



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Detección, cuantificación y caracterización molecular de *Bocavirus humano* en matrices acuáticas del Uruguay

Marcos Matías Salvo Rodríguez

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA),

CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República

Salto, Uruguay

Julio 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Detección, cuantificación y caracterización molecular de *Bocavirus humano* en matrices acuáticas del Uruguay

Marcos Matías Salvo Rodríguez

Tesis de Maestría presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Área Biología, de la Universidad de la República; como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas, sub área Microbiología.

Director: Dr. Matías Victoria Montero

Co-Director: Dr. Fernando López Tort

Salto, Uruguay

Julio 2019

Tribunal:

Dra. Mabel Berois

Dr. Santiago Mirazo

Dra. Yanina Panzera

Agradecimientos

A la familia, por estar siempre presente, acompañándome en el camino de seguir formándome académicamente.

A Sofía, especialmente por sus consejos, paciencia y gran compañía desde hace ya varios años.

A mi tutor Matías Victoria, y mi co-tutor Fernando López Tort, por su guía y constante instrucción en el desarrollo del trabajo; por brindarme la libertad para trabajar, lo cual me demostró su confianza en mí; así como también por estar siempre presentes para resolver los inconvenientes que se presentaron.

A Rodney Colina, por permitirme ser parte del gran grupo que ha formado, y por estar presente para aconsejarme a lo largo del desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros de laboratorio; por sus consejos siempre útiles, así como su ayuda en el desarrollo de algunos experimentos. Especialmente Mati C., Majo y Andi, por su compañía en el Partenón, en los almuerzos y los cafés después del almuerzo, así como alguna que otra charla alentadora.

A Daiana Mir y Sebastián Castro, por su ayuda para llevar a cabo varios análisis, brindándose desinteresadamente.

A Soledad Andrade del Laboratorio de Gestión Ambiental de Salto Grande, por permitirme desarrollar una pasantía que colaboró para el desarrollo de esta tesis.

A todos y cada uno de ellos por enseñarme no solo desde lo técnico, sino también desde lo humano, lo cual creo es tanto o más importante.

Finalmente a PEDECIBA, por permitirme desarrollar esta tesis bajo su programa y a ANII por brindarme una beca para su desarrollo.

Resumen

Las infecciones causadas por Bocavirus humano (HBoV) se han asociado al descubrimiento con enfermedades respiratorias y gastrointestinales.

El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de HBoV en residuales, superficiales y subterráneas en Uruguay; determinar las características de su evolución tales como la tasa de evolución, la dispersión y la dinámica poblacional del virus así como también conocer su dinámica de inactivación frente al agente desinfectante cloro.

Se estudiaron 68 muestras de aguas residuales de las ciudades de Salto, Paysandú, Bella Unión, Fray Bentos, Treinta y Tres y Melo; 36 muestras de aguas superficiales de las ciudades de Salto, Florida y Santa Lucía; y 108 muestras de aguas subterráneas de la región suburbana de la ciudad de Salto. Se determinó la presencia de HBoV mediante multiplex qPCR para la detección de los cuatro subtipos, seguido de monoplex qPCRs para la cuantificación independiente de cada subtipo. Se realizaron PCRs cualitativas y posteriores secuenciaciones de los respectivos amplicones para caracterizar molecularmente las secuencias virales y determinar sus características evolutivas.

HBoV fue detectado en una alta frecuencia (69%) en aguas residuales, por su parte, en aguas superficiales solo se encontró una muestra positiva (3%) y en aguas subterráneas no fue detectado. Respecto a las muestras de aguas residuales, se detectó HBoV1 en 11 (23%) de las 47 muestras positivas, con una concentración media de $8,2 \times 10^4$ copias genómicas/Litro (cg/L); HBoV3 se detectó en 35 (74%) de las 47 muestras positivas, con una concentración media de $4,1 \times 10^6$ cg/L y los subtipos 2 y/o 4 en 39 (83%) de las muestras positivas con una concentración media de $7,8 \times 10^6$ cg/L.

A partir del análisis filogenético de las secuencias obtenidas, se confirmó la presencia de los cuatro subtipos de HBoV. Siete muestras de aguas residuales que resultaron positivas para HBoV se describieron como posibles cepas recombinantes, tres de las cuales fueron caracterizadas y confirmadas como cepas recombinantes. Este evento de recombinación se localizó en el extremo 5' del gen VP1 y las cepas parentales pertenecían a los subtipos 3 y 4. Las tres estirpes presentaron un 100% de identidad nucleotídica en la región genómica analizada. Este hecho, sugiere una dispersión exitosa de esta cepa recombinante en el país.

Tanto la tasa de evolución viral como la dinámica poblacional del virus no pudieron ser determinados, seguramente debido a que se trabajó con una secuencia nucleotídica demasiado pequeña.

Por otra parte, los estudios de coalescencia permitieron describir la entrada de diferentes cepas virales al país, en distintos momentos. Algunas de estas cepas incluso lograron dispersarse en la población uruguaya. En lo que respecta a la evaluación de inactivación viral por cloro, la baja concentración de partículas virales íntegras de HBoV en las muestras positivas determinó que dicho estudio no pudiera realizarse.

Este es el primer trabajo que determina la presencia en una alta frecuencia de los cuatro subtipos de HBoV en matrices acuáticas del Uruguay, principalmente en aguas residuales. A su vez, y hasta donde se conoce, es el primer estudio que describe la presencia de cepas recombinantes en el continente americano.

Aunque la detección de HBoV en aguas superficiales fue baja, es probable que se produzca una transmisión del virus a través del agua si las personas entran en contacto con aguas superficiales contaminadas con aguas residuales tanto para recreación o consumo; ya que se detectó una elevada frecuencia y concentración

de HBoV en aguas residuales sin tratar, que generalmente se descargan directamente en aguas superficiales.

Palabras clave:

Bocavirus Humano, Aguas residuales, Aguas superficiales, Aguas subterráneas, qPCR, Recombinantes, Dispersión viral.

Abstract

Human bocavirus (HBoV) infections are related to respiratory and gastroenteric diseases. The aim of this study was to investigate the presence of HBoV in sewage, surface and underground waters in Uruguay, to perform evolution studies in order to evaluate the evolution rate, dispersion, and population dynamics of the virus, as well as to study the inactivation dynamics of the virus by a disinfectant agent.

Sixty-eight sewage samples from the cities of Salto, Paysandú, Bella Unión, Fray Bentos, Treinta y Tres and Melo, 36 surface water samples from the cities of Salto, Florida and Santa Lucía and 108 underground water samples from Salto city were studied. HBoV was screened by multiplex qPCR for the detection of the four subtypes, followed by monoplex qPCRs for the independent quantification of each subtype. A qualitative PCR followed by DNA sequencing and phylogenetic analysis was carried out for the molecular characterization of HBoV strains. HBoV was present in a high frequency (69%) in sewage, on the other hand, only one positive sample (3%) was found in surface water and it was not detected in underground water. Concerning sewage samples, HBoV1 was detected in 11 (23%) out of the 47 positive samples, with a mean concentration of 8.2×10^4 genomic copies/Liter (gc/L), HBoV3 was detected in 35 (74%) of the positive samples with a mean concentration of 4.1×10^6 gc/L and subtypes 2 and/or 4 were detected in 39 (83%) of the positive samples with a mean concentration of 7.8×10^6 gc/L. After the phylogenetic analysis performed by a Bayesian approach, the four HBoV subtypes were confirmed. Seven sewage samples that results positive for HBoV were describe as possible recombinant sequences. Three of these sequences were characterized and confirmed by different methods as recombinant strains. This recombination event was localized in the 5' extreme of VP1 gene and the parental strains belonged to subtypes 3 and 4. These strains shared a 100% nucleotide identity in the analyzed genomic region. This fact, suggests a successful dispersion of this recombinant strain.

Rate of viral evolution and population dynamics could not be determined, probably because the short nucleotide sequence used in this study.

Coalescence studies identified the entry of different viral strains into the country in different moments, with the dispersion of some strains in the Uruguayan population. The HBoV inactivation assay by chlorine was not performed since the concentration of intact viral particles in the samples was too low.

This is the first study determining a high frequency of HBoV and the presence of the four HBoV subtypes in aquatic matrices in Uruguay, mainly in sewage. Also, as far as we know this is the first study that described recombinant strains of HBoV in the Americas.

Although HBoV was scarcely detected in surface water, a waterborne transmission is likely to occur if people enter in contact with polluted surface waters for recreational activities such as fishing or swimming since a high frequency and concentration of HBoV was detected in raw sewage which is usually directly discharged into surface waters.

Keywords:

Human Bocavirus, Sewage, Surface water, Underground water, qPCR, Recombinants, Viral dispersion.

Tabla de Contenido

Introducción	10
Descubrimiento y Caracterización	12
Estructura viral y organización genómica	13
Patología.....	16
Epidemiología	18
Evolución del HBoV	19
HBoV en el ambiente	21
Relevancia	23
Hipótesis y objetivos	25
Hipótesis de trabajo	26
Dados los altos valores de frecuencia en que se ha detectado HBoV alrededor del mundo, esperamos encontrar el virus a frecuencias similares en aguas residuales y superficiales.	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos	26
Materiales y Métodos	27
Muestreo	28
Aguas residuales	28
Aguas superficiales	29
Aguas subterráneas	29
Concentración viral.....	30
Extracción de ácidos nucleicos	31
Selección de <i>primers</i> para la detección, cuantificación y análisis filogenético de HBoV	32
Construcción de las curvas estándares de la qPCR para la cuantificación de <i>Bocavirus Humano</i>	35
Amplificación y purificación de los amplicones	35
Clonado	36
Minipreps de células transformadas.....	38
Confirmación del inserto por PCR y secuenciación del amplicón.....	38
Cuantificación del ADN plasmídico.....	39
Screening de Bocavirus Humano y determinación de la carga viral por subtipo	40
Screening y cuantificación de Bocavirus Humano	40
Cuantificación independiente de cada subtipo	41
Análisis estadístico.....	41

Caracterización molecular de Bocavirus humano	42
Amplificación por PCR cualitativa	42
Observación de los resultados de las PCRs	43
Purificación y secuenciación de los amplicones de Bocavirus humano	43
Análisis filogenético	43
Análisis de cepas recombinantes	44
Amplificación por Nested PCR para evaluar las estirpes recombinantes	44
Análisis Bioinformático de las estirpes recombinantes de HBoV	46
Dinámica evolutiva de los Bocavirus humanos	47
Secuencias	47
Análisis de coalescencia	47
Inactivación viral con cloro	48
Tratamiento con ADNasa	49
Soluciones de cloro y determinaciones de cloro libre	50
Diagrama de flujo de trabajo	52
Resultados y discusión	54
Puesta a punto de las PCRs cuantitativas	55
Construcción de las curvas estándares de cuantificación	55
Bocavirus humano en aguas residuales	58
Bocavirus humano en aguas superficiales	66
Bocavirus humano en aguas subterráneas	67
Caracterización molecular de los Bocavirus humano	67
Estirpes de Bocavirus humano recombinantes	69
Análisis Filogeográfico de Bocavirus humano	74
Estimación de tiempos de introducción del Bocavirus humano en Uruguay	77
Evaluación de inactivación viral por cloro	80
Conclusiones	83
Perspectivas	85
Referencias	87
Apéndices	105
Apéndice 1- Publicaciones derivadas de esta tesis	104
Apéndice 2- Publicaciones realizadas en el transcurso de esta tesis	129

Introducción

Desde la aparición de la virología ambiental hace más de 50 años, con la primera detección de Poliovirus en aguas contaminadas, el desarrollo de esta ciencia ha ido creciendo. A partir de 1955, cuando en la India se presentó un brote epidémico del virus de la Hepatitis E (VHE), donde se vieron afectadas alrededor de 230.000 personas por el consumo de agua potable contaminada, el desarrollo de la virología ambiental se hizo más fuerte. Este evento llevó a que se creara en ese país el Instituto Nacional de Investigaciones de Ingeniería y Medio Ambiente, dedicado entre otras tareas al estudio de los virus en el ambiente. Desde entonces han surgido alrededor de todo el mundo muchos grupos de investigación dedicados al estudio de esta ciencia (Pina y Girones, 2001).

La importancia del estudio de los virus en matrices acuáticas se basa en que son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las enfermedades de transmisión hídrica, no considerándose en ningún caso flora normal del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, este enfoque es una forma indirecta de evaluar las infecciones virales en poblaciones, sobre todo si nos basamos en el estudio de aguas residuales (Choi y colaboradores, 2018)

Las enfermedades virales de vehiculación hídrica pueden ocurrir por consumo de agua, por contacto a través de la piel, por inhalación, o cuando ocurre una contaminación fecal del agua con aguas residuales humanas. Son de distribución mundial, causantes de epidemias tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. A su vez, los virus pueden sobrevivir durante mucho tiempo en el medio acuático, pudiendo resistir a los procesos de potabilización del agua, incluso la cloración, constituyendo un riesgo potencial de infección (Bosch A. 1998).

A la fecha, varios son los virus entéricos de transmisión hídrica que se han reportado. Muchas de estos virus ya han sido ampliamente estudiados en cuanto a

su presencia en diferentes matrices acuáticas; sin embargo, aún queda mucho por conocer, sobre todo para los virus emergentes, como es el caso del Bocavirus Humano (HBoV) (Fong y colaboradores, 2005).

Descubrimiento y Caracterización

HBoV fue descubierto por Allander y colaboradores en el año 2005 a partir de aspirados nasofaríngeos de pacientes con infecciones respiratorias. Las muestras del tracto respiratorio de estos pacientes fueron utilizadas para la extracción del material genético, tanto ADN como ARN, el cual fue amplificado con *primers* randómicos, ligado a un vector T y transformado en células competentes para clonar los productos amplificados. Estos fueron secuenciados y a partir de estas secuencias se realizaron análisis filogenéticos.

Dichos análisis permitieron detectar en las muestras, material genético humano, bacteriano, de hongos, fagos y virus. Dentro del material genético viral, las secuencias presentaron un alto porcentaje de similitud con siete familias virales. Dentro de ellas, 3 pertenecientes a virus con genoma de ARN y 4 a virus con genoma de ADN, todos ya caracterizados como agentes patogénicos del tracto respiratorio; a excepción de la secuencia de un virus con genoma ADN, el cual mostró una estrecha relación genética con dos miembros de la familia *Parvoviridae*: parvovirus bovino (BPV) y virus minute canino (CMnV). Debido a estos hallazgos, se decidió darle el nombre de Bocavirus (Allander y colaboradores, 2005).

HBoV es un virus perteneciente a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Bocaparvovirus*. Dentro de este género se han identificado dos especies: *Primate bocaparvovirus 1* y *Primate bocaparvovirus 2*, que se diferencian por la secuencia aminoacídica de la proteína no estructural NS1 (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV).

Dentro de las dos especies virales se han caracterizado 4 subtipos, HBoV1-4, perteneciendo HBoV1 y 3 a la especie *Primate bocaparvovirus 1*, y HBoV2 y 4 a la especie *Primate bocaparvovirus 2*. Esta diferenciación se basa en el porcentaje de identidad entre secuencias nucleotídicas del gen VP1 (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV; Kapoor y colaboradores, 2009, 2010; Arthur y colaboradores, 2009).

Estructura viral y organización genómica

HBoV es un virus pequeño, la cápside mide aproximadamente 25 nm de diámetro, de simetría icosaédrica, no envuelto, tal como se observa en la figura 1. La ausencia de envoltura le confiere gran estabilidad en el ambiente. Las proteínas que forman la cápside viral le permiten al virión unirse a los receptores celulares de sus células huésped. Posee un genoma lineal de ADN simple hebra de polaridad negativa y con un tamaño que ronda los 5200 a 5300 nucleótidos (Allander y colaboradores, 2005; Schildgen y colaboradores, 2012; Berns y Parrish, 2013) más una repetido terminal, el cual se cree que cumple un rol importante en la iniciación de la replicación viral (Lusenbrink y colaboradores, 2011; Kapoor y colaboradores, 2011). De todos modos, para llevar a cabo su replicación, es altamente dependiente de las funciones del huésped, utilizando entre otras enzimas la ADN polimerasa celular (Jarriti y colaboradores, 2012).

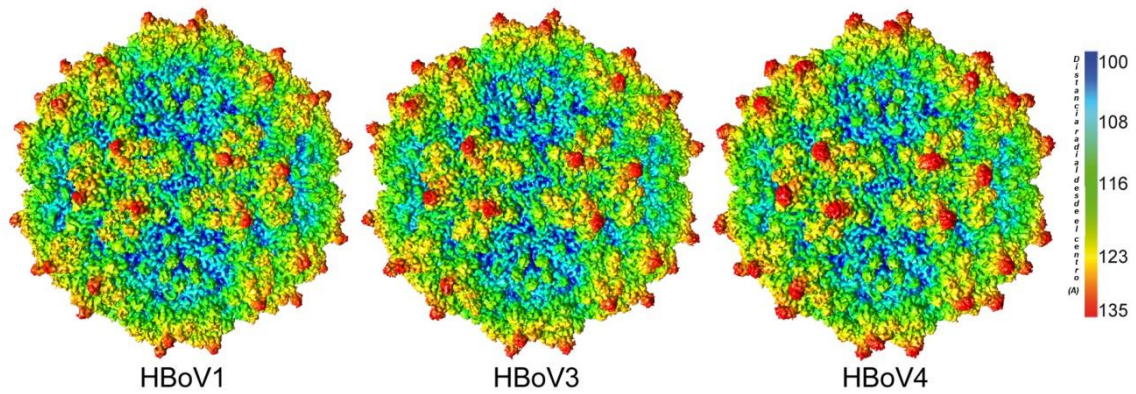


Figura 1- Estructura de la cápside de HBov. Mapa de densidad de la cápside de los subtipos 1, 3 y 4 de HBov. Los mapas están coloreados de acuerdo a la distancia radial desde el centro de la partícula (azul a rojo), tal como se indica en la escala a la derecha de la figura. Tomado de Mietzsch y colaboradores (2017).

El genoma de HBov presenta tres marcos abiertos de lectura (ORF) y contiene información genética que codifica para dos proteínas estructurales: VP1 y VP2, y dos no estructurales: NS1 y NP1 (Allander y colaboradores, 2005) como se puede observar en la figura 2. Los genes que codifican para las proteínas no estructurales representan regiones conservadas, siendo utilizados para la detección viral por técnicas moleculares; mientras que los genes que codifican para las proteínas de la cápside presentan mayor variabilidad nucleotídica, siendo utilizados para los estudios de filogenia. La organización genética de estas proteínas en el genoma viral es similar a la de otros miembros de la familia *Parvoviridae* (Chieochansin y colaboradores, 2007).

Hacia el extremo 5' del genoma se encuentra un largo ORF que codifica para la proteína no estructural NS1. Durante el ciclo de replicación, esta actúa como una proteína polifuncional; siendo esencial en la replicación del ADN, la detención del ciclo celular y la trans-activación de genes. En la región central del genoma se encuentra el segundo ORF el cual codifica para una proteína no estructural adicional, una fosfoproteína nuclear llamada NP1, la cual es parte esencial de la maquinaria de replicación (Dong y colaboradores, 2018). Hacia el

extremo 3' se encuentra el tercer ORF que codifica para las dos proteínas estructurales: VP1 y VP2 (Schildgen y colaboradores, 2012).

Las proteínas virales VP1 y VP2 conforman la cápside proteica del virión. Presentan una secuencia con bajo porcentaje de similitud con respecto a otros virus de la familia *Parvoviridae* (42% a 43% en la secuencia aminoacídica), sin embargo mantienen una alta similaridad estructural (Gurda y colaboradores, 2010). VP1 tiene un dominio fosfolipasa A2 que facilita la entrada del virus a la célula y una señal de localización nuclear en su extremo amino terminal, mientras que en el extremo amino terminal de VP2 hay una señal de exportación nuclear. Estas dos proteínas son idénticas en secuencia y sólo difieren en la región amino-terminal de VP1, conocida como región única de VP1 (VP1u) (Suikkanen y colaboradores, 2003; Berns K.I. y Parrish C.R., 2013).

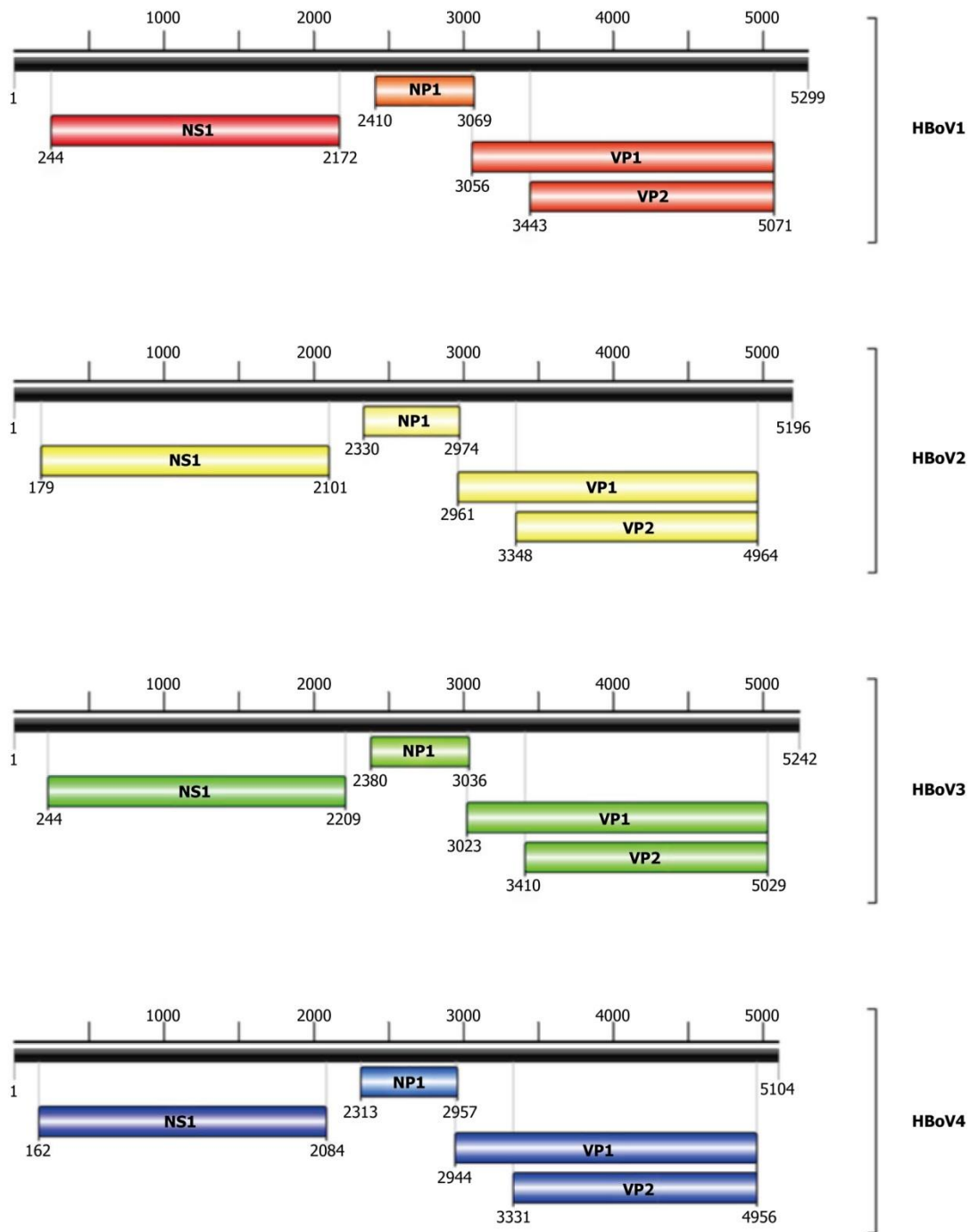


Figura 2- Organización genómica de HBoV. Representación esquemática del genoma de los subtipos de HBoV (HBoV1, secuencia NC007455; HBoV2, secuencia NC012042; HBoV3, secuencia NC012564; HBoV4, secuencia NC012729). Se muestran las regiones codificantes de las proteínas NS1, NP1, VP1 y VP2, así como sus posiciones nucleotídicas. Tomado de Guido y colaboradores (2016).

Patología

El subtipo 1 de HBoV se ha detectado mayormente en muestras del tracto respiratorio, asociando este subtipo desde su descubrimiento a infecciones de este tejido (Allander y colaboradores, 2005). Su detección se ha registrado en individuos

de todas las edades, aunque diversos estudios han reportado prevalencias más altas en niños de entre seis y 24 meses de edad, indicando que los niños más pequeños son los más susceptibles a estas infecciones (Kleines y colaboradores, 2007; Schildgen y colaboradores, 2008; Lusebrink y colaboradores, 2009; Sun y colaboradores, 2009; Song y colaboradores, 2010).

En lo que respecta a los subtipos 2, 3 y 4 del virus, desde su primera detección en heces, han sido encontrados mayormente en muestras del tracto gastrointestinal de pacientes con gastroenteritis, por lo que se los ha asociado principalmente con este tipo de infecciones (Arthur y colaboradores, 2009; Kapoor y colaboradores, 2009, 2010).

Si bien para el caso del subtipo 1 hay una fuerte relación entre la presencia del virus y la infección respiratoria, para el caso de los subtipos 2, 3 y 4 hay varios autores que se han cuestionado cuál es el verdadero rol del virus en este tipo de infecciones, preguntándose si estos subtipos virales son verdaderos agentes patogénicos o simplemente inocentes espectadores. Algunos estudios han mostrado que la prevalencia del virus en individuos con gastroenteritis es similar a la de individuos asintomáticos (Ong y colaboradores, 2015); mientras que otros han evidenciado que HBoV2 se presentaría como un agente capaz de provocar gastroenteritis, sobre todo en niños menores de cinco años de edad (De y colaboradores, 2017).

Se ha mostrado un alto grado de coinfección entre HBoV y otros virus gastroentéricos (Lindner y colaboradores, 2008; Schildgen y colaboradores, 2008; Lusebrink y colaboradores, 2009), lo que lleva a considerar que los subtipos 2, 3 y 4 podrían actuar como agentes oportunistas cuando acompañan a agentes patogénicos.

Al día de hoy, dada la ausencia de modelos animales en los que el virus se pueda replicar, y la dificultad de su replicación *in vitro* en cultivos celulares, aún no se ha podido confirmar el rol exacto del virus en cuanto a su patogenicidad, sobre todo para los subtipos gastrointestinales.

Epidemiología

Desde su descubrimiento, los diferentes subtipos de HBoV han sido detectados alrededor de todo el mundo en muestras del tracto respiratorio (Allander y colaboradores, 2005; Bastien y colaboradores, 2006; Choi y colaboradores, 2006; Pozo y colaboradores, 2007; Miron y colaboradores, 2010), gastrointestinal (Albuquerque y colaboradores, 2007; Chieochansin y colaboradores, 2008; Tozer y colaboradores, 2009; Nadji y colaboradores, 2010; Monavari y colaboradores, 2013; Tymentsev y colaboradores, 2016), suero (Allander y colaboradores, 2007; Neske y colaboradores, 2007; Tozer y colaboradores, 2009; Christensen y colaboradores, 2010), amígdalas (Lu y colaboradores, 2008), saliva (Martin y colaboradores, 2009), orina (Pozo y colaboradores, 2007, Wang y colaboradores, 2010), agua de río (Hamza y colaboradores, 2009) y agua residual (Blinkova y colaboradores, 2009; Myrmel y colaboradores, 2015; laconelli y colaboradores, 2016); lo cual indica que es un virus endémico a nivel mundial.

Su transmisión e infección ocurre a lo largo de todo el año, encontrándose una predominancia durante los meses de invierno y primavera. Algunos estudios demostraron una prevalencia del virus en infecciones respiratorias de un 6%; con un rango de entre un 1% y un 57%; de forma similar, en infecciones gastrointestinales la prevalencia a nivel mundial se estimó en un 6%; variando entre 1% y 63% (Guido y colaboradores, 2016). Estas variaciones pueden deberse a

diferencias en las poblaciones analizadas, edad o técnica utilizada para la detección viral.

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente descritas en asociación a la presencia de HBoV1 han sido tos, fiebre, rinorrea, exacerbación del asma, bronquiolitis aguda y neumonía (Allander y colaboradores, 2005; Bastien y colaboradores, 2006; Kesebir y colaboradores, 2006; Fry y colaboradores, 2007; Dina y colaboradores, 2009; Jartti y colaboradores, 2012); mientras que los subtipos gastrointestinales se asocian a manifestaciones clínicas tales como náuseas, vómitos y diarrea (Yu y colaboradores, 2008).

Hasta el momento, la detección viral se ha basado en técnicas moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y la PCR cuantitativa (qPCR). Si bien se ha logrado aislar el virus en cultivos celulares, utilizando células epiteliales pseudoestratificadas del tracto respiratorio humano, son pocos los trabajos que describen una replicación exitosa (Dijkman y colaboradores, 2009; Huang y colaboradores, 2012; Sun y colaboradores, 2013; Deng y colaboradores, 2014).

Evolución del HBoV

La evolución de Bocavirus opera principalmente por dos mecanismos: mutaciones puntuales, esencialmente por sustituciones nucleotídicas, y eventos de recombinación. Ambos mecanismos revelan un elevado potencial del virus para generar diversidad genética que es la base de la evolución viral (Ayllón y colaboradores, 2006).

Los eventos de recombinación han sido descritos en HBoV, tanto a nivel de intersubtipos como intrasubtipos; en este último caso, sobre todo entre los subtipos gastroentéricos (Khamrin y colaboradores, 2012; Tyumentsev y colaboradores,

2014). En cuanto a su evolución por eventos de mutación, algunos estudios han demostrado que el virus posee una elevada frecuencia de mutación, similar a la de los virus con genoma de ARN (Shackelton y colaboradores, 2007).

El fenómeno de recombinación se encuentra fuertemente asociado a la evolución de HBoV, tanto es así que varios autores postulan que los subtipos 2 y 3 surgieron gracias a eventos de recombinación intersubtipos (Kapoor y colaboradores, 2010; Cheng y colaboradores, 2011; Fu y colaboradores, 2011). Sin embargo, a la fecha, únicamente existen trabajos que respaldan esta hipótesis para el caso de HBoV3 (Kapoor y colaboradores, 2010; Cheng y colaboradores, 2011; Babking y colaboradores, 2013; Chong y colaboradores, 2017). Según estos estudios, HBoV3 habría surgido debido a un evento de recombinación entre el subtipo 1 y alguno de los subtipos gastroentéricos (subtipos 2 o 4), ubicándose el punto recombinación entre las secuencias que codifican para los genes NP1 y VP1, región ya descrita como punto caliente (*hotspot*) de recombinación en HBoV.

