000 UFC/100 mL en ninguna de al menos 5 muestras, debiendo la media geométrica de las mismas estar por debajo de 1000 UFC/100 mL. En nuestro estudio, se detectaron muestras positivas para RVA en muchas de las muestras que eran aptas para el mencionado fin según este decreto revelando el riesgo que presentan principalmente los niños menores de

5 años de las poblaciones localizadas a las orillas de estos ríos a contraer enfermedades de GA.

En lo que se refiere a la detección de los diferentes virus indicadores de contaminación fecal especie-específicos, los resultados sugieren que no habría contaminación fecal de origen porcino ya que PAdV no fue detectado en ninguno de los puntos muestreados, aunque existen factores que podrían haber colaborado con la falta de detección de este virus. Uno de estos factores podría ser que éste se encuentre en una baja concentración en el ambiente y que en nuestra muestra de 0,5 litros no hayamos captado ninguna partícula viral. Otro factor que pudo haber favorecido a la falta de detección podría haber sido el método de concentración utilizado, que sumado a la baja concentración, nos haya conducido a este resultado. Colectar un volumen mayor en cada muestra podría aumentar la sensibilidad de la detección de este virus resultando en un número mayor de muestras positivas. Vale destacar que las técnicas utilizadas en este estudio para la concentración y detección viral son sensibles, efectivas y utilizadas a nivel mundial (Katayama et al., 2002; Maluquer de Motes et al., 2004; Villar et al., 2007; Haramoto et al., 2009; Fumian et al., 2010). Algunos factores, incluido el volumen de agua de las muestras, la eficacia de recuperación viral, la sensibilidad analítica de la *qPCR* y la presencia de posibles inhibidores, pueden influir en las tasas de detección de genomas virales en agua (Girones et al., 2010). Por otro lado, si comparamos PAdV con BoPyV, podemos observar que BoPyV fue detectado en ambas cuencas, indicándonos contaminación fecal de origen bovino. El hecho de que se haya detectado BoPyV y no PAdV en nuestro muestreo puede deberse a que existe una mayor producción bovina respecto a la porcina en los puntos estudiados. Datos oficiales establecen que el rubro bovino representó el 28% del Producto Bruto Interno (PBI) agropecuario, mientras que la producción porcina ha tenido siempre escasa relevancia, no llegando generalmente al 1% del PBI agropecuario total (MGAP, DIEA, 2017). Según el Anuario estadístico Agropecuario del 2017 publicado por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), se puede observar que la existencia de suinos en el país es de 187.000 cabezas en el año 2016, mientras que las cabezas de vacunos para el mismo año son 11.993.000, lo que apoyaría nuestros resultados que muestra la presencia de BoPyV y ausencia de PAdV (MGAP, DIEIA, 2017). Consideramos

importante recordar que cuando nos referimos a bovinos no solo estamos haciendo referencia a la cría de forma intensiva o extensiva con fines de producción cárnica, sino también al ganado lechero, sector que tiene una fuerte presencia en la cuenca del río Santa Lucía conocida como la cuenca lechera del Uruguay (MGAP, DIEA, 2017). Si comparamos la cantidad de cabezas de ganado vacuno entre ambas cuencas, podemos observar según el Anuario Estadístico Agropecuario que en el año 2016 en el departamento de Salto, lugar de muestreo de la cuenca del río Uruguay, existían 944.000 cabezas de vacunos con una tendencia al alza. Con respecto a la cuenca del Santa Lucía, si observamos las cabezas de vacunos en los departamentos de Florida, San José y Canelones que fueron los muestreados en este trabajo, el anuario del 2016, nos muestra una existencia de 883.000 cabezas en Florida, mientras que para San José fue de 369.000 cabezas y para Canelones de 286.000 vacunos (MGAP, DIEA, 2017). Por lo que estos datos estarían apoyando nuestros resultados donde observamos una mayor frecuencia de BoPyV en la cuenca del Río Santa Lucía respecto a la del Río Uruguay. Por otro lado si analizamos los límites de detección de las qPCR para PAdV fue de 50 copias por reacción mientras que para BoPyV fue de 5 copias por reacción, lo que nos podría apoyar nuestras frecuencias de detección de haber encontrado BoPyV y no PAdV.

En la cuenca del Río Santa Lucía se observó una mayor presencia de virus indicadores de contaminación fecal de origen exclusivamente humano (HAdV y HPyV) respecto a la cuenca del Río Uruguay. Uno de los factores que podría estar influyendo en este resultado es que en la cuenca del Río Santa Lucía hay mayor densidad poblacional ya que se encuentran las ciudades de Florida (33640 hab.), Santa Lucía (16742 hab), Aguas Corrientes (1047 hab), 25 de Agosto (1849 hab), Paso Pache (147 hab). Mientras que sobre la zona muestreada del río Uruguay se encuentra únicamente la ciudad de Salto (104028 hab) impactando únicamente sobre el último punto de muestreo (aguas abajo de la ciudad de Salto).

Por otro lado, si comparamos los caudales de ambos ríos, podemos observar que el del Río Santa Lucía es de 2.700 m³/s y el del Río Uruguay es de 4.622 m³/s (Mujica, 2007), lo que nos indica que al ser el río Uruguay de mayor caudal, los virus estudiados podrían estar más diluidos cuando lo

comparamos con el Río Santa Lucía. Otra observación que se podría hacer respecto al caudal del Río Uruguay es que esperábamos encontrar BoPyV aguas abajo de Salto ya que en la cercanía de ese punto existe un frigorífico, pero no fue detectado en nuestro muestreo. Esto nos podría indicar que posiblemente exista una baja concentración de BoPyV, principalmente debido al gran caudal del río Uruguay, o también se puede sugerir que los días en que se muestreó no hubo faena bovina y por lo tanto no se detectó este virus.