A pesar de que no hay evidencia sólida que respalde el origen de HBoV2 por recombinación entre otros subtipos de HBoV, las recombinaciones intrasubtipos han sido caracterizadas para HBoV2 (Kapoor y colaboradores, 2009).

Han sido descritas dos nuevas cepas recombinantes que aún no han divergido lo suficiente para ser consideradas como nuevos subtipos. Una de estas cepas se describe como recombinante entre los subtipos 2 y 4 (Kamhrin y colaboradores, 2013), mientras que la otra se describe como recombinante entre los subtipos 3 y 4 (Tyumentsev y colaboradores, 2014). Ambos eventos de recombinación se produjeron en la región descrita como *hotspot* de recombinación.

A través del análisis de coalescencia, utilizando tanto el genoma completo como secuencias que codifican para la proteína no estructural NS1 y las proteínas estructurales VP, se ha tratado de determinar características del virus tales como su dinámica evolutiva y su evolución molecular (Zehender y colaboradores, 2010; Babkin y colaboradores, 2013). La tasa de evolución viral para los HBoV es de $8,6 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año, encontrándose a su vez que los nucleótidos correspondientes a la primera y segunda posición del codón evolucionan a una tasa 15 veces menor respecto a la que lo hace la tercera posición (Zehender y colaboradores, 2010). Dicha tasa de evolución muestra que al igual que otros miembros de la familia *Parvoviridae*, HBoV presenta una elevada tasa evolutiva si se lo compara con otros virus con genoma de ADN.

Los análisis con otros miembros del género *Bocaparvovirus* (bocavirus de chimpancé [ChBoV] y bocavirus de gorila [GBoV]) han demostrado que los subtipos de HBoV han divergido hace relativamente poco tiempo, aproximadamente entre los años 1720 y 1950; caracterizando su origen como un posible evento zoonótico, donde el subtipo respiratorio (HBoV1) y los subtipos gastrointestinales habrían surgido a partir de un ancestro común con ChBoV y GBoV, respectivamente. Dichos eventos se habrían dado entre los años 1930 y 1950 para HBoV1 y 1710 y 1810 para los subtipos gastroentéricos (Babkin y colaboradores, 2013).

HBoV en el ambiente

A nivel mundial se ha descrito la presencia de HBoV mayormente en muestras del tracto respiratorio, del tracto gastrointestinal, así como también en muestras de aguas residuales; en este último caso con una elevada frecuencia (Allander y colaboradores, 2005, Kapoor y colaboradores, 2008; Blinkova y

colaboradores, 2009; Myrmel y colaboradores, 2015; laconelli y colaboradores, 2016; Hamza y colaboradores, 2017).

A nivel regional y mundial, se han llevado a cabo varios estudios que detectan la presencia del virus en muestras clínicas (Albuquerque y colaboradores, 2007; Proenca-Modena y colaboradores, 2011; Vera-Garate y colaboradores, 2016; Bedolla-Barajas y colaboradores, 2017; Canela y colaboradores, 2018). Sin embargo, son relativamente pocos los estudios que han evidenciado su presencia en matrices acuáticas (Blinkova y colaboradores, 2009; Hamza y colaboradores, 2009; Bibby and Peccia, 2013; Myrmel y colaboradores, 2015; laconelli y colaboradores, 2016; Hamza y colaboradores, 2017; La Rosa y colaboradores, 2017; Guerrero-Latorre y colaboradores, 2018), todos realizados en países de Norteamérica y Europa, a excepción del trabajo presentado por Guerrero-Latorre y colaboradores (2018), el cual detecta el virus en aguas superficiales de la ciudad de Quito, Ecuador.

Para el caso de aguas residuales, los trabajos describen la presencia del virus con frecuencias elevadas de entre un 59% y 93% (Blinkova y colaboradores, 2009; Bibby and Peccia 2013; Myrmel y colaboradores, 2015; laconelli y colaboradores, 2016; Hamza y colaboradores, 2017); mientras que los estudios que describen su positividad en ríos europeos mostraron valores de positividad de alrededor de un 40% (Hamza y colaboradores, 2009; La Rosa y colaboradores, 2017). Sin embargo, es totalmente desconocida la presencia de este virus en otros cuerpos de aguas como pueden ser las aguas subterráneas.

En nuestro país, si bien ya se ha determinado la presencia de virus gastroentéricos tales como Aichivirus, Astrovirus, Norovirus y Rotavirus en diferentes matrices acuáticas (Victoria y colaboradores, 2014; Burutaran y

colaboradores, 2015; Lizasoain y colaboradores, 2015; Tort y colaboradores, 2015; Victoria y colaboradores, 2016); nada se sabe aún de la presencia de HBoV, considerado como un virus emergente dado su reciente descubrimiento.

Dada la relevancia del recurso acuático para el desarrollo de las diversas actividades humanas y su protagonismo como medio de vehiculación viral, es de gran importancia conocer su presencia en aguas residuales, superficiales y subterráneas de la región, así como también determinar los subtipos que circulan y la carga viral en la que se encuentran.

Relevancia

Con el correr del tiempo, la importancia del agua ha aumentado junto al gran crecimiento de la población, de las actividades humanas y de su consumo para la producción de bienes. Junto a éstos también se incrementó la contaminación de este recurso (Organización de las naciones unidas, ONU, 2018).

El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua. Determinar los diferentes microorganismos presentes y su concentración, proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas (Organización mundial de la Salud, OMS, 2006).

La contaminación viral de fuentes de agua es un problema para la salud pública, ya que el agua puede jugar un papel muy importante en la transmisión de muchos virus. La detección de HBoV en muestras del tracto gastrointestinal de niños sin signos de infección respiratoria infiere la posibilidad de una replicación entérica del virus y una diseminación a través de las heces (Vicente y colaboradores, 2007). Como ya se mencionó previamente, el rol de HBoV en

infecciones gastroentéricas no es claro, sin embargo, la excreción del virus en heces y la presencia en agua para consumo o con un fin recreacional incrementa el riesgo potencial de infección, como se ha sugerido para otros virus entéricos (Kukkula y colaboradores, 1997; Pina y colaboradores, 1998a; Lee & Kim 2002; Lodder & de Roda Husman, 2005).

Como fue mencionado anteriormente, con la excepción de un estudio realizado en Ecuador donde se detectó el HBoV en ríos urbanos de la ciudad de Quito, el resto de los estudios de HBoV en aguas ambientales han sido realizados en América del Norte y Europa. Por lo que nuestro estudio brindará resultados relevantes para conocer mejor la situación de la dispersión de estos virus en diferentes cuerpos de aguas ambientales en países en desarrollo como lo es Uruguay. Estos datos permitirán realizar una comparación más precisa de la circulación de este virus en estos cuerpos de agua entre los diferentes países del mundo.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis de trabajo

Dados los altos valores de frecuencia en que se ha detectado HBoV alrededor del mundo, esperamos encontrar el virus a frecuencias similares en aguas residuales y superficiales de Uruguay.

Objetivo general

Determinar el grado de contaminación, la epidemiología molecular y evolución de los Bocavirus humano en diferentes matrices acuáticas en Uruguay así como también estudiar su resistencia a la inactivación química.

Objetivos específicos

Determinar la frecuencia de detección y la concentración de HBoV en diferentes matrices acuáticas del Uruguay.

Realizar la caracterización molecular de los virus detectados en las aguas ambientales uruguayas.

Determinar la tasa de evolución, la dinámica poblacional y la dispersión de los HBoV en Uruguay.

Estudiar la presencia de estirpes recombinantes de HBoV.

Evaluar la dinámica de inactivación del HBoV utilizando cloro como un agente de desinfección.

Materiales y Métodos

Muestreo

Para este estudio se partió de tres grupos de muestras de aguas ambientales previamente concentradas que estaban disponibles en el Laboratorio de Virología Molecular del CENUR Litoral Norte, Sede Salto, como se detalla a continuación (Victoria y colaboradores, 2014; Tort y colaboradores, 2015; Gamazo y colaboradores, 2018.; Bortagaray y colaboradores, 2019).

Aguas residuales

Se realizó el muestreo de aguas residuales en seis ciudades del país: Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Treinta y Tres y Melo.

Las ciudades de Salto y Paysandú vuelcan sus aguas residuales directamente al Río Uruguay mediante caños colectores. Los muestreos en estos casos se realizaron en puntos de inspección de dichos caños antes de su llegada al río.

Fray Bentos cuenta con una planta de tratamiento primario. En este caso, la toma de muestras se realizó aguas abajo de dicha planta, previo a su llegada al río. Bella Unión, por su parte, posee un sistema de tratamiento de aguas residuales por lagunaje; en este caso la toma de muestra se realizó posterior a la salida de las lagunas. Las ciudades de Treinta y Tres y Melo poseen plantas de tratamiento terciario con desinfección por radiación ultravioleta; con lo cual la toma de muestra se realizó en un punto previo a la entrada a la planta.

En las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos, se colectaron 100 mL de agua en cada punto, quincenalmente desde marzo de 2011 a febrero de 2012; mientras que en las ciudades de Treinta y Tres y Melo, se colectó el mismo volumen pero bimensualmente desde septiembre de 2011 a abril de 2013.

Las muestras fueron pooleadas para tener una muestra mensual por ciudad previo a la extracción de los ácidos nucleicos.

Aguas superficiales

El muestreo de aguas de río (superficiales) se realizó en tres puntos del país. En el Río Uruguay, aguas abajo de la ciudad de Salto y en el río Santa Lucía, aguas abajo de las ciudades de Florida y Santa Lucía. En todos los casos se colectaron 500 mL de agua, mensualmente, durante los meses de junio de 2015 a mayo de 2016.

Aguas subterráneas

108 muestras de 26 pozos de agua subterránea de la ciudad de Salto o próximos a ella, fueron analizadas con el fin de detectar la presencia de HBoV. Ya se había detectado en un estudio anterior, la presencia de al menos un virus gastroentérico (Rotavirus y/o Adenovirus) en los pozos analizados.

La toma de muestra se realizó a través de un *screening* primario entre los meses de mayo y setiembre de 2013, y luego se realizó un muestreo bimensual entre Noviembre de 2013 y Setiembre de 2014 colectándose 10 litros de agua en todos los casos.

Las muestras fueron refrigeradas a 4 °C para su transporte hasta el laboratorio, y conservadas a -20 °C hasta realizar la concentración viral. En el caso de las muestras de aguas subterráneas, éstas fueron concentradas inmediatamente después de su llegada al laboratorio.

En total se procesó un total de 212 muestras: 68 de aguas residuales, 36 de aguas superficiales y 108 de aguas subterráneas.

Concentración viral

Las muestras de aguas residuales fueron concentradas por el método de ultracentrifugación, tal como se describe por Pina y colaboradores (1998b) con modificaciones según Fumian y colaboradores (2010). 42 mL de agua residual fueron ultracentrifugados a 100.000 xg por una hora a 4 °C. Las partículas virales se resuspendieron en 3,5 mL de buffer Glicina 0,25 N, pH 9,5 e incubados en hielo por 30 minutos. Luego se adicionó 3,5 mL de buffer Fosfato salino 2X (PBS, pH 7,2) para neutralizar la solución y se centrifugó a 12.000 xg por 15 minutos. El sobrenadante fue ultracentrifugado nuevamente a 100.000 xg por una hora a 4 °C. Finalmente se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS 1X.

La concentración de partículas virales de aguas superficiales fue llevada a cabo por medio del método de adsorción-elución a una membrana cargada negativamente, tal como está descrito en Katayama y colaboradores (2002) y siguiendo las modificaciones descritas en Haramoto y colaboradores (2009). A 500 mL de muestra se le adicionó $MgCl_2$ para obtener una concentración final de 25 mM y posteriormente se filtró todo el volumen por una membrana cargada negativamente, tipo HA, de 47 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,45 µm. Luego se lavó la membrana con 200 mL de H_2SO_4 (pH 3,0), 0,5 mM. Posteriormente se colocó la membrana en una placa de Petri, donde se realizó la elución viral agregándole 4 mL de NaOH (pH 10,8) 1 mM y se agitó circularmente por 10 minutos. Finalmente se adicionó 40 µL de H_2SO_4 50 mM y 40 µL de buffer TE 100X (pH 8,0) para neutralizar la solución.

En el caso de las muestras de aguas subterráneas, su concentración se realizó por el método de floculación utilizando leche en polvo, para obtener un volumen final de elución de 10 mL, tal como se describe en Calgua y colaboradores

(2008). Inicialmente una solución de leche en polvo pre focolada (1%) se preparó disolviendo 10 gramos de leche en polvo en un litro de agua y se ajustó el pH a 3,5 con HCl 1 N. 100 mL de esta solución se adicionó a 10 L de cada muestra, las cuales habían sido previamente acidificadas (pH 3,5). Las muestras fueron agitadas por ocho horas a temperatura ambiente, y luego se permitió la precipitación de los flóculos por medio de la decantación de éstos por gravedad durante ocho horas. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente sin resuspender el precipitado. Un volumen final de aproximadamente 500 mL conteniendo el precipitado fue trasvasado a un tubo para centrifuga y se realizó el centrifugado a 7.000 xg por 30 minutos a 12 °C. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y el pellet fue resuspendido en 8 mL de buffer fosfato 0,2 M, pH 7,5. Una vez disuelto por completo el pellet, se agregó buffer fosfato para obtener un volumen final de 10 mL. El concentrado se almacenó a -20 °C hasta realizarse la extracción de los ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit de extracción *QIAamp Cador Pathogen mini kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemania). Para cada muestra se colocaron 20 µl de proteinasa K en un tubo de dos mililitros y se adicionaron 200 µl de la muestra concentrada. Posteriormente se agregaron 100 µl de *Buffer VXL* y se agitó vigorosamente. Se agregó 1 µg de *carrier* ARN y se incubó a 20–25 °C por 15 minutos. Luego se realizó un paso de centrifugación breve, se agregaron 350 µl de *Buffer ACB* y se mezcló por vortexeo. Se transfirió el lisado a una columna *QIAamp Mini*, colocado dentro de un tubo de colecta y se centrifugó la muestra a 6.000 xg por un minuto. Se descartó el eluido y se le agregó a la columna 600 µl de

Buffer AW1. Se centrifugó nuevamente a 6.000 xg por un minuto, se eliminó el eluido y se le agregaron a la columna 600 µl de *Buffer AW2*, se volvió a centrifugar a 6.000 xg por un minuto y se transfirió la columna a un nuevo tubo de colecta. Se centrifugó a 20.000 xg por dos minutos y finalmente se colocó la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 mL, se adicionaron 60 µl de *Buffer AVE* al centro de la membrana, se incubó la muestra a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a 20.000 xg por un minuto. El eluido se almacenó a -20 °C.

Selección de *primers* para la detección, cuantificación y análisis filogenético de HBoV

Luego del análisis de los protocolos publicados en diferentes artículos científicos (Choi y colaboradores, 2006; Neske y colaboradores, 2007; Dina y colaboradores, 2009; De Vos y colaboradores, 2009; Hamza y colaboradores, 2009; Kantola y colaboradores, 2010; Kapoor y colaboradores, 2010; Monavari y colaboradores, 2013; La Rosa y colaboradores, 2015, laconelli y colaboradores, 2016), se eligió trabajar con el protocolo descrito por Kantola y colaboradores (2010) para la detección y cuantificación del virus, así como los protocolos descritos La Rosa y colaboradores (2015) y laconelli y colaboradores (2016) para el análisis filogenético, dicha opción se tomó en base a la sensibilidad y especificidad de los ensayos.

El protocolo descrito por Kantola y colaboradores (2010) utiliza cinco *primers* y una sonda para el *screening* de los cuatro subtipos virales en una reacción de *multiplex qPCR*. La cuantificación de cada uno de los subtipos se realiza mediante la utilización posterior de un par de *primers* para cada subtipo en *qPCR monoplex*.

Los *primers* se dirigen a la región 3' del genoma, ubicándose el *primer Forward* en la región *UTR* (no codificante) y el *primer Reverse* sobre el extremo 5' de la región codificante del gen NS1 (tabla 1). Dado el elevado grado de conservación de nucleótidos en esta región, ésta es indicada para realizar tanto el *screening* como la cuantificación viral.

Tabla 1. *Primers* y sonda utilizados en las qPCR multiplex y monoplex.

Nombre del <i>primer</i> o sonda	Secuencia (5'→3')	Región genómica, secuencia de referencia
HBoV1F(+)	CCTATATAAGCTGCTGCACTTCCTG	152 a 177, NC_007455
HBoV1R(-)	AAGCCATAGTAGACTCACCACAAG	235 a 259, NC_007455
HBoV234F(+)	GCACTTCCGCATYTCGTCAG	50 a 70, FJ170279
HBoV3R(-)	GTGGATTGAAAGCCATAATTTGA	205 a 230, EU918736
HBoV24R(-)	AGCAGAAAAGGCCATAGTGTC	128 a 150, FJ170279
Probe (FAM/BHQ1)	CCAGAGATGTTCACTCGCCG	85 a 104, FJ170279

(+) *primer Forward*, (-) *primer Reverse*. Las siguientes combinaciones de *primers* fueron utilizadas para amplificar cada subtipo, HBoV1: HBoV1F-HBoV1R; HBoV3: HBoV234F, HBoV3R; HBoV2/4: HBoV 234F, HBoV24R.

La caracterización molecular de los HBoV detectados se realizó utilizando una *nested PCR* con *primers* descritos por La Rosa y colaboradores (2015) para los subtipos 2,3 y 4 y laconelli y colaboradores (2016) para el subtipo 1 (tabla 2). Éstos están dirigidos al extremo 5' de la región genómica que codifica para las proteínas estructurales VP1-VP2, como se muestra en la figura 3, amplificando un fragmento de 380 pb. Esta región es de interés para el análisis filogenético, ya que presenta una alta variabilidad genética entre las diferentes estirpes que brinda información necesaria para la caracterización correcta de cada subtipo.

Tabla 2. *Primers* utilizados en las reacciones Nested PCR.

Ensayo molecular	<i>Primer</i> ID	Secuencia (5'-3')	Referencia	Región genómica, secuencia de referencia
Nested PCR HBoV2-3-4	HBoV 234F1(+)	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAA	La Rosa y colaboradores, (2015)	2885 a 2907, FJ170279
	HBoV 234R1(-)	GTGGATATACCCACAYCAGAA		3403 a 3424, FJ170279
	HBoV 234F2(+)	GGTGGGTGCTTCCTGGTTA		2947 a 2966, FJ170279
	HBoV 234R2(-)	TCTTGRATTTTCATTTTCAGACAT		3305 a 3328, FJ170279
Nested PCR HBoV1	HBoV 1F1(+)	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAAG	Iaconelli y colaboradores, (2016)	3022 a 3045, NC_007455
	HBoV 1R1(-)	GTGGAAATCCCCACACCAGAT		3541 a 3561, NC_007455
	HBoV 1F2(+)	GGTGGGTGCTGCCTGGATA		3084 a 3102, NC_007455
	HBoV 1R2(-)	TCTTGAATGTCAGTGTCAGACAT		3443 a 3465, NC_007455

(+): *primer Forward*, (-): *primer Reverse*.

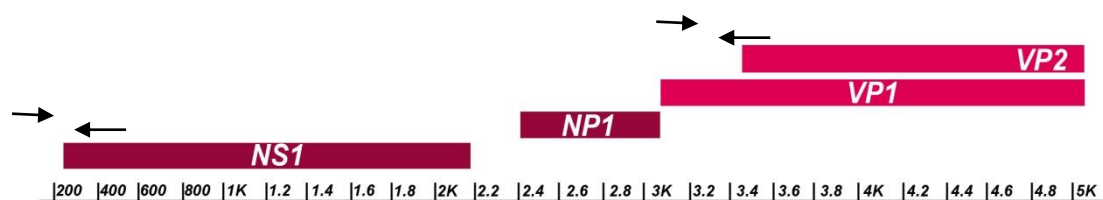


Figura 3 - Localización de los *primers* (flechas) de qPCR y Nested PCR dirigidos a la proteína no estructural NS1 y la proteína estructural VP1, respectivamente.

Construcción de las curvas estándares de la qPCR para la cuantificación de *Bocavirus Humano*

Amplificación y purificación de los amplicones

Para la construcción de las curvas estándares de cuantificación de cada uno de los subtipos, se amplificaron HBoV con los *primers* correspondientes a la qPCR en reacciones tipo cualitativas. Cada uno de los fragmentos obtenidos, luego de ser corrido en una electroforesis en gel de agarosa 1,5%, fue purificado utilizando el kit de purificación *PureLink™ Quick Gel Extraction y PCR Purification Combo kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos).

Para la purificación del amplicón de interés, se cortó con bisturí el fragmento correspondiente del gel de agarosa, se colocó en un tubo de centrifuga de 1,5 mL y se pesó el fragmento cortado. Luego se agregaron tres volúmenes de buffer de solubilización por cada volumen de gel (considerando que 1 mg de gel corresponde a 1 µL del buffer). Posteriormente se colocó el tubo en un termobloque a 50 °C por 10 minutos, invirtiendo el tubo cada tres minutos para asegurar su disolución. Se pipeteó la disolución del gel, conteniendo el fragmento de ADN de interés dentro de una columna *PureLink®*, se centrifugó el tubo a 10.000 xg por un minuto y se descartó el filtrado. Se agregaron 700 µL de *Wash buffer* y se centrifugó nuevamente a 10.000 xg por un minuto. Se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar a 10.000 xg por tres minutos para remover posibles residuos que hayan quedado en la columna. Se colocó la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 mL, se adicionaron 50 µL de buffer de elución, se lo incubó a temperatura ambiente por un minuto y finalmente se lo centrifugó a 10.000 xg por un minuto para obtener un eluido.

En la tabla 3 se describen tanto la mezcla de reactivos para realizar la PCR así como el ciclado para obtener los amplicones de interés.

Tabla 3. Condiciones de la PCR para obtener los amplicones a ser utilizados en las curvas de cuantificación.

Reactivo	Volumen(μL)
Buffer (10x)	5,0
dNTPs (10 mM)	1,0
Primer F* (10 μM)	2,0
Primer R* (10 μM)	2,0
MgCl ₂ (25 mM)	3,0
ADN	2,0
Taq ADN Pol. (5 U/ μL)	0,4
Agua	32,6
DMSO (10x)	2,0
Volumen total	50,0

*Las combinaciones de *primers Forward* y *Reverse* para la amplificación de cada subtipo se describen en la tabla 1.

Ciclado:

95 °C	3'	} 40 ciclos
95 °C	30''	
55 °C	30''	
72 °C	30''	
72 °C	10'	

Clonado

A partir de los productos amplificados y purificados se realizaron las reacciones correspondientes para clonar los productos en el vector Pjet 1.2 (Thermo Fisher Scientific, California, Estados Unidos), utilizando el kit de clonación *Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

En primer lugar se realizó la reacción de *Blunting*, para esto se colocó en un tubo de centrifuga 10 μL de buffer de reacción 2X, 0,15 pmoles del producto de PCR purificado, 1 μL de la enzima *DNA blunting enzyme* (NEB, Massachusetts, Estados Unidos) y agua libre de ADNasa (QIAGEN®, Hilden, Alemania) para completar 18 μL . Se agitó vigorosamente el tubo de centrifuga y se centrifugó por

cinco segundos. Luego se incubó por cinco minutos a 70 °C y se colocó rápidamente en hielo.

Posteriormente se procedió a realizar la ligación del fragmento amplificado al vector *pJET 1.2* de 2.974 pb (Thermo Fisher Scientific, California, Estados Unidos). Se agregó 1 µL del vector *Pjet 1.2/blunt* (50ng/µL) y 1 µL de T4 ADN ligasa (5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) a la mezcla de *blunting*. Se vortexeó y se centrifugó por 5 segundos. Se incubó la mezcla a 22 °C en un termociclador por 5 minutos.

Luego de la ligación del producto de amplificación en el vector, se procedió a realizar la reacción de transformación. Para esto se descongeló en hielo por 10 minutos un tubo de células competentes *E. coli NEB-5alpha* (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos). Se transfirieron 60 µL de las células a un tubo de centrifuga y se adicionaron 5 µL de ligación, los cuales se mezclaron por pipeteo. Posteriormente se colocó la mezcla en hielo por 30 minutos y se realizó un shock térmico a 42 °C durante 30 segundos y posterior incubación en hielo por 5 minutos. A continuación se pipetearon 935 µL de medio líquido *Luria Bertani* (LB) (medio de enriquecimiento bacteriano) en un tubo de 15 mL y se agregaron las células transformadas. Se incubó en un agitador a 37 °C por 60 minutos, agitando vigorosamente. Se precalentaron las placas de Petri de LB agar con ampicilina a 37 °C y se plaquearon 10 µL, 100 µL y el volumen restante de las células transformadas.

Las placas de Petri de LB se prepararon con Ampicilina a una concentración final en el medio de 75 µg/mL.

Minipreps de células transformadas

Se crecieron cinco colonias de cada transformante en 3 ml de medio LB con Ampicilina (75 µg/mL) y se incubaron por 12 horas a 37 °C con una agitación de 150 rpm. Luego se centrifugó por 45 segundos a 13.000 rpm todo el cultivo, se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µL de *buffer TEN*, resuspendiendo con vortex. Posteriormente se agregaron 50 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a cada muestra y se vortexeó por dos minutos. Se centrifugó a 9.000 rpm por 10 minutos para separar las fases y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de centrifuga. A esta fase acuosa se le adicionaron 42 µL de Acetato de Potasio 3M y 100 µL de isopropanol. Finalmente se lavó el pellet con etanol 70%, para luego secarlo y resuspenderlo en 40 µL de agua Milli-Q.

Confirmación del inserto por PCR y secuenciación del amplicón

Utilizando los *primers* de qPCR, las extracciones de ADN plasmídico y las condiciones descriptas en la tabla 4, se realizaron PCRs cualitativas para confirmar la presencia de los insertos de interés en los mismos. A continuación se describen las condiciones de amplificación.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la confirmación de las construcciones plasmídicas.

Reactivo	Volumen (µL) X1
Buffer (10X)	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
<i>Primer F*</i> (10 µM)	1,0
<i>Primer R*</i> (10 µM)	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
ADN	1,0
<i>Taq</i> ADN Pol.(5 U/µL)	0,2
Agua	16,3
DMSO (10X)	1,0
Volumen total	25,0

*Las combinaciones de *primers Forward* y *Reverse* utilizados para la amplificación de cada subtipo se describen en la tabla uno.

Ciclado:

95 °C	3'	} 40 ciclos
95 °C	30''	
55 °C	30''	
72 °C	30''	
72 °C	10'	

Posteriormente se confirmó la identidad de los amplicones por secuenciación en ambos sentidos de los mismos en la plataforma de secuenciación de MacroGen (Seúl, Corea del Sur).

Cuantificación del ADN plasmídico

Se realizó la cuantificación de cada uno de los plásmidos a través de una cuantificación fluorométrica utilizando el Fluorómetro *Qubit®* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para realizar la cuantificación previamente se trataron las muestras con 1 µL de ARNasa I (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) con la finalidad de degradar los ARNs presentes en la muestra. Se tomó 1 µL de cada muestra y se le agregaron 199 µL de reactivo para realizar la cuantificación, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El valor de número de copias de plásmido por microlitro de solución se calculó aplicando la fórmula:

$$\text{Número de copias}/\mu\text{L} = (\text{concentración (ng}/\mu\text{L}) * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{tamaño (pb)} * 1 \times 10^9 * 650)$$

Siendo 6.022×10^{23} el número de Avogadro, el tamaño corresponde al tamaño del plásmido correspondiente en pares de base, 1×10^9 un factor de conversión y 660 el peso molecular medio de cada nucleótido.

Las curvas estándares para cada una de las reacciones se construyeron con 8 puntos de diluciones seriadas 1/10 de cada plásmido (desde 10^7 a 10^0 copias genómicas por reacción de qPCR).

Screening de Bocavirus Humano y determinación de la carga viral por subtipo

Screening y cuantificación de Bocavirus Humano

El *screening* de HBoV en las muestras procesadas se realizó a través de una reacción tipo *multiplex* qPCR (Kantola y colaboradores, 2010). De esta forma, en una única reacción de amplificación se pudo detectar los cuatro subtipos virales de HBoV.

En la tabla 5 se describen tanto la mezcla utilizada para la amplificación por qPCR multiplex, como las condiciones del ciclado.

Tabla 5. Condiciones de reacción de la *multiplex* qPCR para el *screening* de HBoV.

Mezcla	Volumen (μL) X1
Master Mix 2X	12,5
HBoV 1F (10 μM)	1,5
HBoV 1R (10 μM)	1,5
HBoV 234F (10 μM)	1,5
HBoV3R (10 μM)	1,5
HBoV24R (10 μM)	1,5
Sonda (10 μM)	0,7
ADN	3,0
Agua	1,3
Volumen total	25,0

Ciclado

95 °C	10'	} 45 ciclos
95 °C	15''	
60 °C	1' }	

El ácido nucleico de las muestras negativas por *multiplex* qPCR fue diluido 1/10 y se realizó una nueva reacción para evaluar los posibles falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de las reacciones enzimáticas.

Todas las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado, con el *kit SensiMix TM II* (Bioline, Reino Unido) y el equipo *Rotor-Gene Q* (QIAGEN®, Hilden, Alemania).

Cuantificación independiente de cada subtipo

Aquellas muestras positivas por la reacción de *multiplex* qPCR fueron analizadas en *monoplex* qPCR para la cuantificación de forma independiente de cada subtipo; a excepción de los subtipos 2 y 4, ya que los *primers* utilizados no permiten su diferenciación.

En la tabla 6 se describe la mezcla utilizada para la amplificación por *monoplex* qPCR de todos los subtipos. El ciclado fue el mismo que se utilizó en la *multiplex* qPCR.

Tabla 6. Condiciones de reacción de la *monoplex* qPCR para la cuantificación de los subtipos de HBoV.

Mezcla	Volumen (μL) X1
Master Mix 2X	12,5
HBoV F* (10 μM)	1,5
HBoV R* (10 μM)	1,5
Sonda (10 μM)	0,7
ADN	3,0
Agua	5,8
Volumen total	25,0

*Las combinaciones de los *primers* para amplificar cada uno de los subtipos, así como sus secuencias y las regiones a las que están dirigidos se describe en la tabla 1.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos utilizando el *software R* (*R Core Team*, 2013). Se evaluaron las posibles asociaciones entre la presencia de HBoV y los puntos de muestreo, estacionalidad y subtipos detectados. Los análisis se realizaron utilizando el test de *Chi-cuadrado* y *p-valores* para evaluar la posible asociación entre las variables estudiadas. Este análisis se

realizó en colaboración con los docentes del Departamento de Matemática y Estadística del Litoral del CENUR Litoral Norte, Sede Salto, UdelaR.

Caracterización molecular de Bocavirus humano

Amplificación por PCR cualitativa

Todas aquellas muestras que amplificaron para algunos de los subtipos en las reacciones de qPCR, fueron sometidas a una *Nested* PCR (tamaño de amplicón, 380 pb), con el fin de obtener la secuencia nucleotídica que permitiera realizar la caracterización molecular.

Las reacciones se realizaron con juegos de *primers* diferentes, uno específico para el subtipo 1 (Iaconelli y colaboradores, 2016), y otro para el conjunto de los subtipos gastroenteríticos 2, 3 y 4 (La Rosa y colaboradores, 2015). En la tabla 2 se describen la secuencia de cada uno de los *primers*, así como la región genómica a la cual están dirigidos.

En la tabla 7 se describe la mezcla utilizada en la *Nested* PCR y su ciclado.

Cabe destacar que los dos *rounds* de amplificación utilizaron el mismo ciclado.

Tabla 7. Condiciones de la reacción de *Nested* PCR para la amplificación cualitativa de HBoV.

Mezcla	Volumen (μ L) X1
Buffer (10X)	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
<i>Primer</i> F (10 μ M)	1,0
<i>Primer</i> R (10 μ M)	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
ADN*	2,0
<i>Taq</i> ADN Pol. (5 U/ μ L)	0,2
Agua*	16,3
Volumen total	25,0

* Para el segundo round se utilizó 1 μ L de ADN y 17,3 μ L de agua.

Ciclado:		
95 °C	3'	
95 °C	30''	} 40 ciclos
50 °C	30''	
72 °C	1'	
72 °C	10'	

Observación de los resultados de las PCRs.

Todas las reacciones de amplificaciones cualitativas fueron observadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. En todos los casos se cargaron 5 µL del marcador de peso molecular *HyperLadder™ 50 bp* (Bioline®, Londres, Reino Unido) y 5 µL del producto de la PCR.

Purificación y secuenciación de los amplicones de Bocavirus humano

Aquellas muestras en las que se obtuvo el amplicón del tamaño esperado, fueron purificadas utilizando el kit de purificación *PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), de acuerdo al protocolo descrito en el ítem “Construcción de las Curvas Estándares de la qPCR para la cuantificación de Bocavirus Humano. Amplificación y purificación”.

El eluido fue almacenado a -20 °C hasta su envío a la plataforma de secuenciación de Macrogen (Seúl, Corea del Sur), la cual utilizó el secuenciador *ABI3730XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Una vez obtenidas las secuencias, las mismas fueron editadas utilizando el programa *SeqMan®* (DNASTAR Lasergene, Wisconsin, Estados Unidos).

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas en el presente estudio junto a cuatro secuencias de referencia (una de cada subtipo), descargadas de la página *web* de la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología de Estados Unidos

(NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) fueron utilizadas para el análisis filogenético. Estas secuencias fueron alineadas utilizando el programa *Muscle* (Edgar, 2004) del paquete *Mega* 6.0.6 (Tamura y colaboradores, 2013). Se determinó el modelo que mejor se ajustó a los datos utilizando el programa *J-Model test* (Guindon and Gascuel 2003; Darriba y colaboradores, 2012) y en base a los criterios de información de Akaike y Bayesiano.

La construcción del árbol filogenético se realizó con una aproximación Bayesiana utilizando el programa *Mr. Bayes* (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Se corrieron 400.000 generaciones, con una frecuencia de muestreo de 200.

Análisis de cepas recombinantes

Amplificación por Nested PCR para evaluar las estirpes recombinantes

Para realizar la evaluación de las posibles estirpes recombinantes se diseñó una nueva *Nested PCR* con *primers Forward* descritos por La Rosa y colaboradores (2015) y *primers Reverse* descritos por Kapoor y colaboradores (2010). El primer y segundo *round* amplifican un fragmento de 910 y 820 pb, respectivamente, que corresponden al extremo 5' de la región que codifica para las proteínas estructurales VP1 y VP2.

La mezcla de reacción, como las condiciones de ciclado se describen en la Tabla 8. Las secuencias de los *primers* se especifican en la Tabla 9.

Tabla 8. Condiciones de amplificación para evaluar posibles estirpes recombinantes.

Mezcla	Volumen (µL) X1 (1er Round)	Volumen (µL) X1 (2do Round)
Buffer (10X)	2,5	5,0
dNTPs (10mM)	0,5	1,0
Primer F (10 µM)	1,0	2,0
Primer R (10 µM)	1,0	2,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	3,0
ADN	2,0	2,0
Taq ADN Pol. (5 U/µL)	0,2	0,4
Agua	16,3	34,6
Volumen total	25,0	50,0

Ciclado:

95 °C	3'	} 40 ciclos (1 ^{er} Round)/ 45 ciclos (2 ^{do} Round)
95 °C	30''	
54 °C	30''	
72 °C	45''	
72 °C	10'	

Tabla 9. *Primers* utilizados para las reacciones tipo *Nested PCR* para el análisis de estirpes de HBoV recombinantes

Primer ID	Secuencia (5'-3')	Referencia	Región genómica, secuencia de referencia
HBoV 234F1(+)	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAA	La Rosa y colaboradores 2015	2975 a 2996, KJ710645
HBoV 234F2(+)	GGTGGGTGCTTCCTGGTTA		3037 a 3055, KJ710645
AK-VP-R1	TGTTCCGCCATCACAAAAGATGTG	Kapoor y colaboradores 2009	3864 a 3886, KJ710645
AK-VP-R2	CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTATGT		3834 a 3859, KJ710645

Los amplicones de interés fueron purificados y enviados a secuenciar según los protocolos descritos en el ítem "Purificación y secuenciación de los amplicones

de Bocavirus humano”. Las secuencias fueron editadas utilizando el software *SeqMan®* (DNASTAR Lasergene, Wisconsin, Estados Unidos).

Análisis Bioinformático de las estirpes recombinantes de HBoV

La primera aproximación que se realizó para caracterizar las secuencias de las posibles cepas recombinantes fue a través de la utilización de la herramienta *BLAST* (Altschul y colaboradores, 1990). Las secuencias fueron cargadas en la herramienta *on-line* y se evaluó su similitud respecto a otras secuencias de la base de datos, en base a los valores de *e-value* e *identity*.

Para confirmar el origen recombinante de las estirpes a evaluar se siguieron dos estrategias: construcción de árboles filogenéticos con secuencias *upstream* y *downstream* al posible punto de recombinación y análisis de similaridad de secuencias. Se incluyó en estos análisis la secuencia de una estirpe Rusa de HBoV ya descrita como recombinante entre los subtipos 3 y 4 (número de acceso: KJ710645, Tyumentsev y colaboradores, 2014).

Los modelos de sustitución nucleotídica para la construcción de los árboles filogenéticos fueron calculados utilizando el programa *j-Model test* (Guindon and Gascuel 2003; Darriba y colaboradores, 2012). Los árboles filogenéticos fueron contruidos utilizando el método de máxima verosimilitud, del programa *PhyML* (Guindon y colaboradores, 2010). Como medida de robustez de cada nodo, valores de *bootstrap* fueron calculados (Anisimova y Gascuel, 2006).

Los análisis de similaridad de secuencias fueron llevados a cabo utilizando el programa *Simplot*, versión 3.5.1 (Lole y colaboradores, 1999), con tamaños de ventana de 200 pb y *step sizes* de 20 pb. Los resultados obtenidos fueron confirmados utilizando el método *Bootscan/Rescan*, implementado en el programa de detección de recombinantes *RDP4* v.4.16 (Martin y colaboradores, 2015), con

un tamaño de ventana de 150 pb, un *step size* de 20 pb, y 100 réplicas de *bootstrap*. Las secuencias de los subtipos HBoV1 (GU338055), HBoV3 (FJ973562) y HBoV4 (KC461233) fueron utilizadas como secuencias parentales, ya que fueron las mismas que se utilizó para la caracterización de la estirpe recombinante Rusa (Tyumentsev y colaboradores, 2014).

Dinámica evolutiva de los Bocavirus humanos

Secuencias

La dinámica evolutiva de los HBoV fue evaluada utilizando 402 secuencias del virus. Se descargaron de la base de datos de *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) todas las secuencias de HBoV que cubrían la región que se utilizó para la caracterización molecular del virus (La Rosa y colaboradores 2015) y que tenían los datos de año y lugar de colecta. 294 secuencias correspondían a HBoV1, 51 secuencias a HBoV2, 47 secuencias a HBoV3 y siete secuencias a HBoV4. De las 402 secuencias, 29 fueron obtenidas en el marco de esta tesis, las 373 restantes fueron descargadas de la base de datos *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las secuencias analizadas se corresponden a muestras colectadas entre los años 2001 y 2017 en 23 países: Alemania, Argentina, Australia, Brasil, Bielorrusia, China, Congo, Estados Unidos, Egipto, Etiopía, Gran Bretaña, Grecia, Irlanda, Irán, Italia, Méjico, Nigeria, Rusia, Tailandia, Túnez, Taiwán, Uruguay y Vietnam.

Análisis de coalescencia

Se realizaron dos análisis de coalescencia, uno para evaluar la diseminación de los linajes de HBoV en el espacio (análisis filogeográfico), y un segundo análisis para estimar los tiempos de introducción de los subtipos virales en Uruguay.

En ambos casos se partió de la construcción de un árbol de máxima verosimilitud para confirmar la caracterización molecular de todas las secuencias. Éstas fueron alineadas utilizando el programa *Muscle* (Edgar, 2004) del paquete *Mega* 6.0.6 (Tamura y colaboradores, 2013). Se determinó el modelo que mejor se ajusta a los datos utilizando el programa *J-Model test* (Guindon and Gascuel 2003; Darriba y colaboradores, 2012) y en base a los criterios de Akaike y Bayesiano. El árbol de máxima verosimilitud fue construido utilizando el programa *PhyML* con SPR y Airt como valores de apoyo (Guindon y colaboradores, 2010). También se evaluó la estructura temporal de las secuencias a través de la utilización del programa *TempEst* (Rambaut y colaboradores, 2016).

Los análisis de coalescencia se realizaron a través de una aproximación Bayesiana, mediante cadenas de Markov utilizando la simulación Monte Carlo (MCMC) del paquete *BEAST* (Drummond y Rambaut, 2007). El 10% inicial de los datos del análisis fue descartado como “*BurnIn*”, y 4.000.000 generaciones fueron corridas para alcanzar la convergencia que fue confirmada mediante el valor de *Effective Sample Size* (*ESS* mayor a 200). Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa *Tracer* (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>).

Se determinó el árbol de mayor credibilidad (*maximum clade credibility tree-MCCT*) utilizando el programa *Tree Annotator* del paquete *BEAST* (Drummond y Rambaut, 2007). Todos los árboles fueron visualizados en el programa *Figtree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Inactivación viral con cloro

Se evaluó la inactivación de partículas virales de HBoV frente al agente Cloro, a diferentes tiempos (cero, 30 segundos, 1, 10 30 y 60 minutos).

La determinación de partículas virales íntegras se realizó a través de una técnica molecular, específicamente utilizando la qPCR que se punto a punto en este trabajo. Se intentó partir de una concentración superior a $1,0 \times 10^4$ copias genómicas por reacción, para poder seguir el decaimiento viral a través de la cuantificación del material genético luego de diferentes tiempos de exposición.

La estrategia que se desarrolló para cuantificar únicamente aquel ADN proveniente de partículas virales íntegras, fue tratar las muestras con la enzima ADNasa, de forma de poder degradar todo el ADN exógeno a la estructura del virión; para luego inactivar la enzima, realizar la extracción del material genético del virus y determinar su concentración.

Tratamiento con ADNasa

Se utilizaron 5 μL de la enzima ADNasa (1 U/ μL) (Zymo Research, California, Estados Unidos), 20 μL de buffer y 180 μL de la muestra. Las muestras fueron incubadas por cinco minutos a 37 °C e inactivadas por 10 minutos a 65 °C. Las cuantificaciones se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en el ítem “*Screening* y cuantificación de Bocavirus humano”.

Las muestras procesadas en busca de una concentración alta de HBoV consistieron en: dos muestras de agua residual proveniente de la planta de tratamiento de efluentes del Complejo Hidroeléctrico de Salto Grande, la cual recibe exclusivamente aguas residuales; 65 muestras de orina de pacientes inmunodeprimidos o con infecciones urinarias asociadas; una muestra de suspensión fecal al 10% con una alta carga (con un Ct de 18 determinado por qPCR) de HBoV, la cual fue cedida gentilmente por la Dr. Marize Miagostovich del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Oswaldo Cruz de Río

de Janeiro y finalmente una muestra de cultivo de Adenovirus Humano (virus utilizado como modelo de HBoV).

Las muestras de agua residual fueron concentradas por el método de filtración en membrana (descrito anteriormente); mientras que las muestras de orina, suspensión fecal y cultivo fueron procesadas directamente. Posteriormente se procedió a extraer el material genético directamente de acuerdo al protocolo de extracción descrito previamente. Dicho material fue diluido en un factor de 1/10 y 1/100, respectivamente, para evaluar la presencia de posibles inhibidores de las reacciones enzimáticas.

Soluciones de cloro y determinaciones de cloro libre

Las muestras de HBoV a evaluar fueron expuestas a una solución de cloro libre de 1,5 mg/L, dicha concentración de cloro es utilizada en el proceso de potabilización de agua en el Complejo Hidroeléctrico de Salto Grande.

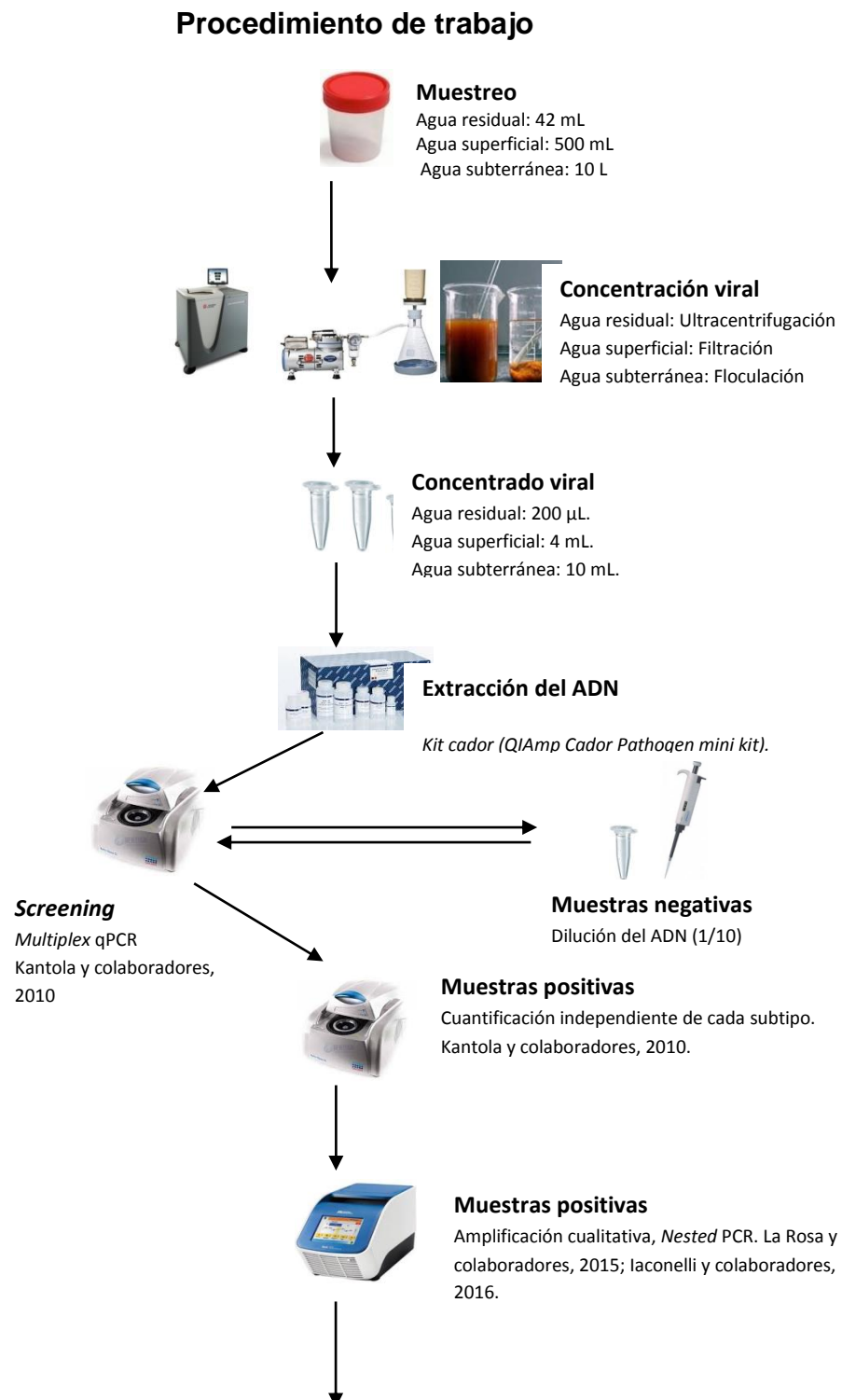
Se preparó una solución inicial agregando 8 mL de cultivo de Adenovirus a 72 mL de agua calidad HPLC y 1,14 mL de solución de cloro activo (105 mg/L) para obtener una concentración final de cloro de 1,5 mg/L.

Las determinaciones de cloro libre se realizaron en el laboratorio del Área Gestión Ambiental del Complejo Hidroeléctrico de Salto Grande utilizando una técnica espectrofotométrica y el kit de ensayo *Spectroquant* (Merck, Alemania) para determinaciones de cloro. En este método, el cloro libre presente en la muestra reacciona con dipropil-p-fenilendiamina (DPD), generando un color violeta y rojizo, el cual es determinado fotométricamente. Para las determinaciones, a 10 mL de la solución se le adicionó una microcucharada de reactivo, se lo agitó vigorosamente hasta que el reactivo se diluyó completamente, se incubó un minuto a temperatura

ambiente y luego se midió la absorbancia de la muestra en el equipo *Spectroquant prove 300* (Merck, Alemania).

Diagrama de flujo de trabajo

En la figura 4 se representa un resumen de los pasos metodológicos utilizados en el presente trabajo para la caracterización molecular, estudios de coalescencia y de recombinación de HBoV.



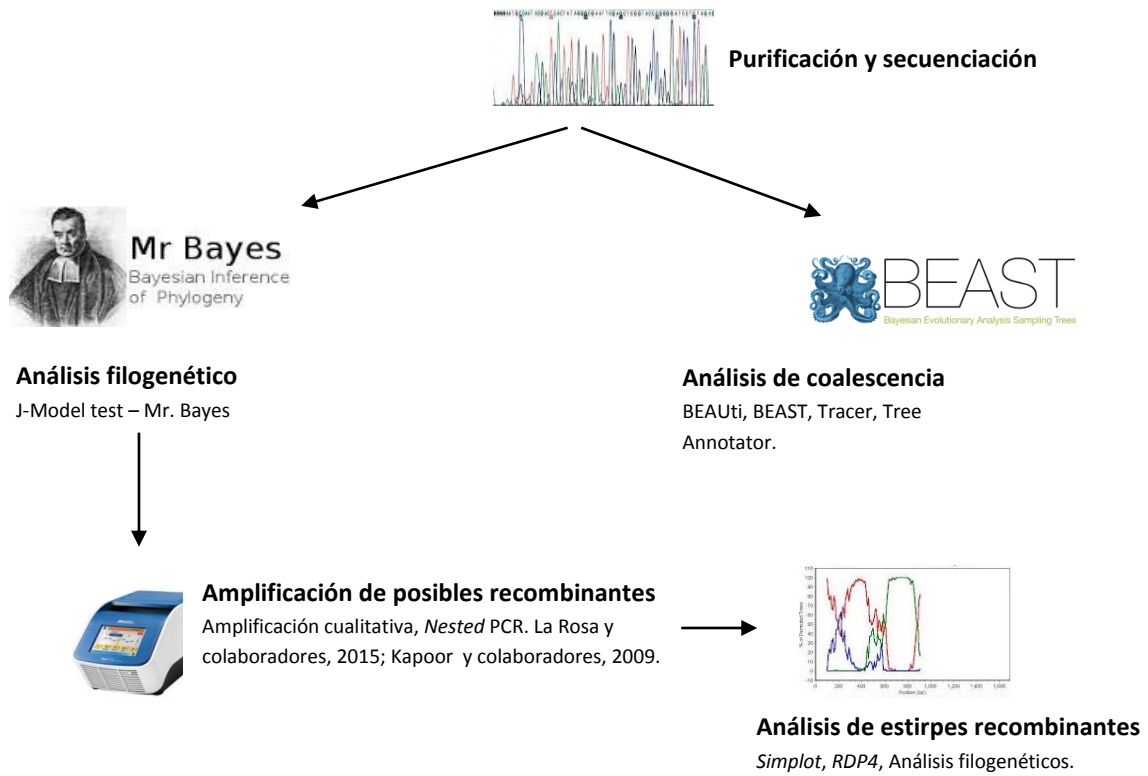


Figura 4. Resumen del procedimiento seguido para evaluar la presencia de HBV en diferentes matrices acuáticas, cuantificar cada uno de sus subtipos, realizar su análisis filogenético, análisis de coalescencia y evaluación de estirpes recombinantes.

Resultados y discusión

Puesta a punto de las PCRs cuantitativas

Construcción de las curvas estándares de cuantificación

A partir de un primer *screening* de los cuatro subtipos de HBoV realizado, utilizando una PCR cualitativa con los *primers* descritos para la qPCR, se logró amplificar para algunas muestras el producto de interés de 107 pb.

En la figura 5 se observan dichos amplicones en un gel de agarosa, cinco de éstos (PY5, subtipo 1; BU4, FB8, subtipo 2/4; PY9, BU5, subtipo 3) fueron seleccionados para continuar con su purificación y clonado.

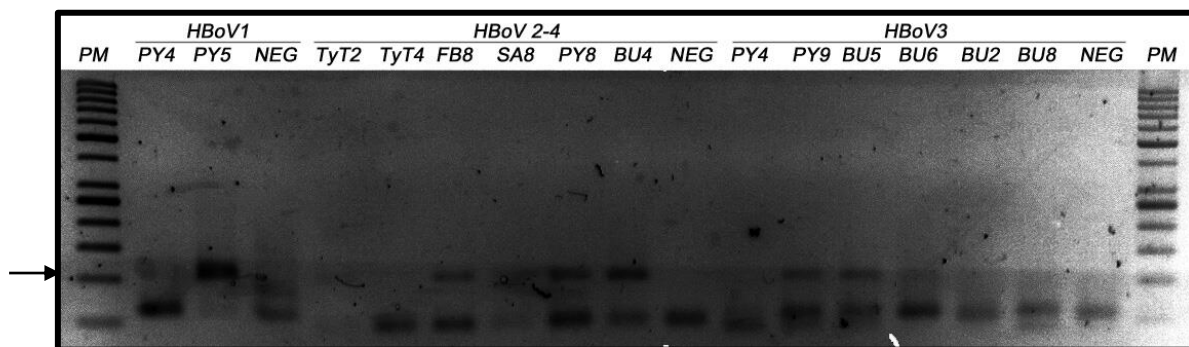


Figura 5- Amplificación por PCR cualitativa utilizando los *primers* de la qPCR. Gel de agarosa al 1,5% de la corrida electroforética donde se sembraron 5 μ L del producto amplificado y 5 μ L del marcador de peso molecular de 50 pb. La flecha indica el tamaño esperado de los amplicones (107 pb).

Luego de purificar y clonar los productos de interés, se realizó la extracción plasmídica de más de una colonia transformante para chequear la presencia de los insertos. La figura 6 muestra un gel de agarosa de la exitosa extracción de plásmidos para todas las colonias transformantes. En todos los casos se observan las tres isoformas plasmídicas.

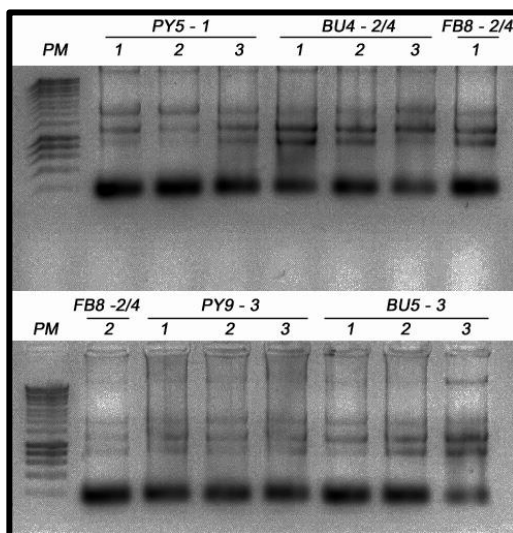


Figura 6- Extracciones plasmídicas para la construcción de las curvas estándares de cuantificación por qPCR. Gel de agarosa al 1,5%. Fueron sembrados en cada pocillo 5 μ L de extracción plasmídica o 5 μ L del marcador de peso molecular (Hyperladder 1 Kb). Parte superior: en el primer carril se cargó el marcador de PM, seguido por tres extracciones plasmídicas de diferentes colonias transformantes obtenidas con clones de amplificaciones del subtipo 1, a partir de la muestra PY5. Le siguen las extracciones obtenidas a partir de tres colonias del subtipo 2/4, de la muestra BU4. Luego se observa una colonia de la muestra FB8 (subtipo 2/4). Parte Inferior: Se sembró el PM seguido de otra colonia de la muestra FB8 (subtipo 2/4) seguido de tres colonias de las muestras PY9 y BU5 del subtipo 3, respectivamente.

Utilizando estos plásmidos como ADN molde, se realizaron reacciones de amplificación cualitativas para chequear la presencia de los insertos de interés. En todos los casos se confirmó su presencia de cada subtipo de HBoV, tanto por amplificación como por la posterior secuenciación y análisis de los amplicones correspondientes.

Se eligió una muestra de cada subtipo, las cuales fueron cuantificadas por fluorometría, utilizando el equipo *Qubit*, con los valores de concentración correspondientes y utilizando la fórmula descrita en y métodos se calcularon los números de copia por microlitro. Se obtuvieron valores de $6,6 \times 10^9$ copias genómicas/ μ L (cg/ μ L), $5,7 \times 10^9$ cg/ μ L y $9,3 \times 10^9$ cg/ μ L para los subtipos HBoV3, 2/4 y 1, respectivamente. En todos los casos se realizaron las diluciones correspondientes para obtener soluciones madres de $1,0 \times 10^9$ cg/ μ L con las cuales se realizaron diluciones seriadas en base 10 para la amplificación cuantitativa de cada subtipo y la construcción de las curvas estándares de cuantificación. En la

figura 7 se muestran las curvas de amplificación de la Monoplex qPCR para los subtipos 1, 3 y 2/4 y la multiplex qPCR, utilizando diluciones seriadas del plásmido correspondiente como ADN molde.

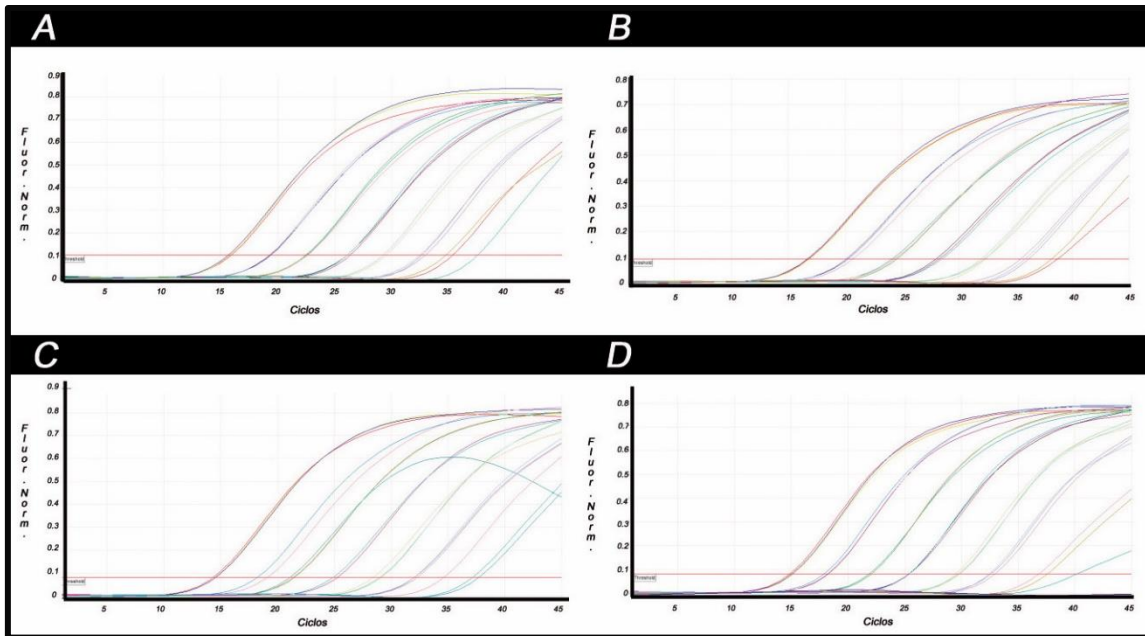


Figura 7- Curvas de cuantificación absoluta para cada uno de los subtipos por monoplex qPCR (A- HBoV1, B- HBoV 2/4, C- HBoV3) para su cuantificación independiente. D- Curva de amplificación cuantitativa para el *screening* de muestras por Multiplex qPCR (HBoV 1, 2/4, 3).

Para todos los casos se obtuvieron coeficientes de correlación (R^2) mayores a 0,994. Los valores de pendientes obtenidos fueron de -3,66, -3,21, -3,34, -3,73 y las eficiencias de reacción fueron de 0,88, 1,05, 0,99, 0,85 para la multiplex qPCR y las reacciones tipo Monoplex para HBoV1, HBoV3 y HBoV 2-4, respectivamente.

Los valores de coeficientes de correlación, pendientes y eficiencias para cada una de las curvas fueron muy similares a los descritos por Kantola y colaboradores (2010). Esta metodología nos permite obtener resultados en un rango dinámico de ocho órdenes, pudiendo detectar inclusive 10 copias genómicas por reacción, lo cual nos permite realizar un *screening* rápido de muestras con una alta sensibilidad.

Una vez puestas a punto las reacciones de qPCR y construidas las curvas estándares de cuantificación, se realizó el *screening* de las muestras y la cuantificación de cada subtipo para aguas residuales, superficiales y subterráneas.