Al analizar la frecuencia de detección de los virus indicadores de contaminación fecal de origen humano en la cuenca del Santa Lucía, podemos observar que las poblaciones humanas que allí habitan como ser Florida, Canelones y Santa Lucía están expuestas a contraer infecciones causadas por éstos. En lo que se refiere al Río Uruguay, desde octubre de 2015 hasta abril de 2016 no se detectaron virus indicadores de contaminación fecal de origen humano sugiriendo que existiría una baja contaminación por estos virus indicadores de contaminación humana.

Los compuestos inhibidores de PCR están presentes de forma natural en el medio ambiente (ácidos húmicos y fúlvicos, proteínas, metales y sales) y evitan que las enzimas amplifiquen una secuencia diana, produciendo un resultado falso negativo (Reynolds, 2004). En el presente estudio, la dilución de 1:10 de los ácidos nucleicos se mostró eficiente ya que observamos un aumento en la detección de los virus analizados probablemente debido a la concomitante dilución de los inhibidos ambientales.

Los factores ambientales son altamente relevantes para la diseminación global de patógenos virales. Estos factores son la radiación ultravioleta, la temperatura, la lluvia y los períodos secos. Los virus indicadores de contaminación fecal de origen humano en ambas cuencas se encontraron principalmente cuando el río estaba en su nivel normal (altura de 5 metros para el Río Uruguay y de 4,5 metros para el Río Santa Lucía), aunque también se detectaron durante los períodos de inundación. Sin embargo, un estudio realizado en la región del Amazonas, mostró diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de virus siendo mayoritariamente detectados en la estación lluviosa cuando comparados con las estaciones de seca (Vieira et al., 2016). Cabe destacar, que el clima en nuestro país no

presenta estaciones de lluvia o de seca marcadas sino que las precipitaciones son constantes durante todo el año.

Existe un efecto significativo de la lluvia y la estación lluviosa en el aumento de la contaminación fecal animal y humana en el ambiente (Kim et al., 2016). Las lluvias excesivas pueden causar un aumento en el transporte de los patógenos, aumentando la penetración en el suelo y el transporte a ríos, aguas superficiales y pozos. Por otro lado, los largos períodos de clima seco pueden reducir el volumen de los ríos, lo que puede aumentar la concentración de los patógenos (Cann et al., 2013). Los períodos de lluvia en las cuencas del río Santa Lucía y Uruguay durante el período de muestreo nunca excedieron los 17 mm de lluvia acumulada, lo que sugiere que este pequeño volumen de precipitaciones no afectaría la dispersión de estos virus estudiados.

La contaminación fecal humana se considera más importante que la contaminación fecal animal en términos de riesgo para la salud humana. Sin embargo, en algunos casos, los contaminantes fecales de origen animal también pueden tener un impacto significativo en la calidad del agua microbiana y el riesgo para la salud humana (OMS, 2003). Además, algunos estudios indican que el riesgo para la salud humana asociado con los residuos fecales de diferentes animales varía según la especie en cuestión. Por lo tanto, el riesgo asociado con la exposición al agua afectada por las heces del ganado es mayor a los riesgos asociados con la exposición al agua contaminada con heces de gaviota, cerdo o pollo (Soller et al., 2010). Tanto en el Río Santa Lucía como en el Río Uruguay, los virus indicadores de contaminación fecal humana se encontraron con mayor frecuencia que los de origen animal, lo que sugiere que las poblaciones humanas localizadas a orillas de estos ríos están más expuestas a infecciones por virus humanos.

En los puntos de colecta del Río Uruguay identificados aguas arriba y abajo de la represa, así como en el punto de toma de agua para consumo (todos localizados aguas arriba de la ciudad de Salto), los virus indicadores de contaminación fecal humana detectados podrían deberse a la contribución de las ciudades argentinas y uruguayas que están a unos 40 km río arriba de la represa. Estas muestras positivas corresponden a meses donde la temperatura fue inferior a 20 °C, lo que sugiere que estos virus presentan una mayor estabilidad en el ambiente con respecto a temperaturas más elevadas y por lo

tanto una mayor circulación y una amenaza continua a la población expuesta. La radiación UVB es el principal factor ambiental que desafía la inactivación viral seguido por la actividad biótica asociada indirectamente a temperaturas más altas y, finalmente, por la radiación UVA (Carratala et al., 2013).

Es relevante evaluar la integridad viral, que comprende el estado de conservación de las partículas virales, definiéndose a las partículas no dañadas como aquellas en las que el material genético está protegido por la cápside viral (Girones et al., 2010); e infectividad, definida como la capacidad del virus para replicarse en células permisivas (Herzog et al., 2008), en lugar de solo evaluar la presencia o ausencia del genoma viral (Fongaro et al., 2013). Dos de las diez muestras positivas para HAdV detectadas por *qPCR* (colectadas en el invierno), cultivadas en las células A549 fueron infectivas y se replicaron en la ICC-*qPCR*, lo que evidencia no sólo la presencia del genoma viral en estas aguas superficiales sino también la presencia de virus con plena capacidad de infectar a un huésped susceptible. Después de la caracterización molecular observamos que estas muestras pertenecen a la especie B, que está relacionado con enfermedades como conjuntivitis, enfermedad respiratoria aguda y cistitis hemorrágica y que afectan al sistema nervioso central (Knipe & Howley, 2013). Según estudios recientes, HAdV-2 es uno de los serotipos más comúnmente excretados por humanos, lo que sugiere que este serotipo se excreta intermitentemente en las heces de la mayoría de las personas, incluso asintomáticas (Wyn-Jones et al., 2011). Al igual que estos autores, Fongaro y colaboradores (2013) observaron en Brasil que HAdV-2 perteneciente a la especie C es el que más comúnmente circula y origina síntomas respiratorios. Estudios realizados en los Estados Unidos, han revelado que las cepas HAdV altamente prevalente entre los niños son las HAdV-3 y HAdV-7, siendo una causa frecuente de brotes respiratorios (Kajon et al., 2010; Gray, 2011). Los HAdV-3, 7 y 21 generalmente causan brotes de enfermedades respiratorias febriles y neumonía entre adolescentes y adultos (Gerald et al., 2005). En nuestro estudio, el serotipo circulante y además infectivo encontrado fue el HAdV especie B serotipo 3. La única detección de este serotipo no significa que no circulen otros serotipos en las poblaciones en otras épocas del año o puntos de muestreo. También, en el momento de la colecta podrían haber otras partículas infectivas que luego de que la muestra fue llevada al laboratorio,

sometida al método de concentración y posterior conservación previa al análisis; se pudieron haber degradado y ya no ser infectivas para ser detectadas en la ICC-qPCR. El serotipo de HAdV más prevalente detectado en aguas residuales y superficiales es HAdV 41 que pertenece a la especie F, que ha sido descrito como el segundo agente etiológico viral de gastroenteritis infantil, luego de RV, en varios países del mundo (Fong et al., 2007; Bofill-Mas et al., 2010; Wyn-Jones et al., 2011; Lee et al., 2013; Ogorzaly et al., 2013a). Lamentablemente no existen datos epidemiológicos sobre los diferentes HAdV circulantes en el ambiente en aguas superficiales en nuestro país para realizar estudios comparativos con nuestras secuencias detectadas. La población que utiliza las aguas del Río Santa Lucía para riego con la concomitante generación de aerosoles en la región donde fueron detectados los HAdV-3 infectivos estaría expuesta a contraer enfermedades relacionadas con el tracto respiratorio originadas por la infección de este virus entérico.

En nuestro trabajo observamos mediante el modelo de regresión logístico que existen 7 veces más chances de encontrar los virus indicadores de contaminación fecal humana cuando la temperatura es inferior a los 20 °C. Este resultado se puede deber a diversas hipótesis: el clima frío hace que las personas permanezcan en áreas cerradas con mayor frecuencia en los meses de invierno aumentando así las chances de infección y excreción (Özdemir et al., 2010). Además, las bajas temperaturas permiten que las partículas virales permanezcan infectivas por períodos prolongados de tiempo (Atchison et al., 2010; Chen et al., 2013). Otra hipótesis relacionada con el hecho de que las personas están expuestas a infecciones respiratorias y gastrointestinales virales con mayor frecuencia en los meses de invierno es el cambio en la inmunidad general (Chen et al., 2013). La luz ultravioleta permite la síntesis de vitamina D en la piel, que tiene efectos inmunomoduladores e inmunoestimulantes. Como las personas no están lo suficientemente expuestas a la luz ultravioleta en los meses de invierno, la insuficiencia de vitamina D puede surgir, lo que lleva a una tendencia a desarrollar ciertas infecciones causadas por virus que están presentes en el ambiente (Hervás et al., 2014).

La detección de la contaminación fecal en aguas recreacionales es de importancia crítica para los agentes que controlan la calidad de las mismas debido a los riesgos planteados para la salud pública. Para identificar tales

riesgos, los marcadores de rastreo de la fuente microbiana (*MST*) asociada a las aguas residuales humanas son una herramienta de gran utilidad. En la actualidad, sin embargo, una mayor comprensión de la idoneidad de estos marcadores es necesaria para la detección de la contaminación fecal en aguas ambientales para predecir el riesgo de infección. Identificar los marcadores de *MST* que se correlacionan con patógenos transmitidos por el agua y organismos indicadores, puede mejorar la capacidad predictiva para indicar contaminación fecal y la presencia de otros patógenos en una fuente de agua. De esta forma, se pueden tomar medidas a tiempo que eviten su transmisión a la población que está expuesta a esas fuentes de contaminación (Harwood et al., 2014; Liang et al., 2015).

El presente trabajo es innovador en Uruguay ya que utilizó indicadores virales de contaminación fecal especie-específicos como forma de complementar la calidad microbiológica de las aguas evaluadas por la determinación de coliformes fecales. Es importante tener conocimiento acerca de cuáles son las fuentes (especies) generadoras de la contaminación fecal para poder tomar medidas para evitar dicha contaminación por estas especies en estos y otros ríos. Es de vital importancia contar con plantas de tratamiento de aguas residuales en las ciudades para así disminuir la diseminación viral en los ríos que generan un riesgo de infección para la población. Vale resaltar que un estudio realizado en nuestro país comprobó que las plantas de tratamiento de aguas residuales reducen la frecuencia y sobre todo la carga viral en los efluentes de esas plantas (Lizasoain et al., 2018). Cabe destacar que Salto es la segunda ciudad más poblada del Uruguay luego de Montevideo (INE, 2011), y que en ésta no existe una planta de tratamiento de aguas residuales, por lo que actualmente éstas se vuelcan sin tratar al Río Uruguay (OSE, 2018). También es importante conocer la circulación de estos virus entéricos y en qué época del año lo hacen con mayor frecuencia debido a que en épocas de verano estas cuencas son muy utilizadas por las poblaciones que están sobre ellas para la recreación. El uso de estas aguas con fines recreativos presenta un riesgo para la salud humana que depende de las estirpes de los virus circulantes, las características del agua y el sistema inmune de los individuos que utilizan estas aguas (Fong & Lipp 2005, Espinosa et al., 2008). Estudios epidemiológicos han demostrado una relación entre los efectos adversos en la

salud y los baños de inmersión en aguas de recreación de baja calidad aunque es difícil establecer una asociación concreta de contraer una infección debido al contacto con estas aguas (Pond, 2005).

El presente trabajo permitió identificar tanto espacial como temporalmente a los virus indicadores de contaminación fecal especie-específicos revelando una considerable contaminación fecal principalmente por las especies humanas y bovinas en ambas cuencas. Estos resultados sugieren que existen carencias (o directamente ausencias) en el tratamiento de las aguas residuales urbanas, de tambos y *feedlots*, así como también podría existir una escorrentía de las materias fecales provenientes de la ganadería extensiva, localizados en ambas cuencas de estos ríos tan importantes para el desarrollo del país.