Bocavirus humano en aguas residuales

Utilizando la multiplex qPCR, HBoV fue detectado en el 69% de las muestras de aguas residuales analizadas; es decir, de las 68 muestras procesadas, HBoV fue detectado en 47 de ellas. Los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR se muestran en la tabla 10. Los porcentajes de HBoVs positivos corresponden al total de muestras por ciudad, mientras que los porcentajes por subtipos corresponden a la cantidad de muestras positivas por ciudad. La figura 8 muestra un gráfico que resume la positividad de HBoV por ciudad.

Tabla 10. Frecuencia de HBoV y cada uno de sus subtipos detectados en las aguas residuales de Uruguay.

	HBoVs	HBoV1	HBoV2-4	HBoV3
Ciudad (n*)	Positivos (%)	Positivos (%)	Positivos (%)	Positivos (%)
Bella Unión (12)	4 (33)	0 (0)	4 (100)	2 (50)
Salto (12)	8 (67)	0 (0)	7 (88)	4 (63)
Paysandú (12)	8 (67)	2 (25)	4 (50)	4 (50)
Fray Bentos (12)	10 (83)	2 (20)	8 (80)	9 (90)
Treinta y Tres (10)	8 (80)	5 (63)	8 (100)	7 (88)
Melo (10)	9 (90)	2 (22)	8 (89)	9 (100)
Total (n = 68)	47 (69)	11 (16)	39 (57)	35 (51)

* = número de muestras colectadas en cada ciudad.

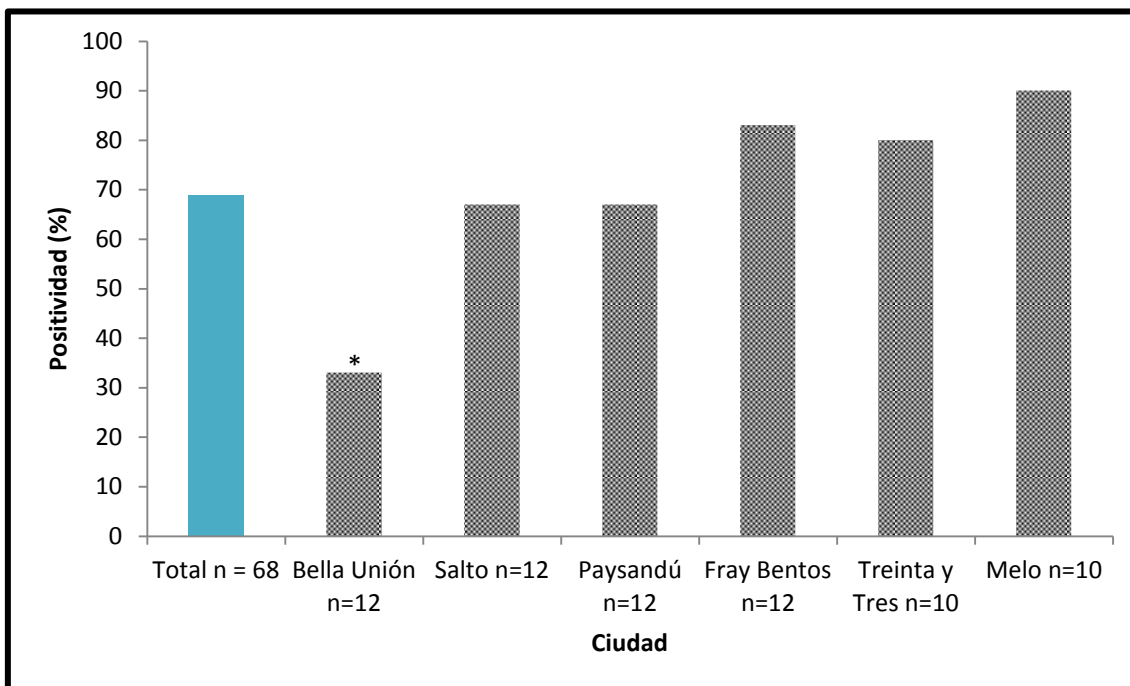


Figura 8. Positividad de HBoV para cada ciudad muestreada. El asterisco indica la ciudad que presenta un porcentaje de positivos significativamente diferente al resto de las ciudades muestreadas.

Los resultados obtenidos muestran que HBoV es excretado frecuentemente por personas infectadas por el virus, dada la alta frecuencia con que fue detectado en aguas residuales. Este resultado es acorde a lo publicado por otros autores, en otras regiones del mundo. En estos trabajos se detectó el virus con frecuencias que variaron entre un 59% y un 93% (Blinkova y colaboradores 2009; Bibby y Peccia 2013; Myrmel y colaboradores 2015; laconelli y colaboradores 2016; Hamza y colaboradores 2017).

Las muestras de aguas residuales de la región noroeste del país (Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos), ya habían sido analizadas con el fin de detectar la presencia de otros virus gastroentéricos. Los resultados evidenciaron frecuencias de positividad de 45%, 49%, 56% y 68% para Astrovirus, Rotavirus, Aichivirus y Norovirus, respectivamente (Burutarán y colaboradores 2015; Tort y colaboradores 2015; Lizasoain y colaboradores 2015; Victoria y colaboradores

2016). Si se evalúa el resultado obtenido para HBoV únicamente en estas ciudades, el virus presentó una de las frecuencias de detección más altas (63%), lo que indica una alta presencia de éste virus en personas infectadas, superior a otros virus gastroentéricos.

En todas las ciudades en que se realizó el muestreo se detectó el virus, con un rango de positividad entre 67% (Salto y Paysandú) y 90% (Melo); a excepción de la ciudad de Bella Unión, donde la positividad fue de 33% (4/12). Esta diferencia con respecto al resto de las ciudades muestreadas fue significativamente inferior ($p=0,02$). La diferencia de positividad entre la ciudad de Bella Unión con respecto a las otras ciudades muestreadas se puede deber a que las muestras en esta ciudad, fueron colectadas luego de haber recibido un tratamiento secundario, conocido como lagunaje. En este tipo de tratamientos el agua residual es depositada en lagunas y depurada con ayuda de microorganismos y plantas acuáticas, así como radiación solar. Ya se ha reportado que este tipo de tratamiento permite una disminución moderada de la carga viral, generalmente disminuyendo en menos de un orden su concentración (Verbyla y Mihelcic, 2015). De todas formas, en este estudio no se pudo determinar la eficiencia de remoción viral de este sistema de tratamiento, ya que no se analizaron muestras previas a la entrada a la planta de tratamiento de agua residual.

En lo que respecta a la detección de cada uno de los subtipos, el subtipo 2 y/o 4 fue el más prevalente. La reacción de qPCR que detectó la presencia de uno o ambos de estos subtipos fue positiva para el 58% de las muestras analizadas; seguido por HBoV3, que fue detectado en el 51% de las muestras; mientras que el subtipo respiratorio (subtipo 1) solo se encontró en el 16%. Es importante destacar que la frecuencia de positividad fue mucho mayor para los subtipos gastroentéricos

que para el subtipo respiratorio (Figura 9). Este resultado fue confirmado estadísticamente, obteniéndose un p-valor de 0,003. Este resultado está de acuerdo con la literatura donde se describe una predominancia en la detección de los subtipos gastroentéricos sobre los respiratorios cuando se evalúa su presencia en aguas residuales (Blinkova y colaboradores, 2009; Iaconelli y colaboradores, 2016; Hamza y colaboradores 2017).

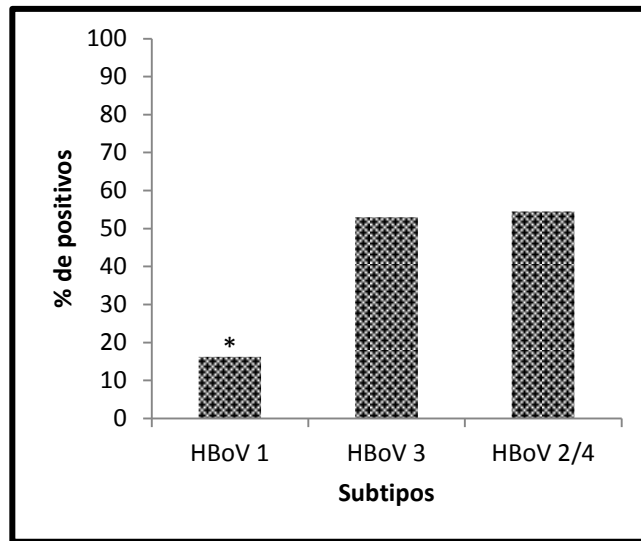


Figura 9. Porcentaje de positividad de HBoV por subtipos, detectados en aguas residuales de Uruguay. El asterisco indica el subtipo que presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Todas las muestras que resultaron negativas para HBoV luego de realizado el *screening*, fueron diluidas 1/10 para evaluar la presencia de posibles agentes inhibidores de las reacciones enzimáticas. En ningún caso se obtuvo amplificación a partir de estas diluciones, lo que indicó la ausencia de inhibición. Tal como es discutido por Girones y colaboradores (2010), si bien las técnicas moleculares tienen grandes beneficios como ser la única herramienta para detectar determinados patógenos (como lo es para el caso de HBoV), capacidad de identificar a nivel de especie o genotipo, ser métodos sensibles y rápidos; también presentan algunas desventajas como la incapacidad de evaluar la infectividad del patógeno y la posible presencia de agentes inhibidores que impidan la reacción de

polimerización. Este último punto es muy relevante, ya que las reacciones de amplificación negativas no aseguran la ausencia del agente patogénico. Al diluir las muestras estamos diluyendo los inhibidores (principalmente ácido húmico y fúlvico) y aumentando enormemente las chances de eliminar las muestras falso negativas.

En cuanto a la co-detección de más de un subtipo viral en una misma muestra, mediante la utilización de la qPCR, se observó una alta presencia de 2 o más subtipos en una misma muestra, específicamente, en el 62% de estas. En el 2% de las muestras analizadas fue observada una co-detección del subtipo 1 y 3, en el 20% se detectaron todos los subtipos (1, 3 y 2/4) y en el 40% se detectaron los subtipos gastroentéricos (3 y 2/4). Resultados similares de co-detección en aguas residuales ya habían sido descritos por otros autores (Iaconelli y colaboradores, 2016; Hamza y colaboradores, 2017) y eran esperados en este trabajo por el tipo de muestra que estamos evaluando.

En lo que respecta a la distribución temporal del virus a lo largo del muestreo, específicamente en la región noroeste, se detectó el virus a lo largo de todo el período muestreado sin ningún patrón claro de estacionalidad asociado, como se observa en la figura 10. Es decir, no se observó una asociación entre la presencia del virus y una estación del año en particular ($p=0,43$). Se observaron resultados similares para aquellas muestras colectadas en la región este del país (Melo y Treinta y Tres). Si bien ya se ha descrito un patrón característico de estacionalidad a partir de muestras clínicas, como aspirados nasofaríngeos y heces (Choi y colaboradores 2006; Nawaz y colaboradores 2012), en el presente trabajo no se observa dicho patrón. Este resultado fue confirmado estadísticamente, y es acorde a resultados presentados por otros autores utilizando también muestras de

agua residual (Hamza y colaboradores 2009; Iaconelli y colaboradores 2016; Hamza y colaboradores 2017).

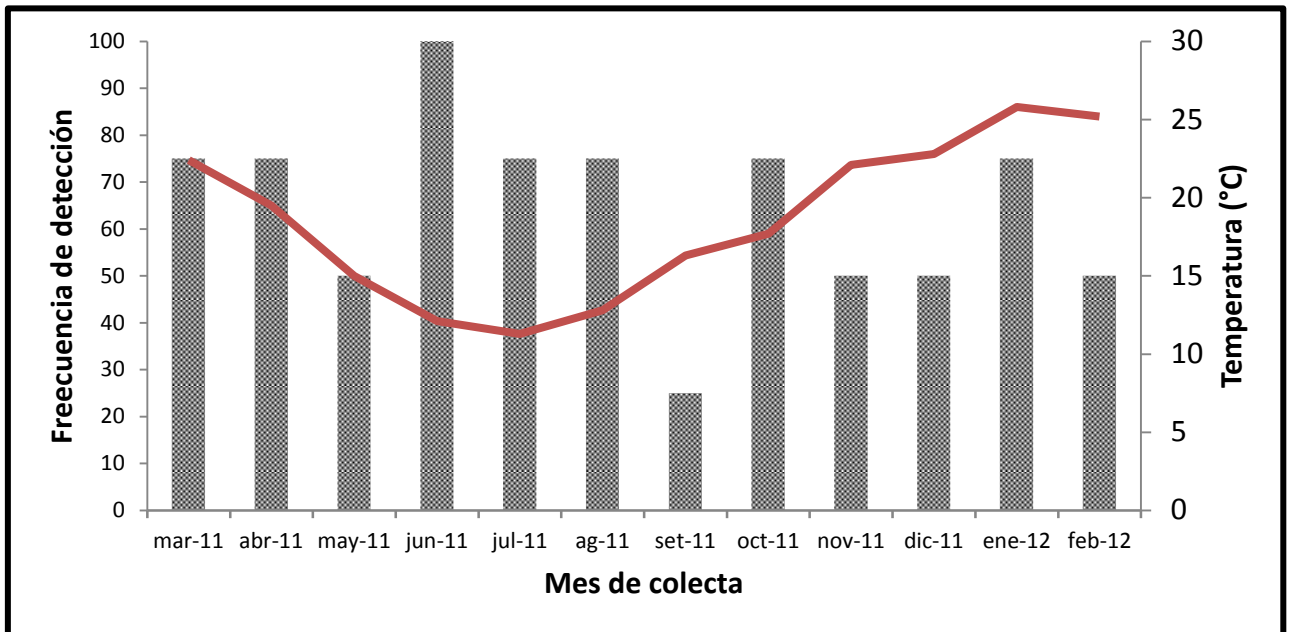


Figura 10. Frecuencia de detección de HBoV a lo largo del tiempo de colecta de las aguas residuales en Uruguay. La figura muestra la frecuencia de detección en las muestras del noroeste del país (Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos) durante el período muestreado (Marzo 2011 - Febrero 2012). En rojo se muestra la media de la temperatura ambiente a lo largo del tiempo.

Las determinaciones de la concentración viral identificaron al subtipo 1, como aquel con menor carga en las muestras analizadas, con una media de $8,2 \times 10^4$ cg/L y un rango de $1,9 \times 10^4$ cg/L a $2,2 \times 10^5$ cg/L. Las concentraciones más elevadas fueron detectadas para los subtipos gastroentéricos con valores que variaron de $4,9 \times 10^4$ cg/L a $2,5 \times 10^7$ cg/L y una media de $4,1 \times 10^6$ cg/L para HBoV3; algo más elevado aún para el subtipo 2 y/o 4, para los cuales se determinó una media de $7,8 \times 10^6$ cg/L y valores en el rango de $1,2 \times 10^5$ cg/L a $8,1 \times 10^7$ cg/L. Los valores de concentración media, mínimo y máximo para cada ciudad muestreada se resumen en la tabla 11, y la figura 11 muestra el comparativo de concentraciones para cada ciudad y para cada subtipo.

Tabla 11. Concentración de cada subtipo viral de HBoV, de acuerdo a cada ciudad muestreada y al total de muestras (expresada como copias genómicas por litro).

	HBoV-1	HBoV-2/4	HBoV-3
	Media (mínimo-máximo)	Media (mínimo-máximo)	Media (mínimo-máximo)
Bella Unión	ND*	5,44E+06 (2,91E+05 - 1,36E+07)	2,96E+05 (9,71E+04 - 4,95E+05)
Salto	ND*	8,85E+06 (1,55E+06 - 2,23E+07)	8,18E+05 (1,17E+05 - 2,04E+06)
Paysandú	4,37E+04 (1,94E+04 - 6,80E+04)	3,70E+06 (2,04E+05 - 1,36E+07)	1,03E+07 (1,75E+06 - 2,33E+07)
Fray Bentos	1,41E+05 (5,83E+04 - 2,23E+05)	8,37E+06 (4,86E+05 - 4,37E+07)	7,33E+06 (4,86E+04 - 2,53E+07)
Treinta y Tres	6,02E+04 (1,94E+04 - 1,55E+05)	1,37E+07 (1,17E+05 - 8,06E+07)	2,64E+06 (2,82E+05 - 1,17E+07)
Melo	1,17E+05 (7,77E+04 - 1,55E+05)	3,36E+06 (6,70E+05 - 8,45E+06)	1,68E+06 (6,80E+04 - 6,31E+06)
Total	8,21E+04 (1,94E+04 - 2,23E+05)	7,75E+06 (1,17E+05 - 8,06E+07)	4,13E+06 (4,86E+04 - 2,53E+07)

ND*= No detectado

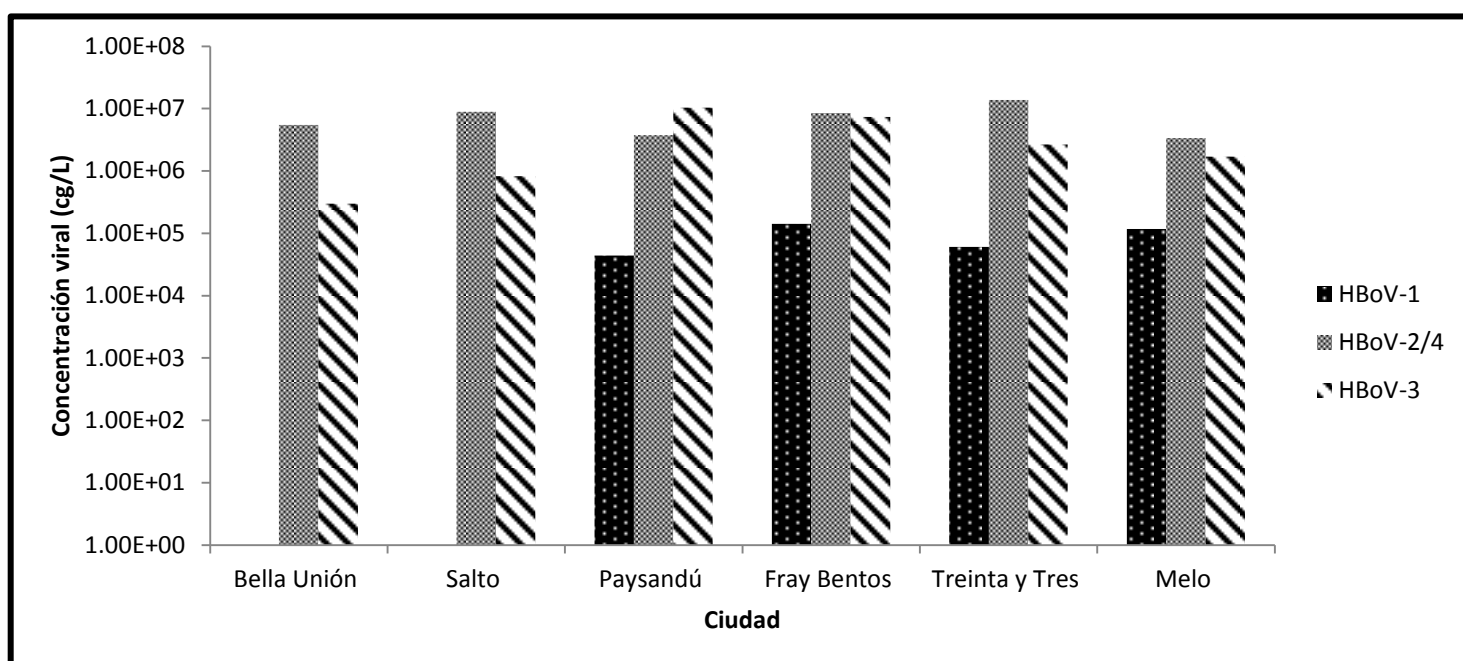


Figura 11. Carga viral de cada subtipo de HBoV para cada ciudad muestreada. El gráfico muestra la carga viral media detectada para cada uno de los subtipos en las ciudades muestreadas.

Al evaluar los resultados obtenidos para cada uno de los subtipos de HBoV, se observa que tanto la frecuencia de detección como los valores de concentración fueron mayores para HBoV3 y HBoV2/4 que para el subtipo respiratorio (HBoV1).

Éste es un resultado esperable, ya que al estar los subtipos 2, 3 y 4 asociados a infecciones gastroentéricas, se estarían replicando en el epitelio del tracto gastrointestinal, mientras que el subtipo 1 lo hace en el tejido respiratorio. Esto explicaría las diferencias tanto en frecuencia como en concentración. Por otra parte, se ha descrito para otros virus respiratorios el hecho de que puedan replicarse en este tejido y luego pasar al tracto gastrointestinal junto a secreciones nasofaríngeas. Esto permite detectarlos tanto en materia fecal como en aguas residuales, pero con títulos menores a los descritos en muestras del tejido respiratorio, como hisopados nasales (Proenca-Modena y colaboradores 2013).

Hasta el momento hay escasa información en lo que respecta a determinaciones de concentración de HBoV en muestras de agua residual alrededor del mundo, únicamente tres trabajos cuantificaron los HBoV en aguas residuales (Myrmel y colaboradores 2015; laconelli y colaboradores 2016; Hamza y colaboradores 2017). En el presente trabajo se han obtenido valores de concentración de un orden mayor para HBoV1 y dos órdenes mayor para los subtipos gastroentéricos con respecto a estos trabajos previos. Dichas diferencias de concentración se podrían explicar en base a que no se han utilizado los mismos métodos tanto para las concentraciones virales como para las determinaciones por qPCR. Como ya se ha descrito por otros autores (Girones y colaboradores, 2010), estas diferencias técnicas podrían llevar a diferencias en los resultados. Además cabe destacar que los valores de concentración detectados corresponden a valores puntuales, los cuales pueden fluctuar a lo largo del tiempo.

A pesar de que una transmisión a partir del consumo de agua contaminada no ha sido probada para HBoV, su elevada frecuencia de detección y los altos valores de concentración detectados en aguas resiuales sugieren que esta vía de

transmisión debería ser considerada. Estudios previos realizados a partir de las mismas muestras para la detección y cuantificación de otros virus gastroentéricos (Rotavirus y Norovirus) han detectado valores similares de concentración (Victoria y colaboradores 2014). Para estos virus ya se ha confirmado la posibilidad de transmisión a través de aguas contaminadas (Martinelli y colaboradores, 2007; . Maunula y colaboradores, 2005).

Bocavirus humano en aguas superficiales

HBoV se detectó únicamente en una muestra de las 36 analizadas para agua superficial (agua de río), es decir un 3%. La muestra positiva correspondió a una muestra del río Santa Lucía, aguas abajo a la ciudad de Florida. Dicha muestra amplificó en la reacción de qPCR específica para el subtipo 3 y se detectó a una concentración de $2,7 \times 10^4$ cg/L.

El resultado obtenido para esta matriz, muestra que su detección fue considerablemente menor respecto a su detección en aguas residuales (3% en aguas superficiales vs. 69% en aguas residuales), así como a otros trabajos que detectaron su presencia en la misma matriz. Dos estudios (Hamza y colaboradores 2009; La Rosa y colaboradores 2017) describen la presencia del virus en aguas superficiales con frecuencias que rondan el 40%. El hecho de haber detectado a HBoV en una baja proporción podría tener más de una explicación, entre ellas se destacan: el volumen de agua colectada, la densidad poblacional de las regiones donde se realizaron las colectas y la presencia en estas regiones de plantas de tratamiento de aguas residuales.

En lo que respecta al volumen de agua superficial utilizada, en el presente trabajo se partió de medio litro de muestra; mientras que en las publicaciones de Hamza y colaboradores (2017) y La Rosa y colaboradores (2017) se parte de 10 L

de agua, aumentando así la probabilidad de detección viral. En cuanto a la densidad poblacional de las regiones en donde se colectaron las muestras, en el presente trabajo se realizó la colecta aguas abajo de ciudades que no superan los 104.000 habitantes, mientras que en los trabajos previos se realizó la colecta próximo a ciudades que superan el millón de habitantes. Como tercera explicación a esta diferencia de valores en la positividad del virus, se podría tener en cuenta que la ciudad de Florida, localizada aguas arriba del punto de colecta en el Río Santa Lucía cuenta con una planta de tratamiento para aguas residuales, lo que explicaría la baja detección del virus en estas muestras; no así para las muestras colectadas aguas abajo de la ciudad de Salto, que hasta el momento de las colectas, no contaba con una planta de tratamiento de agua residual.

Bocavirus humano en aguas subterráneas

No se detectó la presencia de ninguno de los subtipos de HBoV en las muestras de agua subterránea analizadas. Este es el primer estudio en el mundo donde se analizó la presencia de HBoV en agua subterránea, por lo que no existen datos para contrastarlos con los obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, si se considera el hecho de que otros virus gastroentéricos si han sido detectados en las mismas muestras analizadas de aguas subterráneas (Gamazo y colaboradores 2018), la ausencia de HBoV y presencia de otros virus entéricos indicaría la imposibilidad de utilizar a HBoV como marcador de contaminación fecal humana.

Caracterización molecular de los Bocavirus humano

De las 11 muestras que amplificaron para el subtipo respiratorio en la PCR cualitativa, se logró obtener la secuencia para seis de ellas (54%); mientras que de las 47 muestras que amplificaron para los subtipos gastroentéricos, se logró obtener la secuencia de 32 muestras (68%). Esto lleva a concluir que se trata de

valores acordes a las determinaciones cuantitativas del virus, ya que se espera que a menor concentración viral en la muestra, menor sea la probabilidad de amplificarlo utilizando una PCR cualitativa (Saavedra y colaboradores, 2012).

El subtipo más frecuente confirmado por análisis filogenético fue HBoV3, 12 secuencias correspondían a este subtipo (32%); seguido por HBoV2 con 11 secuencias (29%); HBoV1 con seis secuencias (16%) y HBoV4 siendo el de menor presencia con 2 secuencias (5%). La figura 12 muestra el árbol filogenético obtenido a partir de un análisis del tipo Bayesiano.

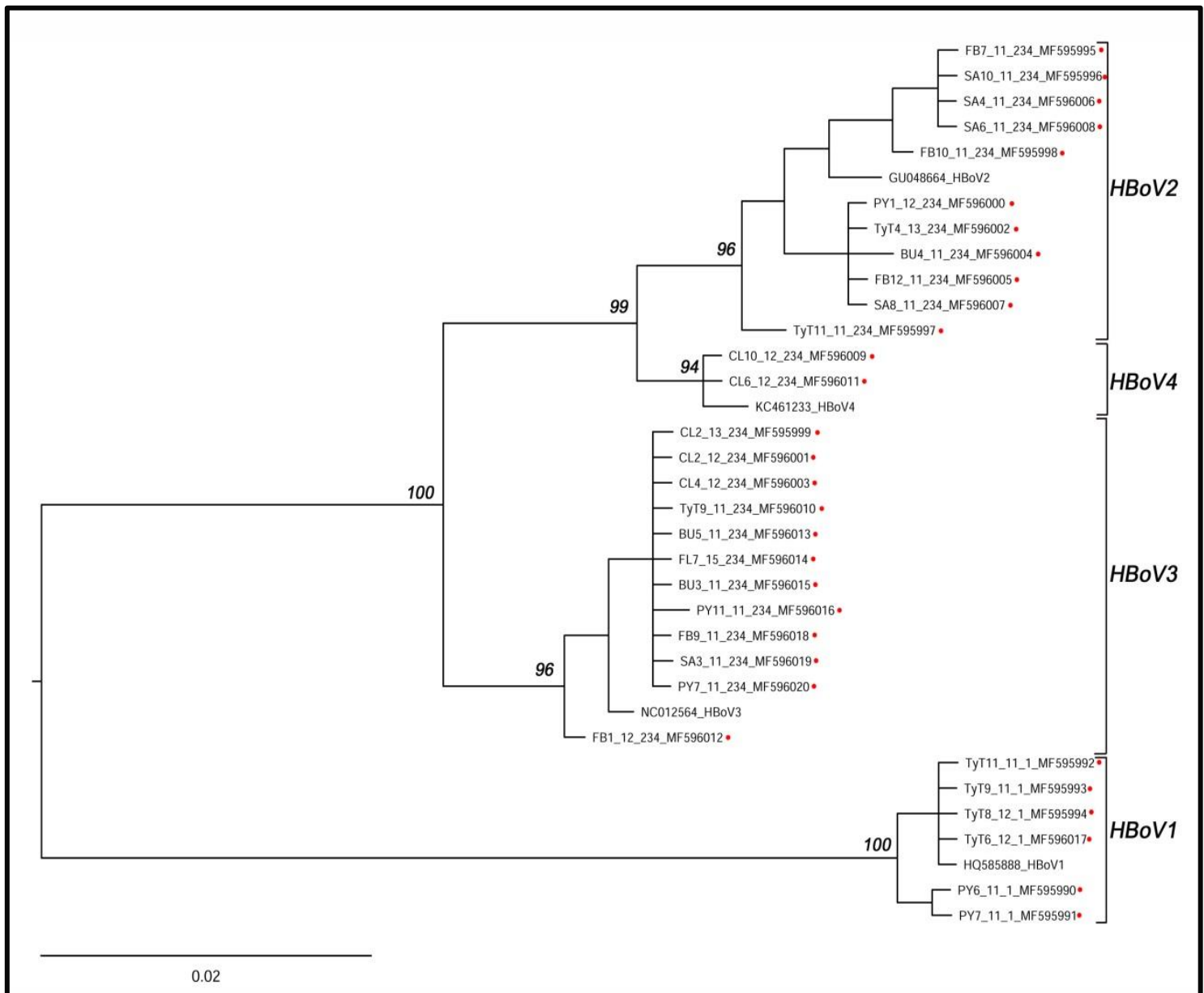


Figura 12. Árbol filogenético construido a partir de secuencias de HBoV de la región que codifica para el gen VP1, de muestras de agua residual y superficial. El análisis se realizó a través de metodología Bayesiana, utilizando el programa Mr. Bayes. El modelo que mejor se ajustó a los datos fue HKY con distribución Gamma. Las cepas de referencia se muestran con su correspondiente número de acceso de NCBI y el subtipo al cual corresponden. Las cepas uruguayas se identifican de la siguiente forma: código de ciudad, mes y año de colecta, *primers* utilizados para su amplificación, número de acceso de NCBI, seguidos de un círculo rojo. BU: Bella Unión, SA: Salto, PY: Paysandú, FB: Fray Bentos, TyT: Treinta y Tres, CL: Cerro Largo (Melo) y FL: Florida. Se muestran valores de posterior superiores a 90%.

El hecho de que no se hayan podido obtener las secuencias para 20 muestras positivas por qPCR, se podría deber a la diferencia de sensibilidad de la qPCR con respecto a la PCR cualitativa (Saavedra y colaboradores, 2012). De todas formas, no se han realizado estudios que evalúen la diferencia de sensibilidad entre qPCR y *Nested* PCR para HBoV.