En conclusión, a nuestro entender, este es el primer trabajo sobre MST en Uruguay. La cuenca del Río Santa Lucía es la principal cuenca lechera de nuestro país y es la fuente de agua potable para aproximadamente la mitad de la población uruguaya (MGAP, DIEIA, 2017; OSE, 2018). Por otro lado, el Río Uruguay es uno de los más importantes de la región porque atraviesa tres países y sirve de suministro de agua para muchas poblaciones que viven en su ribera (C.A.R.U., 2018). En el presente estudio se describió la presencia de virus humanos y animales en el agua superficial de ambos ríos que se utilizan para actividades recreativas, riego y consumo de la población. De acuerdo con nuestros resultados, es muy importante incluir a los virus indicadores de contaminación fecal especie-específicos al estudio de los indicadores bacterianos para complementar la vigilancia de la calidad microbiológica del agua con la finalidad de reducir la posible exposición de la población a los patógenos de transmisión hídrica.

7. PERSPECTIVAS

- Analizar los indicadores virales de contaminación fecal de origen ovino.
- Evaluar el riesgo microbiológico para la salud humana mediante el *QMRA* por el uso de estas aguas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L., Girones, R., 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 43 (7), 2011-2019.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb; 39(2):498-505.
- Allison, A.C., Black, P.H., 1967. Lysosomal changes in lytic and nonlytic infections with the simian vacuolating virus (SV40). *J. Natl. Cancer Inst.* 39 (775–780) 782–777.
- Amdiouni, H., Faouzi, A., Fariat, N., Hassar, M., Soukri, A. and Nourlil, J. (2012). Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett Appl Microbiol.* 54, pp. 359–66.
- Ampuero, J.S, Ocana, V., Gomez, J., Gamero, M.E, Garcia, J., Halsey, E.S et al. (2012). Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *PLoS One.* 7, pp. e46898.
- Ansari, SA, Springthorpe, VS and Sattar, SA (1991). Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Review of infectious diseases.* 13, pp. 448 – 461.
- APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Ariga T, Shimada Y, Ohgami K, Tagawa Y, Ishiko H, Aoki K, Ohno S. New genome type of adenovirus serotype 4 caused nosocomial infections associated with epidemic conjunctivitis in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug; 42(8):3644-8.
- Asano T, Cotruvo JA. Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations. *Water Res.* 2004 Apr 38(8):1941-51
- Assis, A. S. F., Cruz, L. T., Ferreira, A. S., Bessa, M. E., de Oliveira Pinto, M. A., Vieira, C. B., & e Silva, M. L. D. R. (2015). Relationship between viral detection and turbidity in a watershed contaminated with group A rotavirus. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6886-6897.
- Atchison CJ, Tam CC, Hajat S, Van Pelt W, Cowden JM, Lopman BA. Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands. *Proc R SocB.* 2010; 277: 933-42.)
- Aw TG, Howe A, Rose JB. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *J Virol Meth*, 2014, 210C, p.15-21.
- Bányai, K., La'aszlo', B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A., Gentsch, J. R., et al. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the prerotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, 30(1), A122–A130.
- Barrero, P.R, Valinotto, L.E, Tittarelli, E. and Mistchenko, A.S (2012). Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in

- Buenos Aires, Argentina (1999-2010). *J Clin Virol.* 53, Netherlands, 2011 Elsevier B.Vpp. 145–50.
- Barril PA, Fumian TM, Prez VE, et al. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res*, 2015, 138:409-15.
 - Berk (2013) *Adenoviridae* en *Fields Virology* ed. Knipe, D.M., Howley, P.M. et al., pp.1704-1731. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
 - Bernhard AE, Field KG. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Oct; 66(10):4571-4
 - Bofill-Mas, S, Albiñana-Gimenez, N, Clemente-Casares, P, Hundesa, A, Rodriguez-Manzano, J, Allard, A et al. (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology.* 72, pp. 7894–7896
 - Bofill-Mas, S., Formiga-Cruz, M., Clemente-Casares, P., Calafell, F., Girones, R., 2001. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J. Virol.* 75 (21), 10290e10299.
 - Bofill-Mas S, Pina S & 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., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalá, A., Hundesa, A., Girones, R., 2013. Quantification of human and animal viruses to differentiate between human and nonhuman fecal contamination present in environmental samples. *Biomed. Res. Int.* 2013 (192089), 1-11.
 - Boletín pluviométrico, Inumet 2017 recuperado de <https://www.inumet.gub.uy/clima/recursos-hidricos/boletin-pluviometrico>
 - Bonkougou IJ, Haukka K, Österblad M, et al. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Pediatr.* 2013; Mar 19:13:36.
 - Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(2):1172-80.
 - Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R.M. (2008) New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), p.295-301. Review.
 - Bosch, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*, 1998, 1(3), p.191-196. Review.
 - Braeye, T, DE Schrijver, K, Wollants, E, Van Ranst, M and Verhaegen, J (2015). A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. *Epidemiology and infection.* 143, pp. 711–719.
 - Brinkman NE, Haffler TD, Cashdollar JL, Rhodes ER. Evaluation of methods using celite to concentrate norovirus, adenovirus and enterovirus from wastewater. *J Virol Methods.* 2013 Oct; 193(1):140-6.
 - Cann, K. F., Thomas, D. R., Salmon, R. L., Wyn-Jones, A. P., & Kay, D. (2013). Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiology & Infection*, 141(4), 671-686.

- Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., ... & Pipas, J. M. (2011). Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio*, 2(5), e00180-11.
- Cardini J, García MC, Zabalett A, Mársico D, Oliver N. Estudio y Modelación de la Calidad del Agua del Río Uruguay Efectos de descargas Cloacales e Industriales en el entorno de las ciudades de Concepción del Uruguay y Gualeguaychú. 2001.
- C.A.R.U. Comisión Administradora del Río Uruguay. (2013). El Río Uruguay en cifras. <http://www.caru.org.uy/web/acerca-de/prueba-pagina>. Visitado el 15 de Enero de 2018.
- Carratalá, A., Rusiñol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodríguez- Manzano, J., Vantarakis, A., et al. (2012). A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. *Applied and Environment Microbiology*, 78(20), 7496–7499.
- Carratala, A., Rusinol, M., Rodriguez-Manzano, J., Guerrero-Latorre, L., Sommer, R., & Girones, R. (2013). Environmental effectors on the inactivation of human adenoviruses in water. *Food and environmental virology*, 5(4), 203-214.
- Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 2009; 113 (20): 4834-40.
- Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(6):1354-80.
- Cashdollar JL, Wymer L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J Appl Microbiol*. 2013 Jul; 115(1):1-11.
- Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, Leung WK. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(8):1278-80.
- Chen, Y., Liang, W., Yang, S., Wu, N., Gao, H., Sheng, J., ... & Li, Y. (2013). Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *The Lancet*, 381(9881), 1916-1925.
- Clayson, E.T., Brando, L.V., Compans, R.W., 1989. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J. Virol*. 63, 2278–2288.
- Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, et al. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*, 1990, 68(2):171-7.
- Cromeans TL, Lu X, Erdman DD, Humphrey CD, Hill VR. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *J Virol Methods*. 2008 Jul; 151(1):140-5.
- d'Arminio Monforte A, Cinque P, Mocroft A, Goebel FD, Antunes F, Katlama C, et al. Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort. *Ann Neurol* 2004; 55 (3): 320-8.
- Edgard RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1795.

- Elmahdy, E. M., Fongaro, G., Schissi, C. D., Petrucio, M. M., & Barardi, C. R. M. (2016). Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. *Journal of water and health*, 14(1), 142-154.
- EPA. Method 1103.1: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (mTEC). 2002
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 2012, 9(8): 772.
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 1820-1822.
- Delbene L. Calidad de agua en la cuenca del Río Santa Lucía (Uruguay) utilizando peces como indicadores: relación con el uso del suelo. Tesina de grado – Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UdelaR. 2010.
- Dey, R.S, Ghosh, S., Chawla-Sarkar, M., Panchalingam, S., Nataro, J.P, Sur, D. et al. (2011). Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*. 49, pp. 500–5.
- Divizia, M, Gabrieli, R and Donia, D (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania
- Dong, Y, Kim, J and Lewis, GD (2010). Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *Journal of Applied Microbiology*. 108, pp. 800-809.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009; 199 (6): 837-46.
- Espinosa, AC, Mazari-Hiriart, M, Espinosa, R, Maruri-Avidal, L, Méndez, E and Arias, CF (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water research*. 42, pp. 2618–2628.
- Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. *Fields Virology*. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2013.
- Evans, G.L., Caller, L.G., Foster, V., Crump, C.M., 2015. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biol*. 5, pii: 150041.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319 (5866): 1096-100.
- Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res*. 2007 Aug; 41(16):3517-38.
- Filho, E.P, Faria, N.R da Cost, Fialho, A.M, de Assis, R.S, Almeida, M.M, Rocha, M. et al. (2007). Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol*. 56, Englandpp. 313–9.
- Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, et al. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis*, 2002, 186(5):593-7.
- Fong TT, Griffin DW, Lipp EK. 2005. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl Environ Microbiol* 71: 2070–2078.

- Fong TT, Mansfield LS, Wilson DL, Schwab DJ, Molloy SL, Rose JB. Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(6):856-64.
- Fongaro G, Nascimento MA, Rigotto C, Ritterbusch G, da Silva AD, Esteves PA, Barardi CR. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology*. 2013 May 28; 10:166.
- Francy DS, Stelzer EA, Bushon RN, Brady AM, Williston AG, Riddell KR, Borchardt MA, Spencer SK, Gellner TM. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. *Water Res.* 2012 Sep 1;46(13):4164-78.
- Fumian, TM, Leite, JP, Castello, AA, Gaggero, A, Caillou, MS and Miagostovich, MP (2010). Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration.. *Journal of virological methods.* 170, pp. 42–6.
- Fumian, TM, Leite, JPP, Rose, TL, Prado, T and Miagostovich, MP (2011). One year environmental surveillance of rotavirus species A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water research.* 45, pp. 5755–5763
- Galan A, Rauch CA, Otis CN. Fatal BK polyoma viral pneumonia associated with immunosuppression. *Hum Pathol* 2005; 36 (9): 1031-4.
- Gallay, A, De Valk, H, Cournot, M, Ladeuil, B, Hemery, C, Castor, C et al. (2006). A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 12, pp. 561–570.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1365-1373.
- GELDREICH, CLARK, HUFF, a. BERG: - *J. Am. Water Works Assoc.*, 57; 208 (1965).
- Gerald LM, John EB. Raphael Dolin Philadelphia: *Adenoviruses. Principles and Practice of Infectious Diseases* 5th edn. Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 1835–1841.
- Gerba CP. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol.* 1984; 30:133-68.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov; 51(5):1417-23.
- Girones, R., Ferrus, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Correia, A., & Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water research*, 44(15), 4325-4339.
- Gordon DM. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology.* 2001; 147(Pt 5):1079-85.

- Gourmelon M, Caprais MP, Ségura R, Le Mennec C, Lozach S, Piriou JY, Rincé A. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Aug; 73(15):4857-66.
- Guindon S and Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 2003, 52: 696-704.
- Gray GC. Adenovirus vaccines; in Plotkin SA, Orenstein W, Offit PA (eds): *Vaccines*, 6th edn. Pennsylvania: Saunders Elsevier, 2011; 113–126
- Guo, L., Gonzalez, R., Zhou, H., Wu, C., Vernet, G., Wang, Z. et al. (2012). Detection of three human adenovirus species in adults with acute respiratory infection in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31, pp. 1051–8.
- Hagedorn C, Robinson SL, Filtz JR, Grubbs SM, Angier TA, Reneau RB Jr. Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Dec; 65(12):5522-31.
- Hamza H, Hamza IA. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt. *Sci Total Environ.* 2018 Jan 1; 610-611:1413-1420.
- Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, Wilhelm M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 2009 Jun; 43(10):2657-68.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(5):2403-11.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol.* 2007 Dec; 103(6):2153-9.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., Oguma, K., Kishida, N. et al. (2010). Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of J. *Water Res.* 44, England United States, 2009 Elsevier Ltdpp. 1747–52
- Harwood, V.J., Brownell, M., Wang, S., Lepo, J., Ellender, R.D., Ajidahun, A., Hellein, K.N., Kennedy, E., Ye, X., Flood, C., 2009. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Res.* 43 (19), 4812-4819.
- Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jun; 71(6):3163-70.
- Harwood VJ & Stoeckel DM (2011) Performance criteria. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*, (Hagedorn C, Blanch AR & Harwood VJ, eds), pp.7–30. Springer, New York, NY
- Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2000 Jul; 61(3):289-97.