El resultado del análisis filogenético confirmó que la mayoría de las muestras positivas para HBoV 2 y/o 4 por qPCR, correspondían al subtipo 2; únicamente dos secuencias correspondieron al subtipo 4. Este resultado es acorde a lo descrito por varios estudios, confirmando que el subtipo 4 es el que presenta menor frecuencia, tanto en muestras clínicas como ambientales (Kapoor y colaboradores 2010; Kantola y colaboradores 2011, Myrmel y colaboradores 2015; Iaconelli y colaboradores 2016; Hamza y colaboradores 2017).

Estirpes de Bocavirus humano recombinantes

De las 32 secuencias amplificadas para los subtipo gastroentéricos (subtipos 2, 3 y 4), siete no agruparon con ninguno de los subtipos de HBoV descritos, como se muestra en la figura 13.

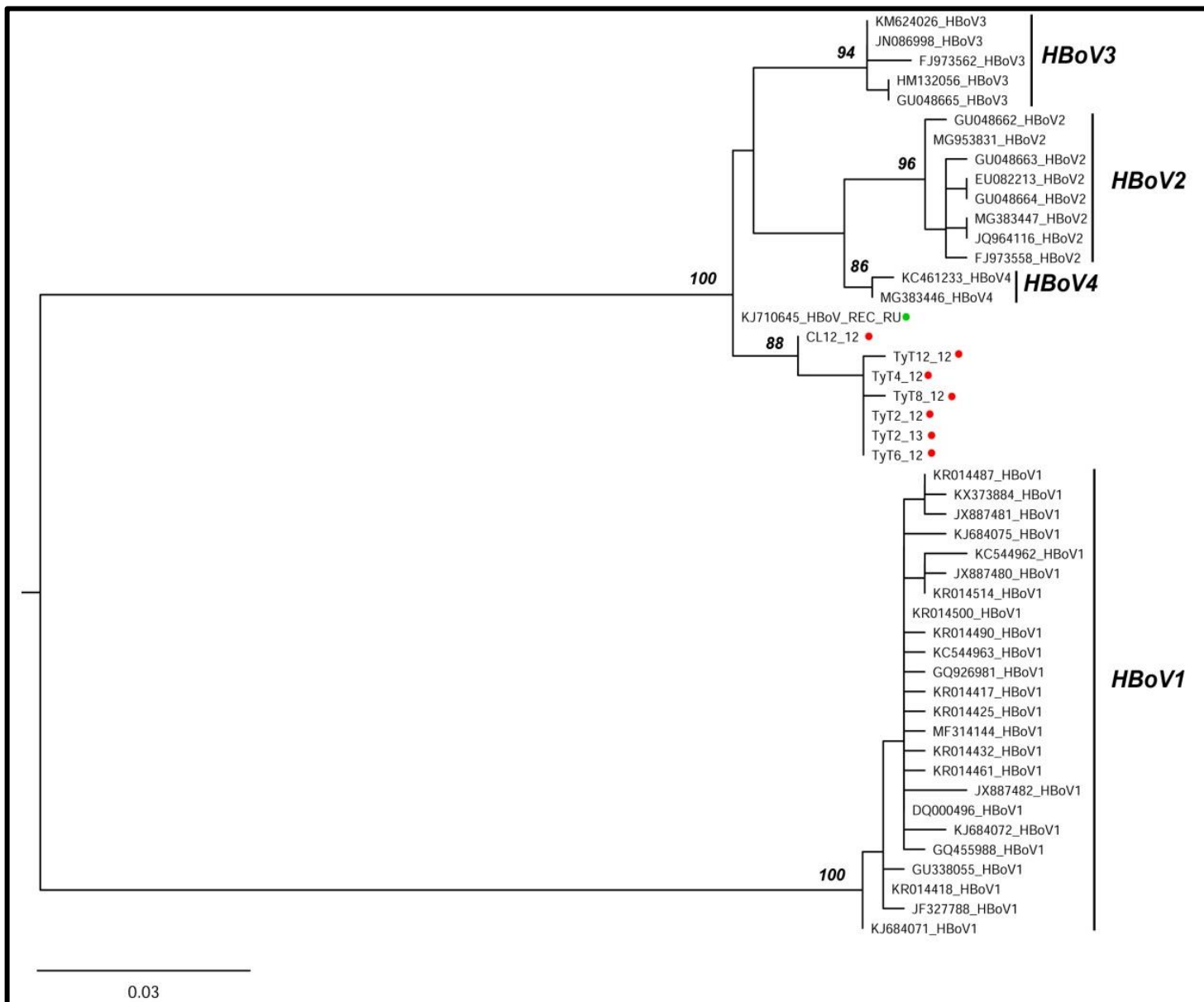


Figura. 13. Árbol filogenético de las posibles estirpes recombinantes. Árbol de máxima verosimilitud construido utilizando un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína VP1, amplificado con los *primers* descritos por La Rosa y colaboradores (2015). Las secuencias uruguayas que no agruparon con ninguno de los subtipos ya descritos se indican con un círculo rojo, mientras que con un círculo verde se indica una secuencia de HBoV de origen ruso ya descrita como recombinante. Valores de *Bootstrap* mayores a 80% se muestran en cada nodo.

Los análisis de recombinación se realizaron para tres de las siete secuencias a evaluar, ya que tanto las muestras como el ADN de las 4 cepas restantes debieron ser descartadas cumpliendo con los requerimientos del Ministerio de Salud Pública, bajo la directiva de la Organización Mundial de la Salud, la cual indica la destrucción total de las muestras de aguas residuales y de materia fecal colectadas antes de Diciembre de 2012.

Las tres secuencias fueron evaluadas a través de los análisis de recombinación descritos en la sección anterior, confirmando a través de algunos de estos análisis (*Blast*, *Simplot* y *Bootscan*) su origen recombinante. Sin embargo, los análisis basados en la construcción de árboles filogenéticos de la región 5' y 3' al punto de recombinación, no permitieron confirmar estos resultados. Esta ausencia de confirmación probablemente se debe a la corta longitud de la secuencia analizada. Debido a esto, se decidió poner a punto una nueva Nested PCR, la cual combina los *primers Forward* descritos por La Rosa y colaboradores (2015), con los *primers Reverse* descritos por Kantola y colaboradores (2010) los cuales están dirigidos hacia el extremo 3', lo que nos permitió tener fragmentos de secuencia más largos.

Las tres muestras mostraron un 100% de identidad nucleotídica. Para comprobar su origen recombinante, la primera evaluación que se realizó fue a través de la herramienta *BLAST* de *NCBI*. Las secuencias presentaron un alto porcentaje de identidad (*e-value*: 0,0; *Identity*: 99,0) con la secuencia rusa presente en el árbol filogenético de la figura 13 (número de acceso en el *Genbank*: KJ710645), ya descrita en el año 2011 como recombinante entre los subtipo 3 y 4 (Tyumentsev y colaboradores, 2014).

Para verificar estos resultados, dos árboles filogenéticos de máxima verosimilitud fueron inferidos, con secuencias *upstream* y *downstream* al punto de recombinación descrito para la secuencia Rusa, tal como se observa en la figura 14a y 14b, respectivamente.

En el árbol construido con las secuencias *upstream* al punto de recombinación, las secuencias evaluadas forman un grupo con aquellas secuencias correspondientes al subtipo 3. Mientras que en el árbol inferido con las

secuencias *downstream* al punto de recombinación, las secuencias evaluadas se agrupan en un clado monofilético con aquellas pertenecientes al subtipo 4.

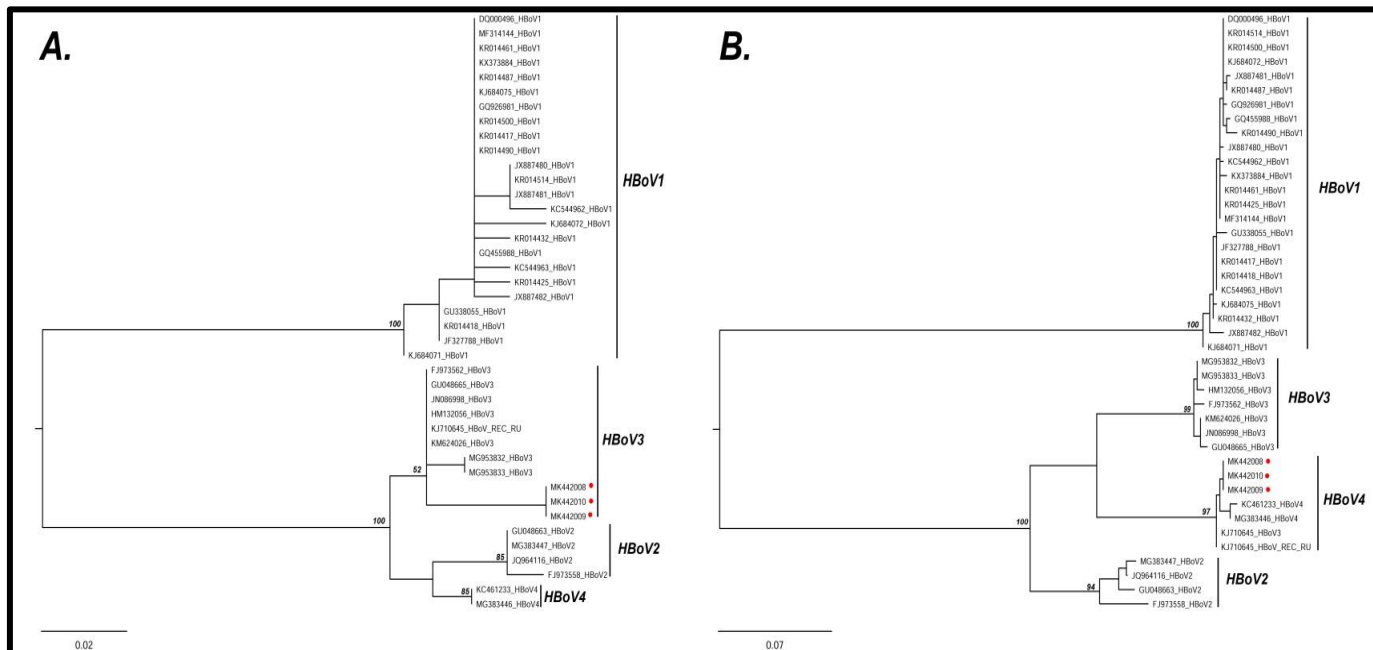


Fig. 14. Árboles de Máxima verosimilitud construidos con secuencias *upstream* y *downstream* al punto de recombinación de HBoV. Los resultados obtenidos utilizando la región de VP1 *upstream* y *downstream* al punto de recombinación se muestran en la figura A y B, respectivamente. Las tres secuencias uruguayas evaluadas (MK442008, MK442009 y MK442010) se indican con un círculo rojo. Valores de *Bootstrap* se indican en los nodos.

Estos resultados fueron confirmados a través del análisis de similitud de secuencias, realizado con una de las secuencias posibles recombinantes utilizando los programas *Simplot* y *Bootscan* (Figura 15), el cual arrojó evidencia de que efectivamente las secuencias corresponden a estirpes recombinantes de HBoV entre los subtipos 3 y 4.

El punto de recombinación se estimó próximo al nucleótido 200 de la secuencia analizada, con un valor de *cutoff* del 70%. Dicho punto de recombinación se correspondería a la posición 3250 del genoma descrito como recombinante entre los subtipos 3 y 4 de HBoV (número de acceso en el *Genbank*: KJ710645); es decir, se localiza en el comienzo de la región que codifica para la proteína VP1.

Esta región del genoma ha sido descrita como un punto caliente de recombinación en otros Parvovirus tales como *Porcine Parvovirus* (Lefeuvre y colaboradores, 2009; Leal y colaboradores, 2012). El patrón de recombinación sugiere que el extremo 5' de la región evaluada de VP1, corresponde al subtipo 3 de HBoV; mientras que el extremo 3', posterior al punto de recombinación, corresponde al subtipo 4 (Figura 15).

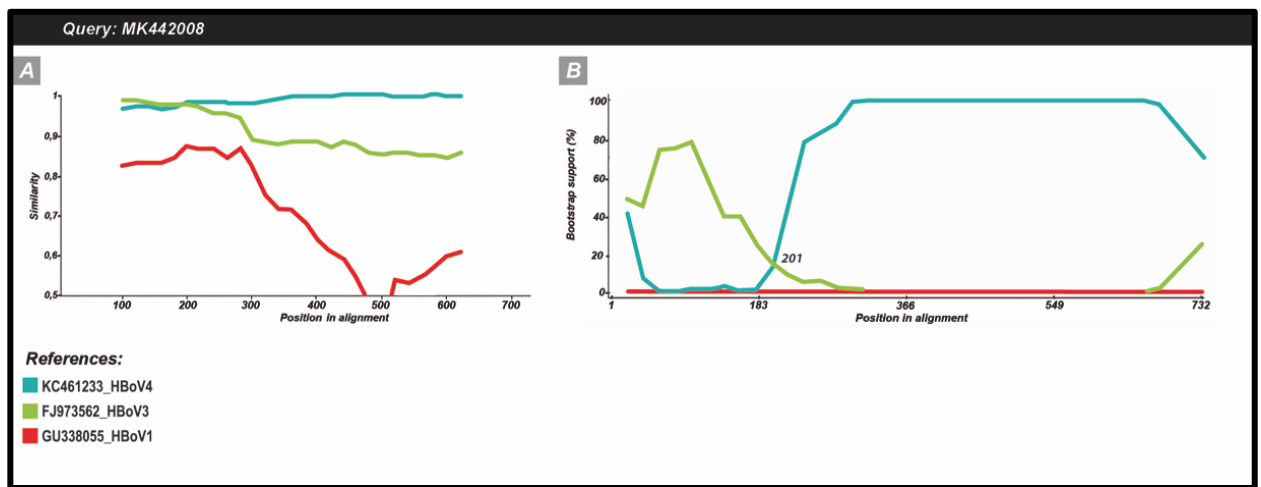


Figura. 15. Análisis de similitud de secuencia realizado para las estirpes de posibles HBoV recombinantes detectadas en el presente estudio. Análisis de *Simplot* (A) y *Bootscan* (B) de la secuencia MK442008. En el análisis de similaridad (*Simplot*), el eje y representa el porcentaje de identidad por ventana analizada, para la secuencia estudiada, con las estirpes de referencia de HBoV. El análisis de *Bootscan* representa el porcentaje (valor de *bootstrap*) al que cada secuencia de referencia cosegrega filogenéticamente, en la ventana analizada, con la secuencia estudiada. Las secuencias de referencia de HBoV se representan en la figura con un código de colores.

En base a los análisis filogenéticos realizados, se observa que se detectaron siete posibles secuencias recombinantes, tres de las cuales fueron confirmadas como recombinantes entre los subtipos 3 y 4, siendo el fragmento que codifica para las proteínas de la cápside el correspondiente al subtipo 4. En este mismo muestreo se detectaron únicamente 2 secuencias correspondientes al subtipo 4; lo que podría confirmar una posible ventaja de las cepas recombinantes, con respecto a las cepas parentales del subtipo 4, en cuanto a la capacidad para infectar a su

hospedero, ya que se encontraron más cepas recombinantes que cepas de este subtipo.

Análisis Filogeográfico de Bocavirus humano

A partir de las 402 secuencias de HBoV descargadas de la base de datos del *NCBI*, se realizó un primer análisis filogenético para confirmar la caracterización molecular de cada subtipo de HBoV. Para el análisis de coalescencia se descartaron 11 secuencias de las 402 descargadas, ya que no agruparon con los clados de los subtipos ya descritos y podrían ser estirpes recombinantes. Se continuó el análisis con 391 secuencias de HBoV, a las que se les calculó el modelo de sustitución nucleotídica (HKY + G) y se construyó un nuevo árbol de máxima verosimilitud, el cual fue utilizado para evaluar si los datos presentaban una estructura temporal, que es una condición necesaria para realizar un análisis de coalescencia.

Tal como se puede ver en la figura 16, si bien en los datos existe una asociación positiva entre la divergencia genética y el tiempo de muestreo (pendiente positiva), la señal es difusa (valor de regresión lineal demasiado pequeño, $5,9 \times 10^{-4}$). Es por esto que se decidió realizar los análisis de coalescencia, brindándoles un valor de *prior* para la tasa de sustitución nucleotídica. Se utilizó el valor de tasa publicado por Zehender ($8,6 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año) y colaboradores (2010), valor que se calculó también a partir de un fragmento de la secuencia de VP1, pero con un mayor largo de secuencia.

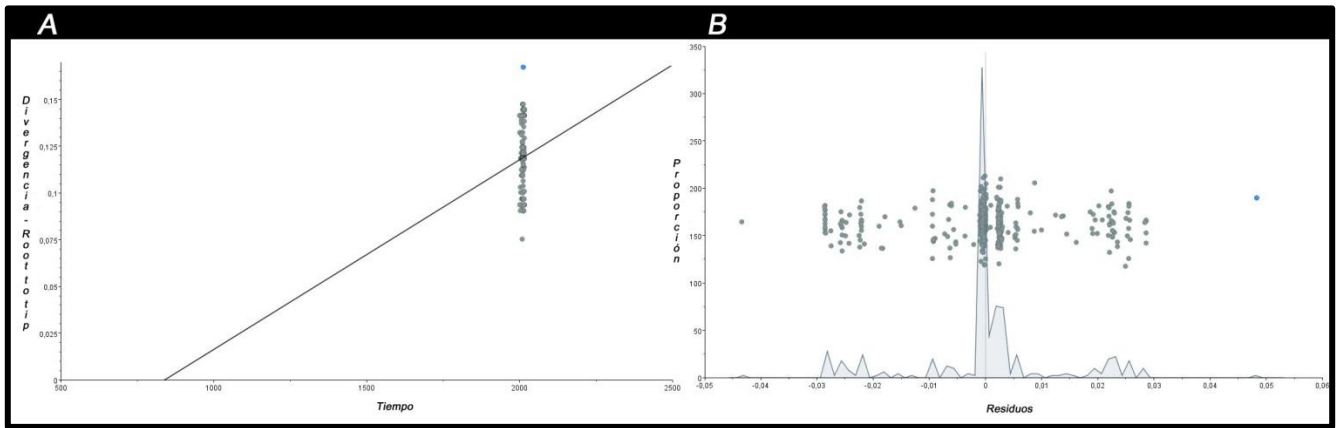


Figura 16. Análisis de la estructura temporal. A la izquierda se muestra el gráfico *root to tip* correspondiente al análisis de estructura temporal de las 391 secuencias analizadas. A la derecha se muestra el gráfico de residuos de las mismas secuencias. El análisis fue realizado en el programa *Tempest*.

Se trabajó con un reloj estricto, al igual que en el trabajo publicado por Zehender y colaboradores (2010), ya que se realizó una primera corrida con un reloj relajado pero la misma no llegó a la convergencia.

El árbol filogeográfico obtenido se muestra en la figura 17.

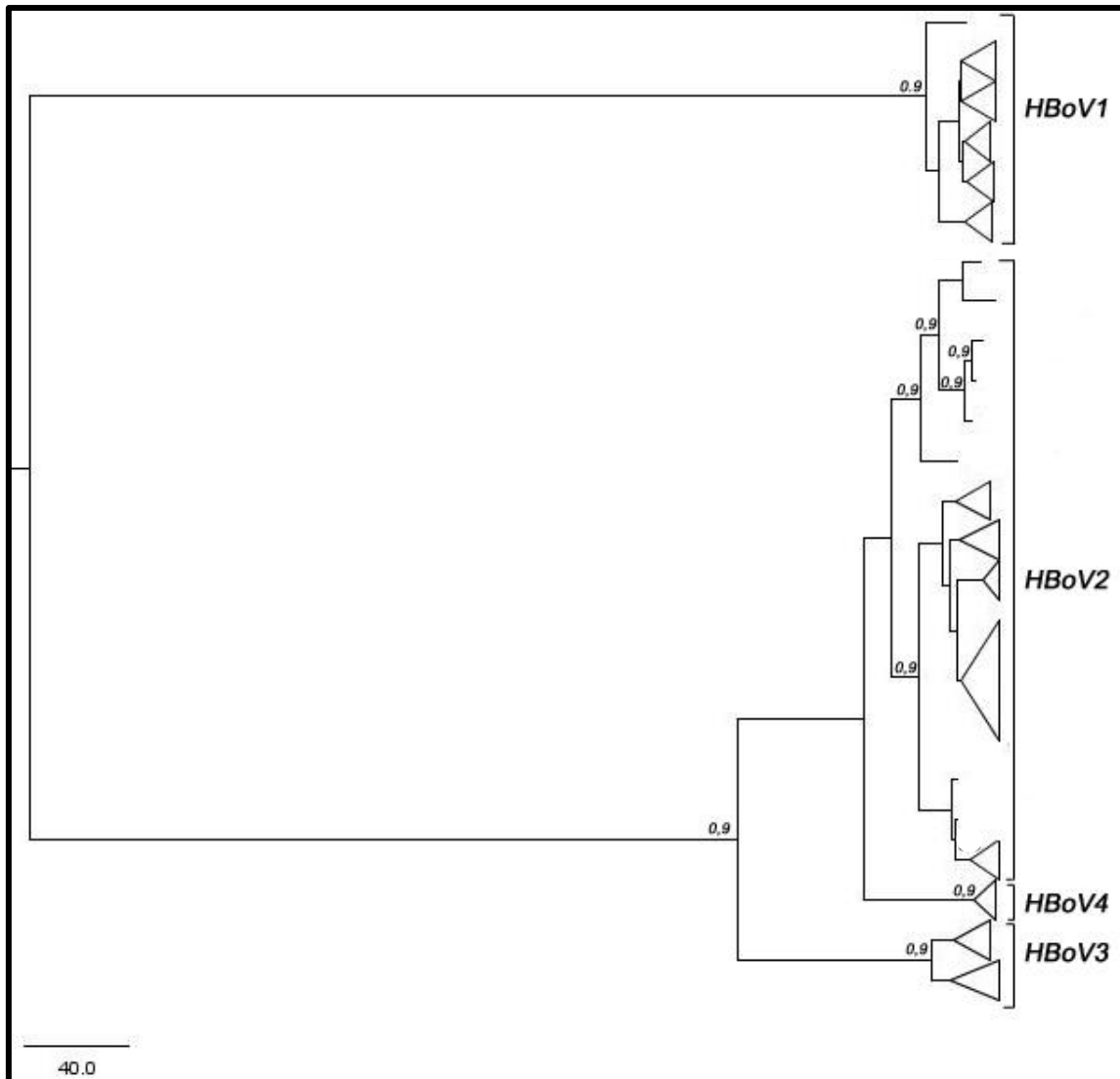


Figura 17. Árbol filogeográfico de HBoV. Árbol filogeográfico de HBoV construido a partir de un análisis de coalescencia. Las 391 secuencias utilizadas corresponden a un fragmento de 380 pb del gen que codifica para la proteína VP1. Se muestran únicamente los valores de soporte superiores a 0,9.

Como se puede observar en la figura 17, en el árbol filogeográfico se obtuvieron valores de *posterior* que son superiores a 0,9 solo para los nodos que definen los subtipos 1, 3 y 4, y para alguno de los dos nodos internos en el subtipo 2. Es decir, no encontramos nodos con apoyo estadístico dentro de cada clado (a excepción de algunos dentro del subtipo 2), por lo que no se pudo inferir relaciones filogeográficas para HBoV.

La falta de apoyo en los nodos probablemente se deba al hecho de que no existe información filogenética suficiente en las secuencias utilizadas. Por este motivo no se pudo determinar las relaciones filogeográficas de cada uno de los clados, con valores estadísticos significativos. Para la determinación de las relaciones filogeográficas dentro de cada uno de los clados, se deberá trabajar con secuencias con mayor información filogenética, secuencias que codifican para las proteínas estructurales pero de un mayor tamaño.

Estimación de tiempos de introducción del Bocavirus humano en Uruguay

A partir de la construcción de un nuevo árbol filogenético utilizando el mismo valor de prior para la tasa de sustitución nucleotídica que la utilizada en el análisis filogeográfico, y agregando secuencias de ChBoV (KT223502) y GoBoV (HM145750 y NC014358) para darle un mayor apoyo a los resultados obtenidos, se evaluó el patrón de dispersión temporal de las diferentes estirpes de HBoV en Uruguay.

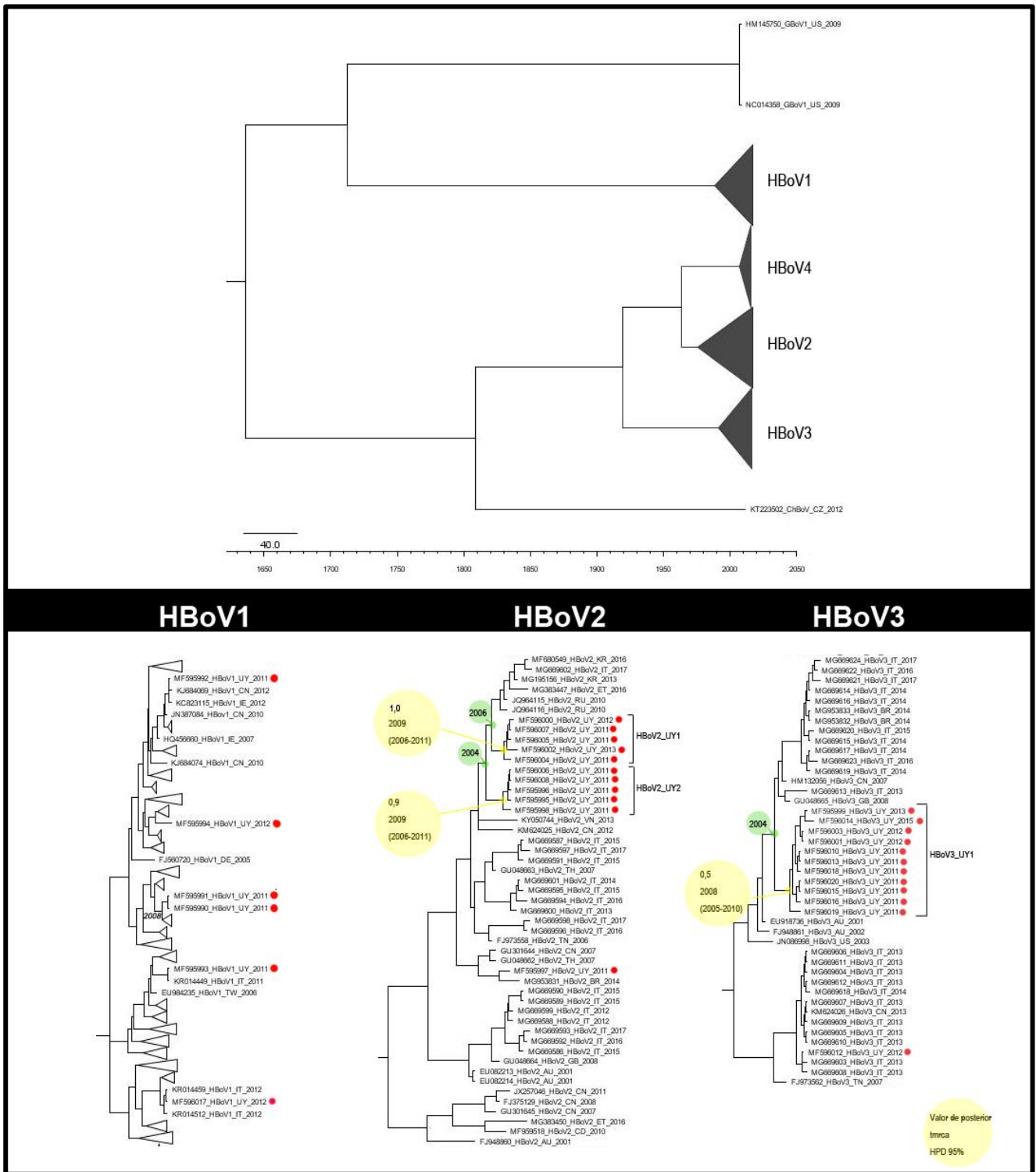


Figura. 18. Introducción de HBoV en Uruguay. En la parte superior se muestra el árbol MCC (*Maximum Clade Credibility*) construido a través de un análisis de coalescencia. En la parte inferior se muestran únicamente los clados de los subtipos 1, 2 y 3. Con un círculo rojo se muestran las secuencias uruguayas de HBoV. Entre corchetes se observan todas las secuencias que lograron dispersarse en el país a partir de un único ingreso. En verde se muestran los años correspondientes a los nodos de las introducciones. En amarillo se muestran los valores de posterior, tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA) y *high posterior density* del 95% (HPD 95%) para los clados de cepas uruguayas que lograron dispersarse.

Como se puede ver en la figura 18, para el subtipo 1, las secuencias Uruguayas se ubican dispersas entre las secuencias de los diferentes países que

conforman el clado, pero no existen valores de apoyo estadístico significativos que permitan la identificación de la cantidad de introducciones, por lo que tampoco es posible inferir los tiempos de las mismas.

Para el subtipo 2, vemos que se dieron tres introducciones independientes, donde dos de ellas lograron dispersarse en el país. La introducción que dio lugar a HBoV2_UY1 (posterior 1.0, tmrca: 2009 (2006-2011)) tuvo lugar entre el año 2006 y el 2009. Como se observa en la figura 18, este clado estuvo diseminándose en nuestro país al menos entre los años 2011 y 2013.

La introducción que dio lugar a HBoV2_UY2 (posterior 0.9, tmrca: 2009 (2006-2011)) ocurrió entre los años 2004 y 2009 y comprende únicamente secuencias aisladas en el año 2011.

Por lo anterior, es interesante resaltar que en el año 2011 se encontraban circulando al menos dos linajes del subtipo 2 en Uruguay.

Para el subtipo 3 se observan dos introducciones independientes en Uruguay; una de éstas dio lugar a una dispersión local (HBoV3_UY1), habiendo ingresado al país entre los años 2004 y 2008. Sin embargo el valor de posterior para HBoV3_UY1 es relativamente bajo (0,5) por lo que este resultado no tiene sustento estadístico.

En base a lo observado, cabe destacar que a excepción de los resultados obtenidos para el subtipo 2, el resto de los resultados deben ser analizados con cautela debido a que no se obtienen valores de soporte suficientemente elevados. Dichos resultados fueron obtenidos a partir del análisis de una secuencia nucleotídica pequeña. Futuros estudios con una región genómica más grande podrán confirmar o refutar las introducciones descritas de HBoV en Uruguay.

Evaluación de inactivación viral por cloro

Dado que los HBoV presentes en las muestras de agua residual no poseían una concentración viral elevada, ya que en todos los casos fue menor a $1,0 \times 10^4$ cg/reacción; se recurrió a la búsqueda de HBoV en otras muestras.