- He, JWen and Jiang, S (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, pp. 2250–2255.
- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9):4523-33.
- Hervás D, Hervás-Masip J, Rosell A, Mena A, Pérez JL, Hervás JA. Are hospitalizations for rotavirus gastroenteritis associated with meteorologic factors? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 1547-53).
- Herzog, P., Drosten, C., & Müller, M. A. (2008). Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Virology journal*, 5(1), 138.
- Hewitt, J., Greening, G.E., Leonard, M. and Lewis, G.D. (2013) Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Res* 47, 6750–6761.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- <http://www.msp.gub.uy/noticia/vacunas>.
- <https://www.saltogrande.org/generacion.php>. Visado el 8 de febrero 2018.
- Hughes, B., Beale, D.J., Dennis, P.G., Cook, S., Ahmed, A., 2017. Cross-comparison of human wastewater-associated molecular markers in relation to fecal indicator bacteria and enteric viruses in recreational beach waters. *Appl Environ Microbiol*. 8 (83), 1–16.
- Hundesda, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodriguez- Manzano, J., Bach, A., Casas, M., & Girones, R. (2010). Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 385–389.
- Hundesda, A., de Motes, C.M., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., Girones, R.R., 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Methods* 158, 130–135.
- Hundesda A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Dec; 72(12):7886-93.
- ICTV, 2017. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy>. Página oficial del Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
- Ikner LA, Gerba CP, Bright KR. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ Virol*. 2012 Jun; 4(2):41-67.
- Informe 2013. Informe sobre la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía: estado de situación y recomendaciones.
- Isa P, Realpe M, Romero P, et al. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*, 2004, 322(2):370-81.
- Ishibashi, M., Yasue, H., 1984. Adenoviruses of animals. In: Ginsberg, H.S. (Ed.), *The Adenoviruses*. Plenum Press, New York, pp. 497–562.

- Ishiko, H., Shimada, Y., Konno, T., Hayashi, A., Ohguchi, T., Tagawa, Y. et al. (2008). Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol.* 46, pp. 2002–8.
- Iturriza-Gomara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., & Lappalainen, M. (2009). Rotavirus surveillance in Europe, 2005–2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *The Journal of infectious diseases*, 200(Supplement_1), S215-S221.
- Jiang SC. 2006. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol* 40:7132–7140.
- Jiménez-Clavero, M.A., Fernández, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N., Ley, V., 2003. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6311–6315.
- Jones TH, Muehlhauser V. F-coliphages, porcine adenovirus and porcine teschovirus as potential indicator viruses of fecal contamination for pork carcass processing. *Int J Food Microbiol.* 2017 Jan 16; 241:237-243.
- Jourdan N, Maurice M, Delautier D, et al. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol*, 1997, 71(11):8268-78.
- Kajon, A.E, Lu, X., Erdman, D.D, Louie, J., Schnurr, D., George, K.S et al. (2010). Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *J Infect Dis.* 202, pp. 93–103.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(3):1033-9.
- Katayama H. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* 2008; 42: 1441–1448
- Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Tominaga T, Ishikawa A, Zheng HY, et al. Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol* 2004; 10 (4): 244-9.
- Keegan H, Mc Inerney J, Pilkington L, Grønn P, Silva I, Karlsen F, Bolger N, Logan C, Furuberg L, O'Leary J, Martin C. Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens. *J Virol Methods.* 2009 Jan; 155(1):61-6
- Khatib LA, Tsai YL, Olson BH. A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003 Dec; 63(2):231-8.
- Kim HK, Yoon SW, Kim DJ, Koo BS, Noh JY, Kim JH, Choi YG, Na W, Chang KT, Song D, Jeong DG. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Like, Middle East Respiratory Syndrome-Like Bat Coronaviruses and Group H Rotavirus in Faeces of Korean Bats. *Transbound Emerg Dis.* 2016 Aug; 63(4):365-72.
- Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes--identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ.* 2014 Aug 1; 488-489:290-6.

- Kiulia, NM, Hofstra, N, Vermeulen, LC, Obara, MA, Medema, G and Rose, JB (2015). Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters. *Pathogens*. 4, pp. 229–255.
- Kokkinos, P.A., Ziros, P.G., Mpalasopoulou, A., Galanis, A., Vantarakis, A., 2011. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virology*. 27 (8)195.
- Koralnik, I.J., Boden, D., Mai, V.X., Lord, C.I., Letvin, N.L., 1999. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52 (2), 253e260.
- Koroglu, M, Yakupogullari, Y, Otlu, B, Ozturk, S, Ozden, M, Ozer, A et al. (2011). A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *The new microbiologica*. 34, pp. 17–24.
- Kuo DHW, Simmons FJ, Blair S, Hart E, Rose JB, Xagorarakis I. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Res* 2010; 44:1520–30.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M. and Muscillo, M. (2010). Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann Ist Super Sanita*. 46, pp. 266-73.
- Lawton, J. A., Estes, M. K., & Prasad, B. V. (1997). Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural and Molecular Biology*, 4(2), 118.
- Lee YS, Kim KS, Chung YS, Cheon DS, Jung SK, Park KS, Na BK, Jee YM, Kim DS, Yoon JD, Song CY, Lee KH. PCR-RFLP based molecular typing of enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Korea. *Arch Virol*. 2002 Sep; 147(9):1711-20.
- Lee, R., Lessler, J., Lee, R., Rudolph, K., Reich, N., Perl, T., Cummings, D. (2013) Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, (13), p.446.
- Levy, K, Hubbard, AE and Eisenberg, JN (2009). Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*. 38, pp. 1487–1496
- Lin, K.H, Lin, Y.C, Chen, H.L, Ke, G.M, Chiang, C.J, Hwang, K.P et al. (2004). A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol*. 73, pp. 274–9.
- Linden KG, Thurston J, Schaefer R, Malley JP Jr. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Dec; 73(23):7571-4.
- Lizasoain A, Burlandy FM, Victoria M, Tort LFL, da Silva EE, Colina R. An Environmental Surveillance in Uruguay Reveals the Presence of Highly Divergent Types of Human Enterovirus Species C and a High Frequency of Species A and B Types. *Food Environ Virol*. 2018 Jun 16
- Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R, Victoria M. Environmental assessment reveals the presence of MLB1 human astrovirus in Uruguay. *J Appl Microbiol*. 2015 Sep;119 (3):859-67
- Lopes da Silva R. Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *Braz J Infect Dis* 2011; 15 (3): 276-84.

- Lopez S, Arias CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 309:39-66.
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Mar; 70(3):1448-54.
- Martinelli, D, Prato, R, Chironna, M, Sallustio, A, Caputi, G, Conversano, M et al. (2007). Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May-October 2006. *Euro Surveill*. 12.
- Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijssens J, Nelson M, Ciarlet M. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul; 20(7):1195-8.
- Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011 Aug; 156(8):1397-413.
- Matthijssens J, Otto PH, Ciarlet M, et al. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, 2012, 157(6), p.1177-1182.
- McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol*, 2011, 19(3):136-44.
- McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR, Lukasik JO. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Dec; 72(12):7567-74.
- McQuaig, SM, Scott, TM, Lukasik, JO, Paul, JH and Harwood, VJ (2009). Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 75, pp. 3379–3388.
- Mellou, K, Katsioulis, A, Potamiti-Komi, M, Pournaras, S, Kyritsi, M, Katsiaflaka, A et al. (2014). A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiology and infection*. 142, pp. 40–50.
- Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49:461-87.
- Miagostovich, M, Ferreira, F, Guimarães, F, Fumian, T, Diniz-Mendes, L, Luz, S et al. (2008). Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. 74
- Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, Jakab F, Martella V, Bányai K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 2015 Apr; 21(4):660-3.
- <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estad%C3%ADstico-de-diea-2017>

- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., & Lauber, C. (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 18-38.
- Moens, U, Van Ghelue, M, Song, X and Ehlers, B (2013). Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Reviews in Medical Virology*. 23, pp. 250–264.
- Molinari BL, Lorenzetti E, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jun; 20(6):1019-22.
- Moore DM, Hogg RS, Yip B, Wood E, Tyndall M, Braitstein P, Montaner JS. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Nov 1; 40(3):288-93
- Morsy El-Senousy W, Guix S, Abid I, Pintó RM, Bosch A. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Jan; 73(1):164-7
- Moyo, S.J, Hanevik, K., Blomberg, B., Kommedal, O., Nordbo, S.A, Maselle, S. et al. (2014). Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 14, pp. 666.
- Musalem C, Espejo RT. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol*, 1985, 66 (Pt 12):2715-24.
- Norkin, L.C., Ouellette, J., 1976. Cell killing by simian virus 40: variation in the pattern of lysosomal enzyme release, cellular enzyme release, and cell death during productive infection of normal and simian virus 40-transformed simian cell lines. *J. Virol*. 18, 48–57.
- Nwachuku N, Gerba CP, Oswald A, Mashadi FD. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Sep; 71(9):5633-6.
- Ogorzaly L, Cauchie HM, Penny C, Perrin A, Gantzer C, Bertrand I. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 May; 97(9):4159-66.
- Ogorzaly, L., Walczak, C., Galloux, M., Etienne, S., Gassilloud, B., Cauchie, H.M., 2015. Human adenovirus diversity in water samples using a next-generation amplicon sequencing approach. *Food Environ. Virol*. 7 (2), 112–121.
- Özdemir S, Delialioğlu N, Emekdaş G. Investigation of rotavirüs, adenovirüs and astrovirus frequencies in children with acute gastroenteritis and evaluation of epidemiological features. *Mikrobiyol Bul*. 2010; 44: 571-8.
- Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM Jr. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods*. 2006 Jul; 135(1):32-42.
- Parveen S, Murphree RL, Edmiston L, Kaspar CW, Portier KM, Tamplin ML. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Jul; 63(7):2607-12
- Patel, MM, Steele, D, Gentsch, JR, Wecker, J, Glass, RI and Parashar, UD (2011). Real-world impact of rotavirus vaccination. *The Pediatric infectious disease journal*. 30, pp. S1–S5.

- Payment, P., & Locas, A. (2011). Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Groundwater*, 49(1), 4-11.
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). Application of Predictive Models in Quantitative Risk Assessment and Risk Management. In *Predictive Microbiology in Foods* (pp. 87-97). Springer, New York, NY.
- Pietropaolo V, Fioriti D, Simeone P, Videtta M, Di Taranto C, Arancio A, et al. Detection and sequence analysis of human polyomaviruses DNA from autoptic samples of HIV-1 positive and negative subjects. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16 (3): 269-76.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9), 3376-3382.
- Poma HR, Gutiérrez Cacciabue D, Garcé B, Gonzo EE, Rajal VB. Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Sci Total Environ.* 2012 Sep 1; 433:98-109.
- Prado, T., Silva, D.M, Guilayn, W.C, Rose, T.L, Gaspar, A.M and Miagostovich, M.P (2011). Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 45, England, A 2010 Elsevier Ltdpp. 1287–97.
- Pusch, D, Oh, DY, Wolf, S, Dumke, R, Schröter-Bobsin, U, Höhne, M et al. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology.* 150, pp. 929–947
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H. and Macdonald, J. (2016) Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res* **96**, 308–326
- RCWG, 2018. Sitio web del: Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Newly assigned genotypes, List of accepted genotypes (Updated: June-30-2017). <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
- Reynolds, K. A. (2004). Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. In *Public Health Microbiology* (pp. 69-78). Humana Press.
- Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE, et al. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2000; 119 (5): 1228-35.
- Rigotto, C., Sincero, T. C. M., Simoes, C. M. O., & Barardi, C. R. M. (2005). Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water research*, 39(2-3), 297-304.
- Rodríguez-Díaz, J, Querales, L, Caraballo, L, Vizzi, E, Liprandi, F, Takiff, H et al. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Applied and environmental microbiology.* 75, pp. 387-394.
- Rodríguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrús MA, Moreno Y, Amorós I, Calgua B, Hundesa A, Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rusiñol M, Girones R. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.*2012; 66(12):2517-23.
- Roslev P, Bukh AS. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Mar; 89 (5):1341-55.