Tanto las muestras de agua residual colectadas en la planta de tratamiento de Salto Grande, así como las muestras de orina, resultaron negativas para HBoV. No hubo amplificación en ninguna de las reacciones (tanto aquellas que se partió del ácido nucleico puro como en el diluído 1:10). En el caso de las muestras de orina, para confirmar la ausencia de agentes inhibidores, al ADN extraído de cada una de estas muestras, se le agregó ADN de una muestra positiva (de agua residual) y se volvió a amplificar. Estas muestras resultaron positivas, dando como resultado en la reacción de qPCR, un Ct correspondiente a la muestra con la que se realizó el enriquecimiento, lo que confirma la ausencia de inhibidores.

La muestra de materia fecal recibida del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil, mostró una concentración de HBoV por qPCR de $9,3 \times 10^7$ cg/mL de muestra. Luego de realizar el tratamiento con ADNasa para eliminar el ácido nucleico de HBoV en suspensión, se observó una disminución en la concentración, determinándose un valor de $1,8 \times 10^4$ cg/mL de muestra. Dados los valores de concentración obtenidos, se observa que en la muestra original solo el 0,019% de las copias genómicas cuantificadas previo al tratamiento con ADNasa se correspondían al material genético proveniente de las partículas virales íntegras. Esta baja concentración de partículas virales íntegras de HBoV no permitió realizar una evaluación de la inactivación viral por medio del tratamiento con cloro.

Dado estos resultados es que se decidió evaluar la inactivación viral de Adenovirus humano (HAdV), virus similar a HBoV si se considera que es un virus con un genoma ADN, no envuelto, con una elevada presencia en aguas residuales y propuesto como indicador de contaminación fecal humana en aguas superficiales (Hewitt y colaboradores, 2013). Debido a que nuestro laboratorio cuenta con la línea celular A549 que permite el crecimiento de dicho virus, se partió de un sobrenadante de cultivo previamente infectado con HAdV para realizar las determinaciones correspondientes. Inicialmente se determinó su concentración viral, previo y posterior a un tratamiento con ADNasa, obteniéndose valores de $1,1 \times 10^9$ cg/mL y $1,7 \times 10^8$ cg/mL respectivamente. Es decir, un 15% del material genético extraído de la muestra previa al tratamiento con ADNasa correspondía al material genético proveniente de partículas virales íntegras. En base a este resultado, se decidió continuar con esta muestra para realizar los análisis de inactivación viral utilizando cloro.

Una vez agregado el cloro a la solución conteniendo el HAdV, se procedió a determinar su concentración, la cual indicó una ausencia total de cloro libre, sugiriendo que todo el cloro adicionado reaccionó tanto con las partículas virales de HAdV como con las sustancias presentes en el medio de cultivo en el cual fue cultivado el virus. Además, muchos de los componentes del medio de cultivo estarían inhibiendo la determinación espectrofotométrica. Dados estos dos factores, fue necesario eliminar todos los componentes presentes en el medio de cultivo antes de realizar el experimento de inactivación viral, de forma que éste no interfiriera en la inactivación de las partículas virales y la posterior cuantificación de cloro libre. Con este fin, se decidió concentrar las partículas virales siguiendo el método de concentración por filtración tal cual fue descrito en la sección Materiales y Métodos.

Luego de realizar la concentración viral, se realizaron las cuantificaciones virales previo y posterior a un tratamiento con ADNasa, obteniéndose valores de $3,8 \times 10^8$ cg/mL y $2,6 \times 10^4$ cg/mL, respectivamente.

Considerando los valores de cuantificación obtenidos previo a la concentración viral, se observa que teniendo en cuenta el ADN total, se recuperó un 34% luego de la concentración. Sin embargo, si se consideran los valores obtenidos posteriores al tratamiento con ADNasa, es decir valores de partículas virales íntegras, se observa que la concentración viral disminuye de $1,7 \times 10^8$ cg/mL a $2,6 \times 10^4$ cg/mL; es decir, la mayoría de las moléculas del ácido nucleico cuantificado posterior a la concentración viral no se encontraba dentro de la cápside viral, sino que estaba en suspensión, lo que nos sugiere que muchas partículas virales se degradaron en el proceso de concentración viral. Previo a la concentración viral, un 15% del ácido nucleico estaba formando parte de partículas virales íntegras, mientras que posteriormente a la concentración viral, solo el 0,007% del ácido nucleico estaba presente en las partículas virales íntegras. Esta degradación se puede deber a las condiciones que enfrentan las partículas virales en el proceso de la concentración viral. Frente a valores drásticos de pH, tanto ácidos como básicos, se observó que el virión es degradado, obteniéndose una concentración final de partículas virales íntegras insuficiente para evaluar la inactivación viral por medio de la adición de cloro.

Conclusiones

Este trabajo describió por primera vez en el país la presencia de los cuatro subtipos virales de HBoV en aguas residuales de las seis ciudades muestreadas, así como la detección de uno de los subtipos en una muestra de agua superficial. Los subtipos gastroentéricos fueron los que mostraron mayor positividad y concentración. El HBoV 4 es el que se encuentra circulando en menor proporción.

Se detectó por primera vez en América la presencia de una cepa recombinante, caracterizándola como recombinante entre los subtipos 3 y 4.

En lo que respecta a la evaluación de las características evolutivas del virus, éstas no pudieron ser determinadas.

Se pudo determinar los tiempos de introducción al país de algunos de los subtipos virales; los cuales fueron en diferentes momentos, entre los años 2004 y 2009. A su vez, algunos de estos ingresos habrían logrado expandirse a nivel local.

Las determinaciones de inactivación viral de HBoV frente al cloro no pudieron ser determinadas, dada la baja concentración de partículas virales íntegras en las muestras analizadas.

Se sugiere que HBoV es frecuentemente excretado en personas infectadas y se encuentra en una alta frecuencia en aguas residuales; sugiriendo una posible transmisión hídrica debido a la descarga de estas aguas residuales en aguas superficiales utilizadas para diferentes fines tales como recreación, irrigación de cultivos y consumo.

Perspectivas

Para confirmar la similitud entre las secuencias recombinantes descritas en este trabajo y la secuencia recombinante Rusa, será necesario secuenciar sus genomas completos que también permitirá evaluar si las secuencias son idénticas a lo largo de todo su genoma o si su similaridad es mayor únicamente en la región secuenciada en este trabajo.

En lo que respecta a la determinación de las características evolutivas del virus, será necesario secuenciar toda la región genómica que codifica para las proteínas estructurales, para poder realizar estudios evolutivos que tengan un buen soporte estadístico y así evaluar, por ejemplo, el país de donde provinieron las cepas que se encuentran circulando en Uruguay y su expansión a nivel mundial.

Para completar los ensayos de inactivación viral, sería necesario poner a punto el cultivo celular de HBoV que permita replicar el virus para luego purificarlo y realizar las determinaciones correspondientes.

Finalmente, si se evaluara la presencia de HBoV en muestras clínicas podría brindarnos más información acerca de la presencia del virus en la población Uruguaya.

Referencias

- Allander T., Tammi M. T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular *screening* of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12891–12896
10.1073/pnas.0504666102.
- Allander T., Jartti T., Gupta S. 2007. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clinical Infectious Diseases* 44: 904–910.
- Albuquerque M.C., Rocha L.N., Benati F.J. 2007. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1756–1758.
- Anisimova M., Gascuel O. 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Arthur J.L., Higgins G.D., Davidson G.P., Givney R.C., Ratcliff R.M. 2009. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathogens*, 5: e1000391.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Ayllón L., Valdivia A., Mas M., Trespalacios L. Cordero G. 2006. Algunos aspectos básicos de evolución de virus ARN: importancia médica. *Rev Cubana Invest Bioméd* v.25 n.3
- Babkin I.V., Tumentsev A.I., Tikunov A.Y., Kurilshchikov A.M., Ryabchikova E.I., Zhirakovskaya E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V., 2013. Evolutionary time-scale of primate bocaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 14, 265–274.
- Bastien N., Brandt K., Dust K., Ward D., Li Y. 2006. Human bocavirus infection, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 848–850.

- Bedolla-Barajas M., Montero H., Morales-Romero J., Landa-Cardena A., Díaz J., Delgado-Figueroa N., Orozco-Alatorre L.G. 2017. *Gac Med Mex.* 153(3):329-334.
- Berns K.I. y Colin R.P. 2013. *Parvoviridae*. En: *Fields Virology*. Knipe D.M., Howley P.M. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. Lippincott Williams and Wilkins. 2v (1768,91).
- Bibby K. and Peccia J. 2013. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environ. Sci. Technol.*; 47: 1945–1951.
- Blinkova O., Rosario K., Li L., Kapoor A., Slikas B., Bernardin F., Breitbart M., Delwart E. 2009. Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *J. Clin. Microbiol.* ; 47: 3507–3513.
- Bortagaray V., Lizasoain A., Piccini C., Gillman L., Berois M., Pou S., Del Pilar Díaz M., Tort L.F.L., Colina R., Victoria M. 2019. Microbial Source Tracking Analysis Using Viral Indicators in Santa Lucía and Uruguay Rivers, Uruguay. *Food Environ Virol.*; 11(3):259-267.
- Bosch A.1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internatl. Microbiol.*; 1:191-196.
- Burutarán L., Lizasoain A., García M., Tort L.F., Colina R., Victoria M. 2015. Detection and Molecular Characterization of Aichivirus 1 in Wastewater Samples from Uruguay. *Food. Environ. Virol.*; 8:13-7.
- Calgua B., Mengewein A., Grunert A., Bofill-Mas S., Clemente-Casares P., Hundesa A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods.* 153, 79–83.

- Canelaa P.L., Magalhães-Barbosab M.C. ,Raymundo C.E., Carneyc S. , Mendonca Siqueirac M., Prata-Barbosab A., Ledo Alves da Cunha A.J. 2018. Viral detection profile in children with severe acute respiratory infection. *Braz j infect dis.*; 22(5):402–411
- Cheng W., Chen J., Xu Z., Yu J., Huang C., Jin M., Li H., Zhang M., Jin Y., Duan Z.J. 2011. Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2. *BMC Infect. Dis.* 11, 50.
- Chieochansin T., Chutinimitkul S., Payungporn S., Hiranras T., Samransamruajkit R., Theamboonlers A., Poovorawan Y. 2007. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of Human Bocavirus (HBoV). *Virus Res*, 129: 54–57.
- Chieochansin T., Thongmee C., Vimolket L., Theamboonlers A., Poovorawan Y. 2008. Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61: 479–481.
- Choi E. H., Lee H. J., Kim S. J., Eun B. W., Kim N. H., Lee J. A., Lee J.H., Song E.K., Kim S.H., Park J.Y., Sung J.Y. 2006. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clinical Infectious Diseases*, 43(5), 585–592. Choi P.M., Tschärke B.J., Donner E., O'Brien J.W., Grant S.C., Kaserzon S.L., Mackie R., O'Malley E., Crosbie N.D., Thomas K.V., Mueller J.F. 2018. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 105, 453-469.
- Chong Y.L, Ng K.H. 2017. Genomic recombination in primate bocavirus: inconsistency and alternative interpretations. *Virus Genes*; 53(6):774–7.
- Christensen A., Nordbø S.A., Krokstad S., Rognlien A.G., Døllner H. 2010. Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are

- associated with respiratory tract infection. *Journal of Clinical Virology*, 49: 158–162.
- Comisión Internacional de Taxonomía de Virus, <http://www.ictvonline.org>. Ingreso: Abril 2019.
 - Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
 - De Vos N., Vankeerberghen A., Vaeyens F., Van Vaerenbergh K., Boel A., De Beenhouwer H. 2009. Simultaneous detection of human bocavirus and adenovirus by multiplex real-time PCR in a Belgian paediatric population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Nov;28(11):1305-10.
 - Deng X., Yan Z., Cheng F., Engelhardt J.F., Qiu J.. 2016. Replication of an autonomous human parvovirus in non-dividing human airway epithelium is facilitated through the DNA damage and repair pathways. *PLoS Pathog* 12:e1005399.
 - Dijkman R., Koekkoek S.M., Molenkamp R., Schildgen O., Van der Hoek L. 2009. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *Journal of virology*, 83(15), 7739-7748.
 - Dina J., Vabret A., Gouarin S., Petitjean J., Lecoq J., Brouard J., Arion A., Lafay-Delaire F., Freymuth F. Detection of human bocavirus in hospitalised children. 2009. *J. Paediatr. Child. Health.*; 45: 149-153.
 - Dong Y., Fasina O., Pintel D. 2018. The Human Bocavirus 1 NP1 Protein Is a Multifunctional Regulator of Viral RNA Processing, *Journal of Virology*, 10.1128/JVI.01187-18, 92, 22.
 - Drummond A.J. and Rambaut A. 2007. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.

- Edgar R.C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Fong T.T. and Lipp E.K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69:357-71.
- Fry A.M., Lu X., Chittaganpitch M., Peret T., Fischer J., Dowell S.F., Anderson L.J., Erdman D., Olsen S.J. 2007. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.*; 195 (7): 1038-45.
- Fu X., Wang X., Ni B., Shen H., Wang H., Zhang X., Chen S., Shao S., Zhang W. 2011. Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus. *Viol. J.*, 8, 182.
- Fumian T.M., Leite J.P.G., Castello A.A., Gaggero A., Caillou M.S.L., Miagostovich M.P. 2010. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 170: 42-46.
- Gamazo P., Victoria M., Schijven J.F., Alvareda E., Tort L.F.L., Ramos J., Burutaran L., Olivera M., Lizasoain A., Sapriza G., Castells M. 2018. Evaluation of Bacterial Contamination as an Indicator of Viral Contamination in a Sedimentary Aquifer in Uruguay. *Food Environ Virol. Sep*;10(3):305-315
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. A., y colaboradores (2010). Molecular detection of pathogens in water—The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44, 4325–4339.
- Guerrero-Latorre L., Romero B., Bonifaz E., Timoneda N., Rusiñol M., Girones R., Rios-Touma B. 2018. Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity

- in urban streams of Ecuador's capital city. *Sci Total Environ.* 2018 Dec 15;645:1334-1343.
- Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A. 2016. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol.* 2016; 22:8684-8697.
 - Guindon S. and Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
 - Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307-21, 2010.
 - Gurda B.L., Parent K.N., Bladek H., Sinkovits R., DiMattia M., Rence C., Castro A., McKenna R., Olson N., Brown K., Baker T., Agbandje-McKenna M. 2010. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol.*;84:5880–5889.
 - Hamza I.A., Jurzik L., Wilhelm M., Uberla K. 2009. Detection and quantification of Human Bocavirus in river water. *J. Gen. Virol.*; 90: 2634-2637.
 - Hamza H., Leifels M., Wilhelm M., Hamza I.A. 2017. Relative Abundance of Human Bocaviruses in Urban Sewage in Greater Cairo, Egypt. *Food Environ. Virol.*, Sep;9(3):304-313.
 - Haramoto E., Katayama H., Utagawa E., Ohgaki S. 2009. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods.*, 160(1-2):206-9.

- Hewitt J., Greening G.E., Leonard M., Lewis G.D. 2013. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Research* 47: 17, 6750-6761.
- Huelsenbeck J.P. and Ronquist. 2001. F.MR BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754-755.
- Huang Q., Deng X., Yan Z., Cheng F., Luo Y., Shen W., Lei-Butters D.C.M., Chen A.Y., Tang L., Li Y. Söderlund-Venermo M., Engelhardt J.F., Qiu J. 2012. Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia. *PLoS Pathogens*, 8 (8) , art. no. e1002899
- Iaconelli M., Divizia M., Della Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. 2016. Frequent Detection and Genetic Diversity of Human Bocavirus in Urban Sewage Samples. *Food Environ Virol.* ; 8:289-295.
- Jartti T., Hedman K., Jartti L., Ruuskanen O., Allander T., Söderlund-Venermo M. 2012. Human bocavirus—the first 5 years. *Reviews in Medical Virology*, 22: 46–64.
- Kantola K., Sadeghi M., Antikainen J. Real-time quantitative PCR detection of four Human Bocaviruses. *J Clin Microbiol* 2010; 48:4044–50.
- Kantola K., Hedman L., Arthur J., Alibeto A., Delwart E., Jartti T., Ruuskanen O., Hedman K., Soderlund-Venermo M. 2011. Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1–4. *J Infect Dis.* 1; 204(9): 1403–1412.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. 2009. A newly identified bocavirus species in human stool. *J. Infect. Dis.* ; 199: 196-200.
- Kapoor A., Simmonds P., Slikas E., Li L., Bodhidatta L., Sethabutr O., Triki H., Bahri O., Oderinde B.S., Baba M.M., Bukbuk D.N., Besser J., Bartkus J., Delwart

- E. 2010. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J. Infect. Dis.* ; 201: 1633-1643.
- Kapoor A., Hornig M., Asokan A., Williams B., Henriquez J.A., Lipkin W.I. 2011. Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS ONE* 6, e21362 10.1371/journal.pone.0021362.
 - Katayama H., Shimasaki A., Ohgaki S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbio.*, 68:1033–1039.
 - Kesebir D., Vazquez M., Weibel C., Shapiro E.D., Ferguson D., Landry M.L., Kahn J.S. 2006. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.* 194:1276-1282.
 - Khamrin P., Malasao R., Chaimongkol N., Ukarapol N., Kongsricharoen T., Okitsu S., Hayakawa S., Ushijima H., Maneekarn N. 2012. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol.*; 12: 565-569.
 - Kleines M., Scheithauer S., Rackowitz A., Ritter K., Hausler M. 2007. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol.*; 45 (3): 1032-4.
 - Kukkula M., Arstila P., Klossner M.L., Maunula L., Bonsdorff C.H., Jaatinen P. 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 29, 415–418.
 - La Rosa G., Della Libera S., Iaconelli M., Donia D., Cenko F., Xhelilaj G., Cozza P., Divizzia M. 2015. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *J. Med. Virol.*; 88:906–910.

- La Rosa G., Sanseverino I., Della Libera S., Iaconelli M., Ferrero V.E.V., Barra Caracciolo A., Lettieri T. 2017. The impact of anthropogenic pressure on the virological quality of water from the Tiber river, Italy. *Lett Appl Microbiol.*, Oct;65(4):298-305.
- Leal E., Villanova F.E., Lin W., Hu F., Liu Q., Liu Y., Cui S. 2012. Interclade recombination in porcine parvovirus strains. *Journal of General Virology* (2012), 93, 2692–2704.
- Lee S.H. and Kim S.J. 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 36, 248–256.
- Lefeuvre P., Lett J.M., Varsani A., Martin D.P. 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J. Virol.* 83, 2697–2707.
- Lindner J., Karalar L., Schimanski S., Pfister H., Struff W., Modrow S. 2008. Clinical and epidemiological aspects of human bocavirus infection. *J Clin Virol*, 43:391–395.
- Lizasoain A., Tort L.F., García M., Gómez M.M., Cristina J., Leite J.P., Miagostovich M.P., Victoria M., Colina R. 2015. Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. *Food Environ. Virol.*; 7:142.
- Lodder W.J. and de Roda Husman A.M. 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 71, 1453–1461.
- Lole KS., Bollinger RC., Paranjape RS., Gadkari D, Kulkarni SS., Novak NG., Ingersoll R., Sheppard HW., Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.

- Lu X., Gooding L.R., Erdman D.D. 2008. Human bocavirus in tonsillar lymphocytes. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1332–1334.
- Lusebrink J., Wittleben F., Schildgen V., Schildgen O. 2009. Human bocavirus—insights into a newly identified respiratory virus. *Viruses*, 1:3–12.
- Lusebrink J., Schildgen V., Tillmann R.L., Wittleben F., Böhmer A., Müller A., Schildgen O. 2011. Detection of Head-to-Tail DNA Sequences of Human Bocavirus in Clinical Samples. *PLoS ONE* 6(5): e19457. doi:10.1371/journal.pone.0019457.
- Martin E.T., Taylor J., Kuypers J. 2009. Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 4131–4132.
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.*, 1, vev003.
- Martinelli D., Prato R., Chironna M., Sallustio A., Caputi G., Conversano M., Ciofo Degli Atti M., D’Ancona F.P., Germinario C.A., Quarto M. 2007. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May–October 2006. *Euro Surveill* 12, E070419.
- Maunula L., Miettinen I.T., and von Bonsdorff C.H. 2005. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1716–1721.
- Maynard Smith J. 1992. Analyzing the Mosaic Structure of Genes. *J. Mol. Evol.*, 34, 126–129.
- Mietzsch M., Kailasan S., Garrison J., Ilyas M., Chipman P., Kantola K., Janssen M.E., Spear J., Sousa D., McKenna R., Brown K., Söderlund-Venermo M., Baker T., Agbandje-McKenna M. 2017. Structural Insights into Human Bocaparvoviruses. *J. Virol.*, 91.

- Miron D., Srugo I., Kra-Oz Z. 2010. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29: e7–e10.
- Monavari S.H., Noorbakhsh S., Mollaie H., Fazlalipour M., Abedi K.B. 2013. Human bocavirus in Iranian children with acute gastroenteritis. *Med. J. Islam Repub. Iran* 27, 127–131.
- Myrmet M., Lange H., Rimstad E. 2015. A 1-year quantitative survey of noro-, adeno-, human boca-, and hepatitis e viruses in raw and secondarily treated sewage from two plants in Norway. *Food Environ. Virol.*; 7: 213–223.
- Nadji S.A., Poos-Ashkan L., Khalilzadeh S. 2010. Phylogenetic analysis of human bocavirus isolated from children with acute respiratory illnesses and gastroenteritis in Iran. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42: 598–603.
- Nawaz S., Allen D.J., Aladin F., Gallimore C., Iturriza-Gomara M. 2012. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK. *PLoS ONE*; 7(7), e41346.
- Neske F., Blessing K., Tollmann F. 2007. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2116–2122.
- Organización de las Naciones Unidas, Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2018.
- Organización mundial de la Salud. 2006. Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición, Volumen 1, Recomendaciones.
- Ong D.S.Y., Schuurman R., Heikens E. 2016. Human bocavirus in stool: A true pathogen or an innocent bystander. *Journal of Clinical Virology*, 74: 45-49.

- Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R. 1998a. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64, 3376–3382.
- Pina S., Jofre J., Emerson S.U., Purcell R.H., Girones R. 1998b. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol*, 64(11):4485-4488.
- Pina S., Girones R. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, España.
- Pozo F., García-García M.L., Calvo C., Cuesta I., Pérez-Breña P., Casas I. 2007. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *Journal of Clinical Virology*, 40: 224–228.
- Proenca-Modena J.L., Gagliardi T.B., Escremim de Paula F., Iwamoto M.A., Criado M.F., Camara A.A., Olszanski Acrani G., Leite Cintra O.A., Cervi M.C., De Paula Arruda L.K., Arruda E. 2011. Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent diarrhea. *PLoS One* 6 (6): e21083.
- Proenca-Modena J.L., Martinez M., Amarilla A.A., Espínola E.E., Galeano M.E., Fariña N., Russomando G., Aquino V.H., Parra G.I., Arruda E. 2013. Viral load of Human Bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiol. Infect.*, 141(12):2576-80.
- Rambaut A., Lam T.T., de Carvalho L.M., Pybus O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evol.* 2, vew007.
- De R., Liying L., Yuan Q., Runan Z., Jie D., Fang W., Yu S., Huijin D., Liping J., Linqing Z., Jianming Q, 2017. Risk of acute gastroenteritis associated with

human bocavirus infection in children: A systematic review and meta-analysis, *PLOS ONE*, 12, 9.

- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 12;19(12):1572-4.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org/>.
- Saavedra M., Tovar C., Betancourt W. 2012. Virus entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. *Interciencia Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 37; 4; 260-265.
- Schildgen O., Muller A., Allander T., Mackay I.M., Volz S., Kupfer B. Simon A. 2008. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev*, 21:291–304.
- Schildgen O., Qiu J., Soderlund-Venermo M. 2012. Genomic features of the human bocaviruses. *Future Virol*. 7:31–39. doi: 10.2217/fvl.11.136.
- Shackelton L.A., Hoelzer K., Parrish C.R., Holmes E.C. 2007. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol*, 88:3294–3301.
- Song J.R., Jin Y., Xie Z.P., Gao H.C., Xiao N.G., Chen W.X., Xu Z.G., Yan K.I., Hou Y.D., Duan Z.J. 2010. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis*, 16:324–327.
- Suikkanen S., Antila M., Jaatinen A., Vihinen-Ranta M., Vuento M. 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*, 316: 267–280.
- Sun Y., Chen A.Y., Cheng F., Guan W., Johnson F.B., Qiu J. 2009. Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses. *Virol*, 83:3956–3967.

- Sun B., Cai Y., Li Y., Li J., Liu K., Li Y., Yang Y. 2013. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Virology* Vol. 440, 1, 75-83.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
- Tort L.F., Victoria M., Lizasoain A., García M., Berois M., Cristina J., Leite J.P., Gómez M.M., Miagostovich M.P., Colina R. 2015. Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay. *Food Environ. Virol.*; 7:342-53.
- Tozer S.J., Lambert S.B., Whiley D.M. 2009. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR. *Journal of Medical Virology*, 81: 488–493.
- Tyumentsev A.I., Tikunova N. V., Tikunov A.Y., Babkin I. V., 2014. Recombination in the evolution of human bocavirus. *Infect. Genet. Evol.* 28, 11–14. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.026.
- Tymentsev A., Tikunov A., Zhirakovskaia E., Kurilshikov A., Babkin I., Klemesheva V., Netesov S., Tikunova N. 2016. Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution*, 37: 143–149.
- Vera-Garate M.V., Rudi J.M., Gómez A., Molina F., Viotti M.F., Ortellao L., Pierini J., Sioli N., Cociglio R., Zamora A.M., Ruíz de Huidobro G., Costas D., López de Caillou S., Sánchez S.M., Mamaní N., Leva R., Rodríguez G., Gallardo S., Kuszniarz G. 2016. Detección de bocavirus humano en la población infantil de Tucumán y Santa Fe, Argentina. *Rev Chil Infectol.*;33(2):135–40.

- Viancelli A., Garcia L.A.T., Kunz A., Steinmetz R., Esteves P.A., Barardi C.R.M. 2012. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Research in Veterinary Science* 93 (2012) 538–543.
- Vicente D., Cilla G., Montes M., Perez-Yarza E.G., Perez-Trallero E. 2007. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 13, 636–637.
- Victoria M., Tort L.F., García M., Lizasoain A., Maya L., Leite J.P., Miagostovich M.P., Cristina J., Colina R. 2014. Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ. Virol.*; 6:116–124.
- Victoria M., Tort L.F., Lizasoain A., García M., Castells M., Berois M., Divizia M., Leite J.P., Miagostovich M.P., Cristina J., Colina R. 2016. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J. Appl. Microbio.*; 120:1427-35.
- Verbyla M.E. and Mihelcic J.R. 2015. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Res.*; 71:107–124.
- Wang K., Wang W., Yan H. 2010. Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. *Journal of Clinical Virology*, 47: 148–155.
- Yu J.M., Li D.D., Xu Z.Q., Cheng W.X., Zhang Q., Li H.Y., Cui S.X., Miao-Jin S.H., Fang Z.Y., Duan Z.J. 2008. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *J Clin Virol*; 42: 280-285.
- Zehender G., De Maddalena C., Canuti M., Zappa A., Amendola A., Lai A., Galli M., Tanzi E., 2010. Rapid molecular evolution of human bocavirus revealed by Bayesian coalescent inference. *Infect. Genet. Evol.* 10 (2), 215–220.

Apéndices



Human Bocavirus: Detection, Quantification and Molecular Characterization in Sewage and Surface Waters in Uruguay

Matías Salvo¹ · Andrés Lizasoain¹ · Matías Castells¹ · Viviana Bortagaray¹ · Sebastián Castro² · Rodney Colina¹ · Fernando Lopez Tort¹ · Matías Victoria¹

Received: 12 October 2017 / Accepted: 26 December 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Human bocavirus (HBoV) infections are related to respiratory and gastroenteric diseases. The aim of this study was to investigate the presence of HBoV in both sewage and surface waters in Uruguay. Sixty-eight sewage samples from the cities of Salto, Paysandú, Bella Unión, Fray Bentos, Treinta y Tres and Melo and 36 surface water samples from the cities of Salto, Florida and Santa Lucía were studied. HBoV was screened by multiplex qPCR for the detection of the four subtypes, followed by monoplex qPCRs for the independent quantification of each subtype. A qualitative PCR followed by DNA sequencing and phylogenetic analysis was carried out for molecular characterization of HBoV strains. HBoV was present in a high frequency (69%) in sewage and only one positive sample (3%) was found in surface water. Concerning sewage samples, HBoV1 was detected in 11 (23%) out of the 47 positive samples, with a mean concentration of 8.2×10^4 genomic copies/Liter (gc/L), HBoV3 was detected in 35 (74%) of the positive samples with a mean concentration of 4.1×10^6 gc/L and subtypes 2 and/or 4 were detected in 39 (83%) of the positive samples with a mean concentration of 7.8×10^6 gc/L. After the phylogenetic analysis performed by a Bayesian approach, the four HBoV subtypes were confirmed. This is the first study determining a high frequency of HBoV and the presence of the four HBoV subtypes in aquatic matrices in Latin America, mainly in sewage. Although HBoV was scarcely detected in surface water, a waterborne transmission is likely to occur if people enter in contact with polluted surface waters for recreational activities such as fishing or swimming since an elevated frequency of HBoV was detected in raw sewage which is usually directly discharged into surface waters.

Keywords Human bocavirus · Sewage · Surface water · qPCR · Molecular characterization · Uruguay

Introduction

Human bocaviruses (HBoV) are non-enveloped viruses with an icosahedral capsid belonging to the family *Parvoviridae*, subfamily *Parvovirinae*, genus *Bocaparvovirus*. The genome is composed by a negative sense single-stranded DNA of 5.3 kb with three open-reading frames (ORFs) which codify two non-structural (NS1 and NP1 in ORF1 and ORF2,

respectively) and two structural (VP1 and VP2 in ORF3) proteins (Guido et al. 2016).

HBoV strains are genetically classified into four subtypes: HBoV1, 2, 3 and 4. HBoV1 was the first detected in 2005 from samples of the respiratory tract (Allander et al. 2005) and is commonly associated with respiratory infections and diseases. Subtypes 2, 3 and 4 were initially detected in human stool samples (Arthur et al. 2009; Kapoor et al. 2009, 2010) and are associated with gastrointestinal infections. Previous studies have reported the presence of HBoV in up to 63% of the stool specimens analyzed, estimating a mean global prevalence of 6% in gastrointestinal infections (Guido et al. 2016).