- Rusiñol, M., Carratalá, A., Hundesa, A., Bach, A., Kern, A., Vantarakis, A., et al. (2013). Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. *Science of the Total Environment*, 458–460, 355–360.
- Rutjes, SA, Lodder, WJ, van Leeuwen, AD and Husman, AM.de Roda (2009). Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production.. *Journal of applied microbiology*. 107, pp. 97–105.
- Salvo M, Lizasoain A, Castells M, Bortagaray V, Castro S, Colina R, Tort FL, Victoria M. Human Bocavirus: Detection, Quantification and Molecular Characterization in Sewage and Surface Waters in Uruguay. *Food Environ Virol*. 2018 Jun;10 (2):193-200.
- Sattar SA. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect*, 2004, 56 Suppl 2:S64-9.
- Schlindwein, AD, Rigotto, C, Simões, CM and Barardi, CR (2010). Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science & Technology*. 61, pp. 537–544.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012 Nov; 113(5):1014-26.
- Scott TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ Sci Technol*. 2005 Jan 1; 39(1):283-7.
- Simmons FJ, Xagorarakis I. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res*. 2011 Jun; 45(12):3590-8.
- Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol*, 2009, 1; 107(6):1769-80.
- Sire JM, Garin B, Chartier L, et al. Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal. *PaediatrInt Child Health*. 2013; 33: 139-44.
- Soller, J.A., Schoen,M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J. E.&Ashbolt, N. J. 2010 Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human
- Stoeckel DM, Harwood VJ. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Apr; 73(8):2405-15
- Tabain, I., Ljubin-Sternak, S., Cepin-Bogovic, J., Markovinovic, L., Knezovic, I. and Mlinaric-Galinovic, G. (2012). Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *Pediatr Infect Dis J*. 31, pp. 680–4.
- Taguchi F, Kajioka J & Miyamura T (1982) Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiol Immunol* 26: 1057–1064
- Tebruegge M, Curtis N. Adenovirus: an overview for pediatric infectious disease specialists. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31: 626-7.
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jan; 69(1):577-82.
- Tort LF, Victoria M, Lizasoain A A, Castells M, Maya L, Gómez MM, Arreseigor E, López P, Cristina J, Leite JP, Colina R. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012:

- first detection of the emerging genotype G12. *J Med Virol.* 2015 May; 87(5):754-63.
- Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 23; 10(3):165-77.
 - UPM. Resultados Análisis Biológico. <http://www.upm.com/uy/planta/medio-ambiente/monitoreo-ambiental/rio-uruguay/Pages/default.aspx>. Accesado en 05 noviembre 2013.
 - Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(3):413-44.
 - Victoria, M, Guimarães, FR, Fumian, TM, Ferreira, FF, Vieira, CB, Shubo, T et al. (2010). One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water Health.* 8, pp. 158–165.
 - Vieira, CB, A Corrêa, deAbreu, de Jesus, MS, Luz, SL, Wyn-Jones, P, Kay, D et al. (2016). Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. *Food and environmental virology.* 8, pp. 57–69.
 - Vieira, CB, Mendes, AC, Guimarães, FR, Fumian, TM, Leite, JP, Gaspar, AM et al. (2012). Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107, pp. 778–784.
 - Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Guimarães FR, Ferreira FF, Shubo TC, Miagostovich MP, Lampe E, Gaspar AM: Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro Brazil. *Lett Appl Microbiol* 2007, 45:168–173.
 - Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Taniguchi K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis.* 2011 Aug; 17(8):1491-3.
 - Wetz JJ, Lipp EK, Griffin DW, Lukasik J, Wait D, Sobsey MD, Scott TM, Rose JB. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Mar Pollut Bull.* 2004 Apr; 48(7-8):698-704.
 - Wiggins BA. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Nov; 62 (11):3997-4002
 - Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int.* 2012; 45:151-64.
 - Wong, M.V, Hashsham, S.A, Gulari, E., Rouillard, J.M, Aw, T.G and Rose, J.B (2013). Detection and characterization of human pathogenic viruses circulating in community wastewater using multi target microarrays and polymerase chain reaction. *J Water Health.* 11, pp. 659–70.
 - Wong, M, Kumar, L, Jenkins, TM, Xagorarakis, I, Phanikumar, MS and Rose, JB (2009). Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. *Water research.* 43, pp. 1137–1149.
 - Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A. et al. (2011) Surveillance of

- adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res* 45, 1025–1038.
- Xagorarakis I, Kuo DH, Wong K, Wong M, Rose JB. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(24):7874-81.
 - Yinda CK, Ghogomu SM, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, Maes P, Van Ranst M, Matthijssens J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 2018 Mar 30; 4(1):vey008.
 - Yliharsila, M., Harju, E., Arppe, R., Hattara, L., Holsa, J., Saviranta, P. et al. (2013). Genotyping of clinically relevant human adenoviruses by array-in-well hybridization assay. *Clin Microbiol Infect.* 19, pp. 551–7.
 - Yogo, Y, Kitamura, T, Sugimoto, C, Ueki, T, Aso, Y, Hara, K et al. (1990). Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *Journal of virology.* 64, pp. 3139–3143.
 - Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 2008, 153(2), p.238-2340.