Concerning HBoV dissemination into the environment, there are studies documenting the presence of HBoV in surface water (37–40%) and sewage (60–93%) worldwide (Blinkova et al. 2009; Hamza et al. 2009; Bibby and Pecchia 2013; Myrmet et al. 2015; Iaconelli et al. 2016; Hamza

✉ Matías Victoria
matvicmon@yahoo.com

¹ Department of Biological Sciences, Laboratory of Molecular Virology, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Rivera 1350, Salto, Uruguay

² Department of Mathematics and Statistics of Litoral, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay

et al. 2017; La Rosa et al. 2017). The presence of HBoV in environmental waters in Latin America is unknown although several studies performed in this region evidenced the presence of HBoV in fecal specimens from children with gastroenteritis and suggested a causative role for HBoV in gastrointestinal manifestations observed in acute respiratory infection patients in Brazil (Albuquerque et al. 2007; Proenca-Modena et al. 2011).

Several enteric viruses (Aichivirus, Astrovirus, Norovirus and Rotavirus) have been studied in sewage in Uruguay (Victoria et al. 2014, 2016; Burutarán et al. 2015; Lizasoain et al. 2015; Tort et al. 2015). However, the presence of HBoV is unknown in our country. Therefore, the aim of this study was to determine the frequency, viral concentration and molecular characterization of HBoV through the analysis of both sewage and surface water from Uruguay, as a useful approach to describe HBoV strain circulation in the local population where the environmental samples were collected.

Materials and Methods

Collection of Samples

Sewage samples (42 mL each) were collected in four cities (Bella Unión, Salto, Paysandú and Fray Bentos) in the north-western region and two (Melo and Treinta y Tres) in the eastern region of Uruguay. Salto, Paysandú and Fray Bentos discharge raw sewage directly to the Uruguay river which is the most important river of the country as previously mentioned by Victoria et al. (2014); on the other hand, Bella Unión treats its sewage by a stabilization pond. Both cities located in the eastern region present a Sewage Treatment Plant with activated sludge treatment followed by ultraviolet (UV) disinfection. In all the cities, raw sewage was collected with the exception of Bella Unión where effluent samples were collected.

Sewage samples were collected fortnightly between March 2011 and February 2012 in the cities located in the northwestern region of the country as described by Victoria et al. (2014). For this study, these samples were pooled to obtain one sample per month in each city. Sewage samples in Melo and Treinta y Tres were collected bi-monthly between September 2011 and April 2013.

Surface water samples (500 mL each) were collected monthly in Uruguay river, downstream to Salto and in Santa Lucía river (southern region of the country), downstream to Florida and Santa Lucía cities between June 2015 and May 2016. It is worth mentioning that Santa Lucía river is the source of drinking water for Montevideo (1,318,755 inhabitants), the capital of Uruguay located downstream of this basin.

Viral Concentration and Nucleic Acid Extraction

Sewage samples were subjected to ultracentrifugation method to perform the viral concentration as previously described in Victoria et al. (2014) and Tort et al. (2015).

Concentration of viral particles from surface water samples was performed by adsorption and elution to a negatively charged membrane (Katayama et al. 2002; Haramoto et al. 2009).

Nucleic acid extraction was performed with the QIAmp Cador Pathogen mini kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Screening and Quantification of HBoV

Screening and quantification of HBoV was performed by a multiplex quantitative PCR (qPCR) with TaqMan® technology, which detects the four HBoV subtypes (Kantola et al. 2010). Positive samples by this multiplex qPCR were analyzed for each subtype by monoplex qPCRs for subtypes 1 and 3 and by a multiplex qPCR for subtypes 2 and 4 (Kantola et al. 2010). The nucleic acid of negative HBoV samples was diluted tenfold and subjected to qPCR reactions to overcome the presence of inhibitors. Primers and probes were directed towards the 5' untranslated region (UTR) and the 5' region of the NS1 gene of HBoV genome (Kantola et al. 2010). Reactions were performed in duplicate according to manufacturer's recommendations with SensiFast™ II Probe Kit (Bioline Reagents Ltd.) and a Rotor-Gene Q instrument (QIAGEN®, Hilden, Germany) (Table 1).

One HBoV genome fragment amplified by quantitative PCR for each subtype was cloned into a plasmid and confirmed by sequencing to generate four standard curves to quantify all HBoV subtypes. Standard curves were constructed with eight points of tenfold serial dilutions of plasmid (10^7 to 10^0 genomic copies/reaction) that yielded slopes of -3.66 , -3.21 , -3.34 , -3.73 and reaction efficiencies of 0.88, 1.05, 0.99, 0.85 for multiplex qPCR, monoplex of HBoV1, monoplex of HBoV3 and multiplex of HBoV2/4, respectively. The coefficient of correlation (R^2) was 0.99 for all qPCR reactions.

HBoV Molecular Characterization

Positive samples detected and quantified by qPCR were subjected to amplification by a qualitative nested PCR for molecular characterization of HBoV Uruguayan strains as described by Iaconelli et al. (2016) and La Rosa et al. (2015). Both sets of primers target the VP1–VP2 region of the HBoV genome with an expected amplicon of 382 bp (Table 1).

Table 1 Primers used in this study

Molecular assay	Primer ID or probe (5'/3', labels)	Sequence (5'-3')	Reference	Genome region
qPCR ^a	HBoV1F(+)	CCTATATAAGCTGCTGCACTTCCTG	Kantola et al. (2010)	5'UTR-NS1
	HBoV1R(-)	AAGCCATAGTAGACTCACCACAAG		
	HBoV234F(+)	GCACTTCCGCATYTCGTCAG		
	HBoV3R(-)	GTGGATTGAAAGCCATAATTTGA		
	HBoV24R(-)	AGCAGAAAAGGCCATAGTGTC		
	Probe (FAM/BHQ1)	CCAGAGATGTTCACTCGCCG		
Nested PCR HBoV2-3-4	HBoV 234F1(+)	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAA	La Rosa et al. (2015)	VP1-VP2
	HBoV 234R1(-)	GTGGATATACCCACAYCAGAA		
	HBoV 234F2(+)	GGTGGGTGCTTCCTGGTTA		
	HBoV 234R2(-)	TCTTGRATTTTCATTTTCAGACAT		
Nested PCR HBoV1	HBoV 1F1(+)	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAAAG	Iaconelli et al. (2016)	VP1-VP2
	HBoV 1R1(-)	GTGGAATCCCCACACCAGAT		
	HBoV 1F2(+)	GGTGGGTGCTGCCTGGATA		
	HBoV 1R2(-)	TCTTGAATGTCAGTGTCAGACAT		

^aFor multiplex qPCR all primers were added in the same reaction. For monoplex qPCRs the following combination of primers were used for each subtype, HBoV1: HBoV1F-HBoV1R; HBoV3: HBoV234F, HBoV3R; HBoV2/4: HBoV 234F, HBoV24R

(+) Forward primer, (-) Reverse primer

Amplicons were purified using PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kit (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) and sequenced by MacroGen Platform (South Korea) in an ABI3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Sequences were edited with SeqMan® Software (DNASTAR Lasergene®) and aligned using MUSCLE program (Edgard 2004) with reference sequences obtained from the NCBI Database. Model that best adjusts to the dataset was calculated using j-Model test program (Guindon and Gascuel 2003; Darriba et al. 2012). Phylogenetic trees were constructed with a Bayesian approach using Mr. Bayes program (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003) with 400,000 generations and a sample frequency of 200.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using the R software (R Core Team 2013). Associations between positive HBoV samples and location, seasonality, and detected subtypes were carried out using the Chi-squared test. *p* values were used as the measure of association between the studied variables.

Results

HBoV in Sewage Samples

HBoV was detected in 69% (47/68) of the sewage samples analyzed. In the six studied cities, HBoV detection ranged from 67 to 90%, except for Bella Unión city, where

a frequency of 33% was observed in treated sewage, which was significantly different ($p = 0.02$). Concerning HBoV subtypes, HBoV2/4 were the prevalent, observed in 58% of the analyzed samples, followed by HBoV3, which was detected in 51% and HBoV1 which was detected in 16% (Table 2). It is important to highlight that the frequency of detection of gastroenteric subtypes (HBoV2/4 and 3) were higher than the frequency of the respiratory subtype (HBoV1) ($p = 0.003$). All negative samples that were ten-fold diluted and amplified for the detection of HBoV were negative, which confirms the absence of inhibitors for the enzymatic reactions.

Different subtypes were co-detected in 62% of the samples. In 2% of them subtypes 1 and 3 were co-detected while 20% presented subtypes 1, 3 and 2/4, and 40% presented subtypes 3 and 2/4 (data not shown).

Concerning to the temporal distribution of HBoV in sewage from the northwestern region of Uruguay, it was observed that HBoV was detected throughout the year with no clear pattern of seasonality ($p = 0.43$) (Fig. 1). Similar results were observed from the analysis of the sewage samples collected in the eastern region (data not shown).

HBoV concentrations determined by qPCR identified HBoV1 as the subtype with the lowest concentration (mean of 8.2×10^4 genomic copies/L (gc/L), ranging from 1.9×10^4 gc/L to 2.2×10^5 gc/L). Higher concentrations were observed for subtypes frequently associated with gastroenteritis: HBoV3 presented a mean of 4.1×10^6 gc/L, ranging from 4.9×10^4 to 2.5×10^7 gc/L and HBoV 2/4 presented a mean concentration of 7.8×10^6 gc/L ranging from 1.2×10^5 to 8.1×10^7 gc/L (Table 3).

HBoV in Surface Water Samples

HBoV was detected in 3% of the analyzed surface water samples (1/36). The HBoV-positive sample corresponding to the Santa Lucía river was collected in Florida and belongs to subtype 3 (Fig. 2), with a concentration of 2.7×10^4 genomic copies/L.

Molecular Characterization of HBoV

Six out of eleven (54%) samples amplified by qPCR for HBoV1 and 25 out of 47 (53%) samples that were amplified by qPCR for HBoV2/4 and/or 3 were successfully sequenced. The most frequent subtype confirmed by phylogenetic analysis was HBoV3 with 12 sequences, followed by HBoV2 with 11 sequences, 6 sequences were classified as HBoV1 and 2 as HBoV4 (Fig. 2).

Table 2 Frequency of detection of HBoV and each subtype in sewage samples collected in six cities in Uruguay

City (<i>n</i> ^a)	HBoVs Positives (%)	HBoV1 Positives (%)	HBoV2/4 Positives (%)	HBoV3 Positives (%)
Bella Unión (12)	4 (33)	0 (0)	4 (100)	2 (50)
Salto (12)	8 (67)	0 (0)	7 (88)	4 (63)
Paysandú (12)	8 (67)	2 (25)	4 (50)	4 (50)
Fray Bentos (12)	10 (83)	2 (20)	8 (80)	9 (90)
Treinta y Tres (10)	8 (80)	5 (63)	8 (100)	7 (88)
Melo (10)	9 (90)	2 (22)	8 (89)	9 (100)
Total (<i>n</i> = 68)	47 (69)	11 (16)	39 (58)	35 (51)

^aNumber of samples collected in each city

Fig. 1 Monthly distribution of Human bocavirus-positive sewage samples (black bars) and average of temperature (dash line) in the northwestern region of Uruguay between March 2011 and February 2012

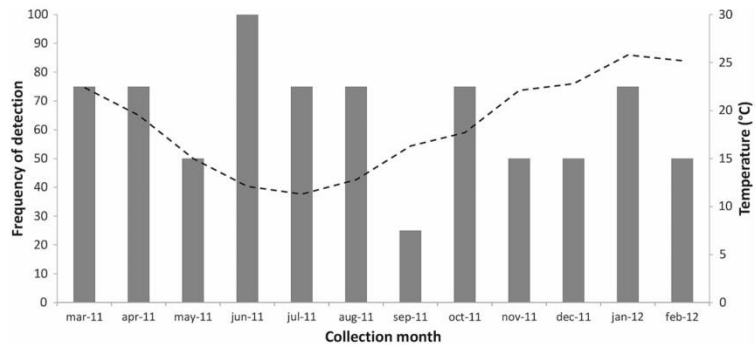
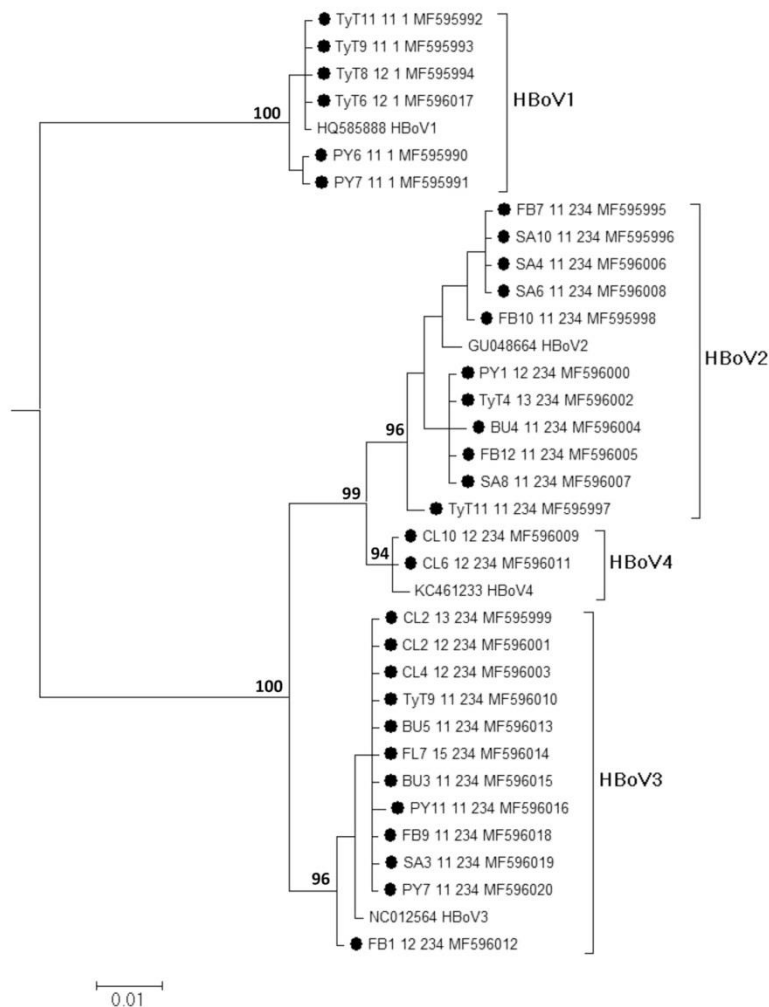


Table 3 Concentration of each HBoV subtype according to each analyzed city (expressed as genomic copies/Liter)

	HBoV-1 Mean (minimum–maximum)	HBoV-2/4 Mean (minimum–maximum)	HBoV-3 Mean (minimum–maximum)
Bella Unión	ND	5.44×10^6 (2.91×10^5 to 1.36×10^7)	2.96×10^5 (9.71×10^4 to 4.95×10^5)
Salto	ND	8.85×10^6 (1.55×10^6 to 2.23×10^7)	8.18×10^5 (1.17×10^5 to 2.04×10^6)
Paysandú	4.37×10^4 (1.94×10^4 to 6.80×10^4)	3.70×10^6 (2.04×10^5 to 1.36×10^7)	1.03×10^7 (1.75×10^6 to 2.33×10^7)
Fray Bentos	1.41×10^5 (5.83×10^4 to 2.23×10^5)	8.37×10^6 (4.86×10^5 to 4.37×10^7)	7.33×10^6 (4.86×10^4 to 2.53×10^7)
Treinta y Tres	6.02×10^4 (1.94×10^4 to 1.55×10^5)	1.37×10^7 (1.17×10^5 to 8.06×10^7)	2.64×10^6 (2.82×10^5 to 1.17×10^7)
Melo	1.17×10^5 (7.77×10^4 to 1.55×10^5)	3.36×10^6 (6.70×10^5 to 8.45×10^6)	1.68×10^6 (6.80×10^4 to 6.31×10^6)
Total	8.21×10^4 (1.94×10^4 to 2.23×10^5)	7.75×10^6 (1.17×10^5 to 8.06×10^7)	4.13×10^6 (4.86×10^4 to 2.53×10^7)

ND not detected

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by the Bayesian method of HBoV detected in sewage and surface water in six Uruguayan cities. The sequences used corresponded to the partial VP1/VP2 gene (382 nts). The model that best adjusted to the dataset was HKY with gamma distribution. Reference strains are shown with the corresponded accession number and subtype. Names of Uruguayan strains are coded as followed: city code-month and year of collection-primers used in nested PCR-accession number-preceded by a black circle. *BU* Bella Unión, *SA* Salto, *PY* Paysandú, *FB* Fray Bentos, *TyT* Treinta y Tres, *CL* Cerro Largo (Melo) and *FL* Florida. Only posterior values over 90% are shown



Discussion

As far as we know, this is the first report concerning the detection, quantification and molecular characterization of HBoV in Uruguay, as well as the first performed in sewage and surface water in Latin America.

The results obtained in this study showed that HBoV is frequently excreted by infected persons since a high frequency (69%) was observed in the analyzed sewage samples. This was in agreement with previous studies performed in other regions of the world that reported frequencies ranging between 59 and 93% (Blinkova et al.

2009; Bibby and Peccia 2013; Myrmel et al. 2015; Iaconelli et al. 2016; Hamza et al. 2017).

HBoV was detected in all cities, with frequencies ranging from 67 to 90%. Only Bella Unión presented a significant lower frequency of detection (33%), this could be because these samples were obtained from the effluent of a sewage treatment plant (stabilization pond). This kind of treatment allows a moderate remotion of enteric viruses (generally less than one log₁₀-unit). Nevertheless, in our study, we were unable to determine the removal efficiency of this pond since no raw sewage sample was obtained (Verbyla and Mihelcic 2015).

Sewage samples collected in the northwestern region of Uruguay have been previously analyzed for several enteric viruses evidencing frequencies ranging from 45 to 72%. However, HBoV presented one of the highest frequencies of detection (Burutarán et al. 2015; Tort et al. 2015; Lizasoain et al. 2015; Victoria et al. 2016). In this study, HBoV was frequently detected in sewage samples but only once detected in surface water. On the other hand, La Rosa et al. (2017) observed a high frequency of HBoV in surface water suggesting that this virus could be used as a viral indicator of fecal contamination. Further studies are needed to determine the frequency of this virus in both sewage and surface water in other temperate regions of the world to confirm HBoV as a viral indicator of fecal contamination (Lau et al. 2007; Campe et al. 2008; Chhabra et al. 2013).

In this study, both the frequency of detection and concentration were higher for HBoV3, 2/4 than HBoV1. This is likely to occur since subtypes 2, 3 and 4 are associated with gastrointestinal infections, thus they could be replicating in the epithelium of the gastrointestinal tract, while HBoV1 infects epithelial cells of the respiratory tract. It has been suggested that HBoV1 once replicated in the respiratory tract can be swallowed together with nasopharyngeal secretion and can be detected in stools or sewage with lower titer than that observed in nasopharyngeal swabs (Proenca-Modena et al. 2013). There is scarce information concerning the concentration of HBoV in sewage worldwide. In our study, we observed concentration values one log higher for HBoV1, and two log higher for HBoV 2/3/4 when compared with quantifications described by other studies (Myrmel et al. 2015; Iaconelli et al. 2016; Hamza et al. 2017). Although the waterborne transmission has not been proven for HBoV, its elevated frequency and concentration in sewage samples suggest that this transmission route should not be ruled out. Moreover, previous studies performed with these sewage samples showed similar concentrations of enteric viruses clearly associated with waterborne transmission such as rotavirus and norovirus (Victoria et al. 2014).

Despite a seasonal pattern has been described for HBoV obtained from nasopharyngeal aspirates and stool samples (Choi et al. 2006; Nawaz et al. 2012), we have not detected a seasonal pattern in this study. This observation was confirmed statistically and is in agreement with results obtained by other authors (Hamza et al. 2009; Iaconelli et al. 2016; Hamza et al. 2017).

The presence of HBoV was also investigated in surface water samples collected in two important rivers of Uruguay. A low frequency of HBoV was observed with only one positive sample (3%) out of 36 analyzed. There are only two studies where HBoV was analyzed in river samples which indicate higher frequencies than that observed in our study (Hamza et al. 2009; La Rosa et al. 2017). These differences in the frequencies of HBoV detection

can be observed since the previous studies used higher volume of surface water to perform the viral concentration and the basin of these rivers are located in areas with high population densities. The positive sample observed in our study corresponds to HBoV3, however, results from a previous study indicated that HBoV2 is the prevalent in surface waters collected in rivers from Italy (La Rosa et al. 2017).

Phylogenetic analysis was performed with 25 sequences out of 47 positives samples for HBoV2, HBoV3 or HBoV4, and 6 sequences out of 11 positives samples for HBoV1. We were unable to obtain the sequence of 27 positive samples which can be due to the higher sensitivity of qPCR when compared with qualitative conventional PCR. However, studies comparing the sensitivity between qPCR and Nested PCR for HBoV are lacking. The phylogenetic tree showed that 12 sequences obtained in this study clustered in the clade of HBoV3, 11 in the clade of HBoV2, 6 in HBoV1 clade, and 2 corresponded to HBoV4. These results were statistically supported since these clades present posterior values higher than 90%. Phylogenetic analysis confirmed that samples that were positive by qPCR for HBoV2 or 4 corresponded mostly to subtype 2 with only 2 sequences belonging to subtype 4. These results were in accordance with previous studies confirming that HBoV4 is rarely detected both in environmental (Myrmel et al. 2015; Iaconelli et al. 2016; Hamza et al. 2017) and clinical samples (Kapoor et al. 2010; Kantola et al. 2010).

To the best of our knowledge, this is the first work where the presence of HBoV was analyzed in Uruguay, confirming an elevated frequency in sewage from all the six studied cities. Although all the HBoV subtypes described where detected in sewage samples, those subtypes associated with gastrointestinal infections where observed in higher concentration than HBoV1, which is associated with respiratory infections. Taken together, HBoV is frequently excreted by infected persons and is present in sewage which suggests that a waterborne transmission of this virus is likely to occur if sewage is discharged in recreational waters, consumption water, water for irrigation of crops and bivalve cultivation.

Acknowledgments We would like to thank the financial support given by the program “Polo de Desarrollo Universitario (PDU), Universidad de la República (UdelAR), Uruguay”; project CSIC I+D 2010 and project CSIC I+D 2014, UdelAR. We also thank OSE and the staff of the Virology Section, School of Sciences, UdelAR, Uruguay for their technical assistance. MS is a master student at “Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas - PEDECIBA” and has a scholarship from “Agencia Nacional de Investigación e Innovación - ANII”, Uruguay.

References

- Albuquerque, M. C. M., Rocha, L. N., Benati, F. J., Soares, C. C., Maranhão, A. G., Ramirez, M. L., et al. (2007). Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *13*, 1756–1758.
- Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, B., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., & Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 12891–12896.
- Arthur, J. L., Higgins, G. D., Davidson, G. P., Givney, R. C., & Ratcliff, R. M. (2009). A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathogens*, *5*, e1000391.
- Bibby, K., & Peccia, J. (2013). Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environmental Science and Technology*, *47*, 1945–1951.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., et al. (2009). Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*, 3507–3513.
- Burutarán, L., Lizasoain, A., García, M., Tort, L. F., Colina, R., & Victoria, M. (2015). Detection and molecular characterization of aichivirus 1 in wastewater samples from Uruguay. *Food and Environmental Virology*, *8*, 13–17.
- Campe, H., Hartberger, C., & Sing, A. (2008). Role of human bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, *43*, 340–342.
- Chhabra, P., Payne, D. C., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Shirley, S. H., et al. (2013). Etiology of viral gastroenteritis in children < 5 years of age in the United States, 2008–2009. *Journal of Infectious Diseases*, *208*, 790–800.
- Choi, E. H., Lee, H. J., Kim, S. J., Eun, B. W., Kim, N. H., Lee, J. A., et al. (2006). The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(5), 585–592.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772.
- Edgard, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1795.
- Guido, M., Tumolo, M. R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., De Giorgi, M., et al. (2016). Human bocavirus: current knowledge and future challenges. *World Journal of Gastroenterology*, *22*, 8684–8697. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8684>.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, *52*, 696–704.
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Wilhelm, M., & Uberla, K. (2009). Detection and quantification of human bocavirus in river water. *Journal of General Virology*, *90*, 2634–2637.
- Hamza, H., Leifels, M., Wilhelm, M., & Hamza, I. A. (2017). Relative abundance of human bocaviruses in urban sewage in Greater Cairo, Egypt. *Food and Environmental Virology*. <http://doi.org/10.1007/s12560-017-9287-3>.
- Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E., & Ohgaki, S. (2009). Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *Journal of Virological Methods*, *160*(1–2), 206–209.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MR BAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17*, 754–755.
- Iaconelli, M., Divizia, M., Della Libera, S., Di Bonito, P., & La Rosa, G. (2016). Frequent detection and genetic diversity of human bocavirus in urban sewage samples. *Food and Environmental Virology*, *8*, 289–295.
- Kantola, K., Sadeghi, M., & Antikainen, J. (2010). Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*, 4044–4050.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Slikas, E., Li, L., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., et al. (2010). Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *Journal of Infectious Diseases*, *201*, 1633–1643.
- Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naem, A., Shaikat, S., et al. (2009). A newly identified bocavirus species in human stool. *Journal of Infectious Diseases*, *199*, 196–200.
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 1033–1039.
- La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Donia, D., Cenko, F., Xhelilaj, G., et al. (2015). Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *Journal of Medical Virology*, *88*, 906–910.
- La Rosa, G., Sanseverino, I., Della Libera, S., Iaconelli, M., Ferrero, V. E. V., Barra Caracciolo, A., et al. (2017). The impact of anthropogenic pressure on the virological quality of water from the Tiber river, Italy. *Lett Appl Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/lam.12774>.
- Lau, S. K., Yip, C. C., Que, T. L., Lee, R. A., Au-Yeung, R. K., Zhou, B., et al. (2007). Clinical and molecular epidemiology of Human Bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *Journal of Infectious Diseases*, *196*, 986–993.
- Lizasoain, A., Tort, L. F., García, M., Gómez, M. M., Cristina, J., Leite, J. P., et al. (2015). Environmental assessment of classical human astrovirus in Uruguay. *Food and Environmental Virology*, *7*, 142.
- Myrmel, M., Lange, H., & Rimstad, E. (2015). A 1-year quantitative survey of noro-, adeno-, human boca-, and hepatitis e viruses in raw and secondarily treated sewage from two plants in Norway. *Food and Environmental Virology*, *7*, 213–223.
- Nawaz, S., Allen, D. J., Aladin, F., Gallimore, C., & Iturriza-Gomara, M. (2012). Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK. *PLoS ONE*, *7*(7), e41346.
- Pronca-Modena, J. L., Gagliardi, T. B., Escrimim de Paula, F., Iwamoto, M. A., Criado, M. F., Camara, A. A., et al. (2011). Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent diarrhea. *PLoS ONE*, *6*(6), e21083.
- Pronca-Modena, J. L., Martinez, M., Amarilla, A. A., Espínola, E. E., Galeano, M. E., Fariña, N., et al. (2013). Viral load of Human Bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiology and Infection*, *141*(12), 2576–2580.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>.
- Tort, L. F., Victoria, M., Lizasoain, A., García, M., Berois, M., Cristina, J., et al. (2015). Detection of common, emerging and uncommon VP4, and VP7 human group A rotavirus genotypes from urban sewage samples in Uruguay. *Food and Environmental Virology*, *7*, 342–353.
- Verbyla, M. E., & Mihelcic, J. R. (2015). A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research*, *71*, 107–124.
- Victoria, M., Tort, L. F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J. P., et al. (2014). Assessment of gastroenteric viruses from

- wastewater directly discharged into Uruguay river, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6, 116–124.
- Victoria, M., Tort, L. F., Lizasoain, A., García, M., Castells, M., Beriois, M., et al. (2016). Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1427–1435.



**First description of a Human Bocavirus recombinant strain
in the Americas.**

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2019-0219
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	27-Jun-2019
Complete List of Authors:	Salvo, Matias; UdelaR, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República. Mir, Daiana; UdelaR, Genomics and Bioinformatics Unit, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República. Lopez-Tort, Luis Fernando; UdelaR, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República. Lizasoain, Andrés; UdelaR, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República. Colina , Rodney; UdelaR, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República. Victoria, Matias; UdelaR, Laboratory of Molecular Virology, Department of Biological Sciences, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República.
Keyword:	Human Bocavirus, recombinant, sewage, VP1, Uruguay
Theme:	Epidemiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

First description of a Human Bocavirus recombinant strain in the Americas.

Matias Salvo¹, Daiana Mir², Luis Fernando López Tort¹, Andrés Lizasoain¹, Rodney Colina¹, Matias Victoria^{1*}.

¹Laboratory of Molecular Virology, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

²Genomics and Bioinformatics Unit, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

*Corresponding author: matvicmon@yahoo.com.

Abstract

Human Bocaviruses (HBoV) are mainly associated with respiratory and gastroenteric infections. These viruses belong to the family *Parvoviridae*, genus *Bocaparvovirus* and are classified in four subtypes (HBoV1-4). Recombination and point mutation have been described as basis of parvovirus evolution. In this study three viral sequences were obtained from positives HBoV sewage samples collected in two Uruguayan cities and were characterized by different methods as recombinant strains. This recombination event was localized in the 5' end of VP1 gene and the parental strains belonged to subtypes 3 and 4. These three Uruguayan strains are identical at the nucleotide sequences in the analyzed genome region of the virus. These results, suggests a successful dispersion of this recombinant HBoV strain from one continent to another. As far as we known, this study represents the first detection of HBoV recombinants strains in the Americas.

1
2
3 Human Bocavirus (HBoV) belongs to the family *Parvoviridae*, genus *Bocaparvovirus*.
4
5 Two species of primate Bocavirus compose the genus *Bocaparvovirus*: *Primate*
6
7 *Bocaparvovirus 1* and *Primate Bocaparvovirus 2* (ICTV, 2019). In *Primate Bocaparvovirus*
8
9 *1*, two subtypes of the virus have been described: HBoV1 and HBoV3. HBoV1 was
10
11 characterized in 2005 in pools of nasopharyngeal aspirates and was associated with
12
13 respiratory tract infections (Allander et al. 2005), while HBoV3 was reported four years
14
15 later in stool samples from children with acute gastroenteritis (Arthur et al. 2009). In turn,
16
17 subtypes HBoV2 and HBoV4 have been classified within *Bocaparvovirus 2* being both
18
19 associated with gastrointestinal infections (Arthur et al. 2009, Kapoor et al. 2010).
20
21
22

23
24 The HBoV genome consists of a single-stranded DNA which encodes three open reading
25
26 frames (ORFs); ORFs 1 and 2 code the nonstructural proteins NS1 and NP1; and ORF3
27
28 codifies the capsid proteins VP1 and VP2 (Allander et al. 2005). It is precisely in the 5' end
29
30 of VP1 gene where the presence of a Bocavirus recombination hotspot has been evidenced
31
32 (Kapoor et al. 2010; Fu et al. 2011; Khamrin et al. 2013; Tyumentsev et al. 2014).
33
34 Although there is a solid evidence indicating intra-subtype recombination among HBoV2
35
36 variants at this recombination hotspot (Kapoor et al. 2009, Cheng et al. 2011), there is still
37
38 conflicting data regarding the suggested genesis of HBoV2 and HBoV3 via inter-subtype
39
40 recombination occurring at this recombination point (Kapoor et al. 2009, 2010; Cheng et al.
41
42 2011; Fu et al. 2011; Chong et al. 2017). Notably, it has been reported a trend without
43
44 subtype distinction, of repeated VP1 gene replacement via recombination at this specific
45
46 hotspot with HBoV4. This VP1 replacement would respond to the implicit advantage of
47
48 borrowing the gene encoding the structural protein from the less prevalent HBoV4 subtype
49
50 in order to overcome the host immunity (Khamrin et al. 2013; Tyumentsev et al. 2014).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 A previous study performed by our group demonstrated a high frequency of HBoV in raw
4 sewage from Uruguay (Salvo et al. 2018); however, the presence of HBoV recombinant
5 strains has not been reported so far in this country. In order to evaluate the presence of
6 recombinant strains, three strains that could not be molecular characterized in that previous
7 report were amplified in a larger genome fragment and sequenced.
8
9

10
11
12 Samples were collected in the cities of Melo (CL12_12) and Treinta y Tres (TyT12_12,
13 TyT2_13) between December 2012 and February 2013. Viruses were concentrated and the
14 nucleic acid was extracted previously as described in Victoria et al. (2014) and Salvo et al.
15 (2018). A nested polymerase chain reaction (PCR) designed with forward primers
16 described by La Rosa et al. (2015), and reverse primers described by Kapoor et al. (2010)
17 was performed (PCR conditions and primers sequences are shown in supplementary
18 material). The first and the second round PCR amplified a fragment of 910 bp and 820 bp,
19 respectively, corresponding to the 5' end of VP1 region of the HBoV genome.
20
21

22
23 Amplicons were purified using PureLink™ Quick Gel Extraction kit and PCR Purification
24 Combo kit (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) and sequenced by Macrogen
25 Platform (Seoul, South Korea) in an ABI3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems,
26 CA, USA) with forward and reverse primers of the second round PCR (820 pb). Sequences
27 were edited with SeqMan Software (DNASTAR Lasergene) and aligned by using MUSCLE
28 program (Edgard, 2004) along with HBoV reference sequences retrieved from the NCBI
29 Database.
30
31

32
33 Sequences obtained were submitted to a nucleotide based Basic Local Alignment Search
34 Tool (BLASTn) analysis (Altschul et al. 1990) in order to recover HBoV sequences
35
36

1
2
3 presenting high nucleotide similarity and probably a similar recombination profile. To
4
5 further determine the potential recombination events, sequences were fragmented and the
6
7 regions that stretch upstream and downstream the recombination breakpoint described in a
8
9 Russian recombinant sequence (the most similar sequence), were submitted to a Maximum
10
11 Likelihood (ML) phylogenetic analysis implemented in the IQ-TREE software (Nguyen et
12
13 al. 2015) along with reference HBoV sequences. The most appropriate evolutionary model
14
15 for each partial genome alignment was determined by ModelGenerator v.0.851 (Keane et
16
17 al. 2006). The phylogenetic trees were visualized with FigTree v1.4.3
18
19 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and the robustness of each node was assessed by
20
21 an ultrafast bootstrap approximation (1000 replicates) (Minh et al. 2013).
22
23

24
25 To confirm the results, Similarity and Bootscan (Salminen et al. 1995) analyses as
26
27 implemented in Simplot v3.5.1 (Lole et al. 1999) and RDP4 (Martin et al. 2015) programs,
28
29 respectively, were carried out. Similarity plot analyses were conducted using a 200 bp
30
31 sliding window and 20 bp step size. Bootscan analyses were implemented using a window
32
33 size of 150 bp; step of 20 bp and pairwise distance with 100 bootstrap replicates.
34
35

36
37 The HBoV sequences generated in this study were deposited in the GenBank database
38
39 under the following accession numbers: MK442008 to MK442010.
40
41

42
43 The three evaluated Uruguayan sequences showed 100% nucleotide identity in the
44
45 evaluated region, and retrieved the Russian recombinant strain RUS_NSC_11-N2512
46
47 (GenBank accession number: KJ710645) isolated in 2011 as its top Blast hit (e-value: 0.0;
48
49 Identity: 99.0). This Russian sequence has already been described as a recombinant strain
50
51 between HBoV3 and HBoV4 subtypes (Tyumentsev et al. 2014).
52
53

1
2
3 As it can be seen in the phylogenetic reconstruction based on the genomic region upstream
4 to the recombination point (Fig. 1), the Uruguayan sequences comprise a cluster with
5 sequences belonging to the HBoV3 subtype (Fig. 1A). Alternatively, in the inferred
6 phylogenetic tree based on the sequence region downstream to the recombination point, the
7 evaluated Uruguayan sequences group within the HBoV4 monophyletic clade (Fig. 1B).
8
9

10 To confirm the results obtained by the phylogenetic analyses, similarity (Fig. 2A) and
11 bootscan analyses (Fig. 2B) were performed. Plots predicted a recombination site located
12 nearby the nucleotide 200 (cutoff, 70%) of the Uruguayan HBoV strains. The predicted site
13 for the recombination break-point roughly corresponds to the nucleotide position 3,250 of
14 the HBoV complete genome of the recombinant strain RUS_NSC_11-N2512; thus, it was
15 located at the 5' end of the VP1 gene. The recombination profile suggests that the 5' end of
16 the evaluated VP1 region of the Uruguayan sequences is a HBoV3 subtype, while the 3'
17 end after de recombination point belongs to the HBoV4 subtype.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 As far as we known, this is the first description of recombinant strains of HBoV detected in
35 the Americas. These strains showed a high nucleotide similarity with the recombinant
36 sequence described in Russia (Tyumentsev et al. 2014). The Uruguayan sequences
37 corresponded to recombinant strains between the parental subtypes 3 and 4 of HBoV and
38 the break-point is in a region already described as a hotspot recombination in Parvovirus
39 (Lefeuvre et al. 2009). Following this strategy the virus could generate genetic variation
40 and adaptive advantages, especially in overcoming host immunity, as it was already
41 discussed by Tyumentsev et al. (2014). Low abundance of HBoV4 strains in
42 gastrointestinal samples makes that recombinant strains acquire structural proteins of a rare
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 virus which present a low prevalence in human populations, overcoming the host
4
5 immunity.
6

7
8
9 The fact that three samples with the same sequence were detected in sewage samples of
10
11 different cities and in different periods of the year, suggests that the recombinant strain has
12
13 dispersed and successfully replicated in their host acquiring possible immunological
14
15 advantages over the parental strains.
16

17
18
19 It is important to remark the suitability of using the primers described by La Rosa et al.
20
21 (2015), for the phylogenetic characterization. Although recombinant sequences cannot be
22
23 associated to a particular clade of the subtypes already described since the hotspot
24
25 recombination is located approximately in the middle of the amplified sequence, this
26
27 protocol, can be used as a first approach in order to identify recombinant strains. Moreover,
28
29 the combination of primers described La Rosa et al. (2015) and Kapoor et al. (2010) is an
30
31 adequate approach in order to confirm HBoV recombinant strains when the recombination
32
33 point is located at the 5' end of the VP1 gene.
34
35

36
37
38 Given the high percentage of similarity between the sequences described in this study and
39
40 the sequence described by Tyumentsev et al. (2014), more studies are needed in order to
41
42 evaluate if these strains were generated as an independent recombinant event or due to the
43
44 dispersion of the RUS_NSC_11-N2512 strain from Asia to America or vice versa. More
45
46 studies are also needed in order to identify this recombinant strains in human clinical
47
48 samples and evaluate if they are more diverse with respect to others subtypes and also, if
49
50 these recombinant strains generate a more virulent clinical outcome in human hosts.
51
52
53 Unfortunately, in our study we did not have access to stools from children presenting acute
54
55
56

1
2
3 gastroenteritis in the same cities where the recombinant strains were found in order to
4
5 confirm the presence of this recombinant strain in symptomatic patients.
6
7

8
9 Recombination events seem to be an important evolutionary force that shapes the HBoV
10
11 genome. In the near future, with more results of evolutionary studies on HBoV, the origin
12
13 of each HBoV subtypes as well as the different circulating recombinant strains, their
14
15 classification and clinical outcome will be elucidated.
16
17

18 19 20 21 22 **Acknowledgments**

23
24 We would like to thank the financial support of the program “Polo de Desarrollo
25
26 Universitario (PDU), Universidad de la República (UdelaR), Uruguay” and project CSIC
27
28 I+D 2010, UdelaR. We also thank OSE, Uruguay for their technical assistance. MS is an
29
30 MSc student at “Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas - PEDECIBA” and has a
31
32 scholarship from “Agencia Nacional de Investigación e Innovación - ANII”, Uruguay.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6 - Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment
- 7 search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- 8
- 9
- 10
- 11 - Allander T., Tammi MT., Eriksson M., Bjerkner A., TiveljungLindell A., Andersson B.
- 12 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract
- 13 samples. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 12891-12896.
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18 - Arthur JL., Higgins GD., Davidson GP., Givney RC., Ratcliff RM. 2009. A novel
- 19 bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*; 5:
- 20 e1000391.
- 21
- 22
- 23
- 24 - Cheng W., Chen J., Xu Z., Yu J., Huang C., Jin M., Li H., Zhang M., Jin Y., Duan ZJ.
- 25 2011. Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2. *BMC Infect. Dis.*
- 26 11, 50.
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32 - Chong YL, Ng KH. Genomic recombination in primate bocavirus: inconsistency and
- 33 alternative interpretations. *Virus Genes.* 2017;53(6):774-7.
- 34
- 35
- 36 - Edgard RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
- 37 throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1795.
- 38
- 39
- 40
- 41 - Fu X., Wang X., Ni B., Shen H., Wang H., Zhang X., Chen S., Shao S., Zhang W. 2011.
- 42 Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus. *Virol. J.* 8, 182.
- 43
- 44
- 45
- 46 - ICTV, February, 2016. Virus Taxonomy: 2016 Release. URL
- 47 <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed 2.26.19).
- 48
- 49
- 50 - Kapoor A., Slikas E., Simmonds P., Chieochansin T., Naeem A., Shaukat S., Alam
- 51 MM., Sharif S., Angez M., Zaidi S., Delwart E. 2009. A newly identified bocavirus
- 52 species in human stool. *J Infect Dis.* 199: 196-200.
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Kapoor A., Simmonds P., Slikas E., Li L., Bodhidatta L., Sethabutr O., Triki H., Bahri O., Oderinde BS., Baba MM., Bukbuk DN., Besser J., Bartkus J., Delwart E. 2010. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis.* 201: 1633-1643.
 - Keane TM., Creevey CJ., Pentony MM., Naughton TJ., McInerney JO. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol.* 6:29.
 - Khamrin P., Okitsu S., Ushijima H., Maneekarn N. 2013. Complete genome sequence analysis of novel human bocavirus reveals genetic recombination between human bocavirus 2 and human bocavirus 4. *Infect. Genet. Evol.* 17, 132–136.
 - La Rosa G., Della Libera S., Iaconelli M., Donia D., Cenko F., Xhelilaj G., Cozza P., Divizzia M. 2015. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *J Med Virol* 2015; 88:906–910.
 - Lefevre P., Lett J.M., Varsani A., Martin, DP. 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J. Virol.* 83, 2697–2707.
 - Lole KS., Bollinger RC., Paranjape RS., Gadkari D, Kulkarni SS., Novak NG., Ingersoll R., Sheppard HW., Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
 - Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1(1):vev003.
 - Minh BQ., Nguyen MAT., Von Haeseler A. 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.*, 30:1188-1195.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Nguyen LT., Schmidt HA., Von Haeseler A., Minh BQ. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32, 268-274.
- Salminen M., Carr JK., Burke DS., Mc Cutchan FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 11, 1423-1425.
- Salvo M., Lizasoain A., Castells M., Bortagaray V., Castro S., Colina R., Tort FL., Victoria M. 2018. Human Bocavirus: detection, quantification and molecular characterization in sewage and surface waters in Uruguay. *Food Environ. Virol.*, 1-8.
- Tyumentsev AI., Tikunova NV., Tikunov AY., Babkin IV. 2014. Recombination in the evolution of human bocavirus. *Infect. Genet. Evol.* 28, 11-14. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.026
- Victoria M., Tort LF., García M., Lizasoain A., Maya L., Leite JP., Miagostovich MP., Cristina J., Colina R. 2014. Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol*; 6:116-124.

1
2
3 **Figure 1.** Maximum likelihood phylogenetic analysis of HBoV strains under the HKY
4 nucleotide substitution model. The results obtained using the VP1 region upstream (120 bp)
5 and downstream (490 bp) to the recombination point are shown in A and B, respectively.
6
7 The three Uruguayan strains are indicated by red squares. Bootstrap support values are
8 indicated at key nodes. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom
9 indicating nucleotide substitutions per site. A map of the HBoV genome highlighting the
10 analyzed regions and the inferred position of the recombination point is shown at the top.
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20 **Figure 2.** Similarity (A) and Bootscan (B) analyses of query Uruguayan sequence
21 MK442008. In the Similarity plot analyses, the y-axis represents the percentage of genetic
22 identity, per analysis window, for the query strain with HBoV reference strains. The
23 Bootscan plots depict the percentage (bootstrap values) at which each reference strain co-
24 segregates phylogenetically, in the analysis window, with the query strain. Reference
25 HoBV strains are represented by a color code as indicated at the bottom of the figure.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

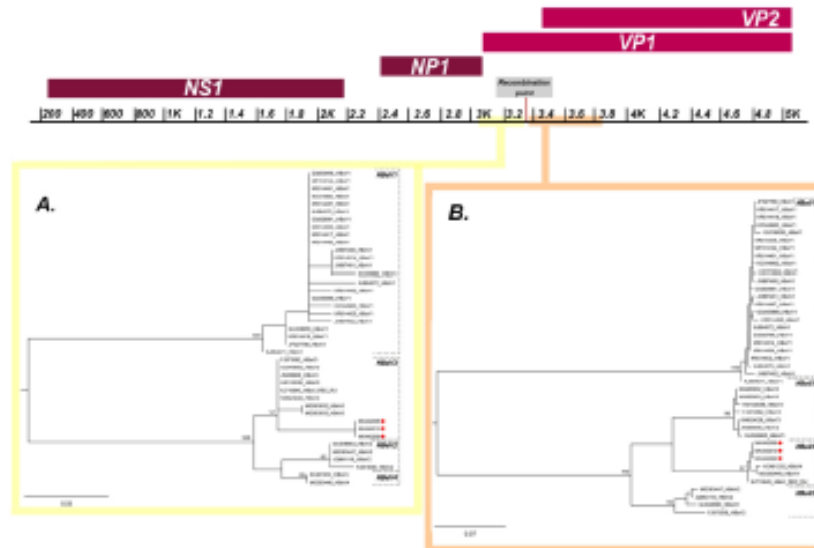


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic analysis of HBoV strains under the HKY nucleotide substitution model. The results obtained using the VP1 region upstream (120 bp) and downstream (490 bp) to the recombination point are shown in A and B, respectively. The three Uruguayan strains are indicated by red squares. Bootstrap support values are indicated at key nodes. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site. A map of the HBoV genome highlighting the analyzed regions and the inferred position of the recombination point is shown at the top.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

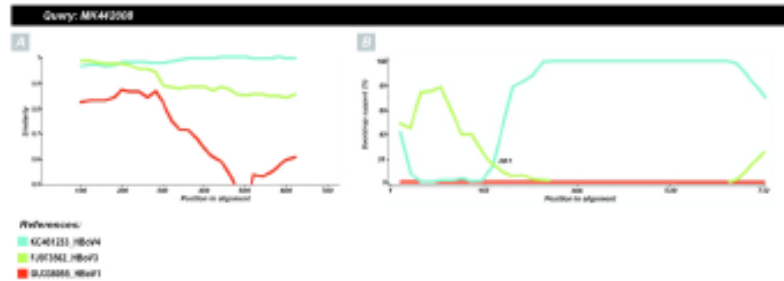


Figure 2. Similarity (A) and Bootscan (B) analyses of query Uruguayan sequence MK442008. In the Similarity plot analyses, the y-axis represents the percentage of genetic identity, per analysis window, for the query strain with HBoV reference strains. The Bootscan plots depict the percentage (bootstrap values) at which each reference strain co-segregates phylogenetically, in the analysis window, with the query strain. Reference HBoV strains are represented by a color code as indicated at the bottom of the figure.

Table 1- PCR mixture

Reagent	Volume for one reaction (µL) (First Round/ Second Round)
10X Taq DNA Polymerase Buffer	2.5/5.0
dNTPs (10 mM each one)	0.5 / 1.0
Primer F (10µM) (2028- GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAA/ 2030-GGTGGGTGCTTCCTGGTTA)	1.0 / 2.0
Primer R (10µM) (AK-VP-R1- TGTTCCGATCACAAAAGATGTG/ AK-VP-R2-CCTGCTGTAGGTCGTTGTATGT)	1.0 / 2.0
MgCl ₂ (25mM)	1.5 / 3.0
DNA (template)	2.0 / 2.0
Taq DNA Polymerase (5U/µL)	0.2 / 0.4
Ultrapure Water	16.3 / 34.6
Total Volume	25 / 50

Table 2- Cycling conditions

Temperature	Time	Number of cycles
95 °C	3 minutes	1
95 °C	30 seconds	40 (first round)
54 °C	30 seconds	45 (second round)
72 °C	45 seconds	
72 °C	10 minutes	1



Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- 1 Manuscripts I Have Co-Authored >
- Start New Submission >
- Legacy Instructions >
- 5 Most Recent E-mails >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
SM: Carvalho, Maria Clara	MIOC-2019-0219	First description of a Human Bocavirus recombinant strain in the Americas. View Submission	24-Jun-2019	27-Jun-2019
• ED Assign HE				



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Wastewater contamination in Antarctic melt-water streams evidenced by virological and organic molecular markers



L.F.L. Tort^a, K. Iglesias^b, C. Bueno^c, A. Lizasoain^a, M. Salvo^a, J. Cristina^d, N. Kandratavicius^c, L. Pérez^e, R. Figueira^f, M.C. Bicego^f, S. Taniguchi^f, N. Venturini^b, E. Brugnoli^c, R. Colina^a, M. Victoria^{a,*}

^a Laboratorio de Virología Molecular, Sede Salto del CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Rivera 1350, Salto 50000, Uruguay

^b Laboratorio de Biogeoquímica Marina, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

^c Oceanografía y Ecología Marina, IECA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

^d Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Mataojo 2055, Montevideo (11400) Uruguay

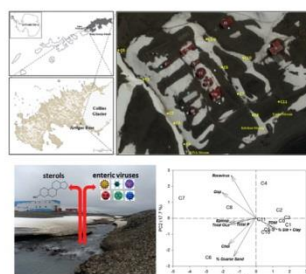
^e Centro Universitario de la Regional Este, Universidad de la República, Ruta 9 y Ruta 15, Rocha, Uruguay

^f Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Praça do Oceanográfico 191, Cidade Universitária (05508-120), São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Wastewater contamination was assessed in three streams in the Antarctic continent.
- Viruses and sterols were analyzed in surface waters and sediments, respectively.
- Rotaviruses and high sterols values evidenced a wastewater contamination.
- Complementation of these biomarkers improves the assessment of wastewater pollution.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2017

Received in revised form 13 July 2017

Accepted 14 July 2017

Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Sterols

Enteric viruses

Surface water

Sediment

Antarctica

ABSTRACT

Human activities in the Antarctica including tourism and scientific research have been raised substantially in the last century with the concomitant impact on the Antarctic ecosystems through the release of wastewater mainly from different scientific stations activities. The aim of this study was to assess the wastewater contamination of surface waters and sediments of three melt-water streams (11 sites) by leaking septic tanks located in the vicinity of the Uruguayan Scientific Station in the Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica, during summer 2015. For this purpose, we combined the analysis of fecal sterols in sediments by using gas chromatography and six enteric viruses in surface waters by quantitative and qualitative PCR. Coprostanol concentrations (from 0.03 to 3.31 $\mu\text{g g}^{-1}$) and fecal sterols diagnostic ratios indicated that stations C7 and C8 located in the kitchen stream presented sewage contamination. Rotavirus was the only enteric virus detected in five sites with concentration ranging from 1.2 $\times 10^5$ gc L⁻¹ to 5.1 $\times 10^5$ gc L⁻¹ being three of them located downstream from the leaking AINA and Kitchen septic tanks. This study shows for the first time the presence of both virological and molecular biomarkers of wastewater pollution in surface waters and sediments of three melt-water streams in the vicinity of a scientific station in the Antarctica. These results highlight the importance of the complementation of these biomarkers in two different matrices (surface waters and sediments) to assess wastewater pollution in an Antarctic environment related to anthropogenic activities in the area.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

* Corresponding author.

E-mail address: mvictoria@unorte.edu.uy (M. Victoria).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.127>
0048-9697/© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Human activities in the Antarctic continent date back to 18th century, however, from the 1960s to present days these activities have continued to increase together with the production of wastes and interaction with the landscapes, flora and fauna. According to the Council of Managers of National Antarctic Programs, 53 research stations are located in the Antarctica where near 4000 people live and work at its peak each summer. Regular activities of the scientific stations have caused several environmental impacts that affect the air, water (marine and freshwater) and soil quality (including ice and snow) mainly due to the land or marine traffic, waste and sewage management and disposal and fuel oil contamination (Braun et al., 2012, 2014; Tin et al., 2009, 2014).

Domestic wastewater discharge in the Antarctic environment has been evidenced in several research stations mainly through the analysis of organic molecular indicators (Delille and Delille, 2000; Howington et al., 1992; Martins et al., 2005, 2014; Montone et al., 2010). Fecal steroids (e.g. coprostanol and coprostanone) are organic compounds used as wastewater molecular markers since they are resistant to environmental degradation and specific to their origin. These compounds have been used as tracers of domestic wastewater contamination in the Antarctic region (Hughes and Thompson, 2004; Leeming et al., 2015; Martins et al., 2005, 2012; Venkatesan and Mirsadeghi, 1992). The major human fecal sterol is coprostanol that is widely used because it represents near 60% of total fecal sterols in human feces (Leeming et al., 1998). Coprostanol is associated with particulate material and sediments, is very resistant to anaerobic degradation and together with cholesterol and cholestanol are consistent markers of human fecal contamination (Leeming et al., 1998; Martins et al., 2005). In addition, epicoprostanol is used to evaluate the treatment of wastewaters since it is present in sewage sludge and produced during extensive anaerobic sewage treatment (Leeming et al., 2015; Martins et al., 2012; Mudje and Seguel, 1999). Moreover, fecal sterols are insoluble in water and tend to accumulate in sediments where they are highly resistant to degradation and the presence of these sterols in sediments represents the concentration at the time of deposition. Depending on local sedimentation rates, the time of deposition for surface sediments is generally of the order of years (Martins et al., 2005; Muller et al., 1979).

Wastewater discharge can also be assessed by viral indicators of fecal contamination like Human Adenovirus (HAdV), which is an enteric virus presenting environmental dissemination via contaminated feces from an infected person. Other enteric viruses like Group A Rotavirus (RVA), Norovirus (NoV), Human Astrovirus (HAstV) and Enterovirus (EV) are frequently present in domestic wastewater evidencing their spread from infected people to the environment (Bosch et al., 2008).

The combination of fecal sterols and enteric viruses as markers of fecal contamination to assess wastewater pollution is an important approach, but has been performed only in a few studies worldwide, nevertheless, the complementation of these two indicators have never been used in the Antarctic continent in order to determine the impact of the anthropogenic activities in this pristine environment (Rusiñol et al., 2016; Souza et al., 2012). The aim of this study was to evaluate the presence of sewage on melt-water streams by leaking septic tanks (confirmed by visual observation) in the vicinity of the Artigas Antarctic Scientific Base (BCAA) by using virological and molecular organic markers (fecal sterols) as indicators of fecal contamination in surface waters and sediments, respectively. Also, we aimed to evaluate if both matrices (surface waters and sediments), can be used in a complementary manner to obtain a more reliable assessment of sewage contamination in these aquatic environments since the presence of enteric viruses in surface running waters suggests a relatively recent fecal contamination when compared with high concentrations of sterols in sediment which indicate a prolonged presence of fecal contamination (Martins et al., 2005).

2. Material and methods

2.1. Study area and sample collection

The Fildes peninsula, located in the South of King George Island, present a high biodiversity and six permanent scientific stations are located in this peninsula, representing important logistic centers in the area (Braun et al., 2012). The BCAA, located in the Fildes Peninsula (62°11'4"S and 58° 51'7"W) comprised 11 buildings with several septic tanks (Fig. 1). During February 2015 (summer) a sampling survey was performed in 11 sites located along the three melt-water streams near-by the BCAA (AINA melt-water stream: C0 to C4, Kitchen melt-water stream: C5-9 to C8 and Tanks melt-water stream: C10 and C11). These melt-water streams flow into the sea in approximately 100 m. From the 11 sampling sites, seven were located close to the septic tanks (C1, C2, C3, C5-9, C6, C7, C10), three downstream (C4, C8, C11) and one as a control site (C0: upstream the AINA stream and away from the buildings area) (Fig. 1). During the sampling survey, approximately 60 persons were present in the BCAA although nine are the residents along the year. These people tend to congregate mainly in the AINA building (number II in Fig. 1) where the rest rooms, offices and the laboratory are located and in the kitchen (number VIII in Fig. 1) where people feed and perform recreation activities.

It is worth mentioning that current protocols at BCAA establish the treatment of organic garbage by incineration and the removal from the wastewater of the solid phase from BCAA to the continent, however, the liquid phase of this wastewater remains in the septic tanks where occasionally leaks to the streams.

Physicochemical water parameters (temperature and conductivity) were measured in situ with an YSI *Pro Plus* multi parameter. Surface sediment samples for granulometric and chemical analysis were collected using a stainless steel corer and were maintained frozen (−20 °C) in pre-combusted (450 °C, 4 h) aluminum containers until laboratory analysis.

Sediment samples were kept frozen during transport until laboratory analysis (maximum of 10 days after collection).

Surface water samples were collected in 500 mL bottles and viral concentration was performed at the laboratory of the BCAA. Concentrated samples were kept frozen until their transfer to the laboratory in Salto city, Uruguay, for virological analysis.

2.2. Determination of grain size, total organic matter and phosphorous

Grain size was determined by sieving according to Suguio (1973) and total organic matter (TOM) content by calcination and weight difference (Byers et al., 1978). Total phosphorus (TP) determination was performed by partial digestion (USEPA 3050B (USEPA, 1996)) and quantified by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma.

2.3. Extraction, purification and analysis of sterols

The analysis of steroids was based on the method described by Kawakami and Montone (2002). Prior to extraction, sediments were freeze-dried and homogenized in a porcelain mortar. About 10 g of dried sediment were Soxhlet extracted for 8 h with a mixture of (1:1; v:v) n-hexane/dichloromethane. The 5 α -androstan-3 β -ol (Sigma®) was added as surrogate, before blank, reference material and sample extraction. Concentrated extracts were fractionated and purified by column chromatography using 5% deactivated silica and alumina with 15 mL of methanol and evaporated to dryness. All solvents were analytical grade. Steroids were derivatized to form trimethylsilyl ethers using BSTFA (bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) with 1% TMCS (trimethylchlorosilane) (Supelco) for 90 min at 65 °C. The 5 α -cholestane was used as internal standard for quantification. Steroids were analyzed using an Agilent 6890 gas chromatograph with a flame

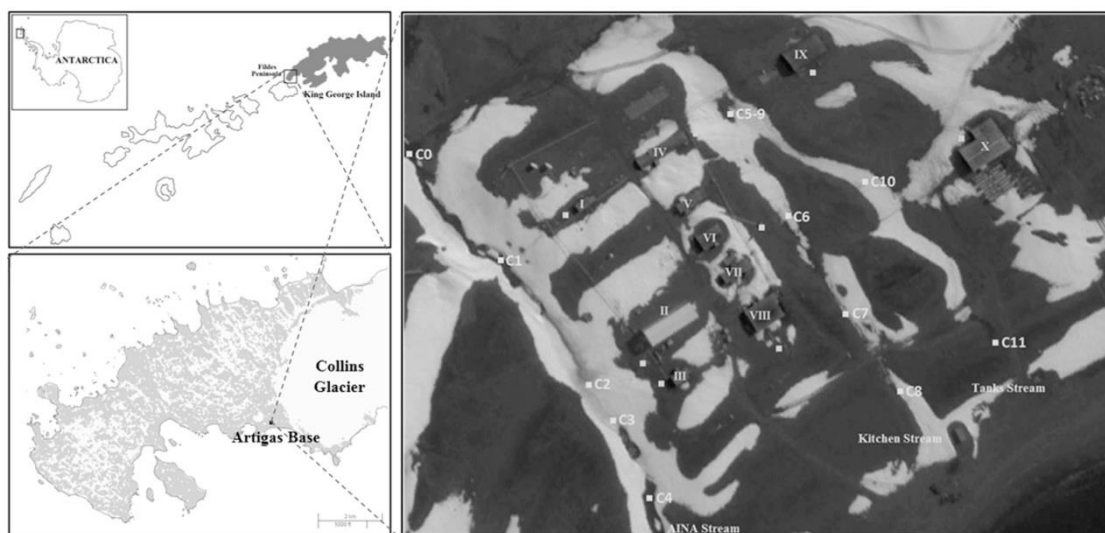


Fig. 1. Map of the sampling sites in the three melt-water streams of the BCAA located at Fildes Peninsula, King George Island, South Shetland, Antarctica maritime. Sites are in boxes with C and Arabic numbers, buildings are in Roman numbers (II and VIII are the AINA and Kitchen buildings, respectively) and septic tanks in boxes without numbers. One building is near the seashore and out of this figure.

ionization detector (GC-FID) and the identification of steroids was confirmed by GC-MS in the SCAN mode. An Agilent capillary column coated with 5% diphenyl/dimethylsiloxane (30 m length, 0.25 mm ID and 0.25 μm film thickness) was used. Hydrogen was used as the carrier gas. The oven temperature was programmed from 40 $^{\circ}\text{C}$, 40–240 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, then to 245 $^{\circ}\text{C}$ at 0.15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and finally to 300 $^{\circ}\text{C}$ at 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, held for 9.5 min. The injector and detector temperature was 300 $^{\circ}\text{C}$ and 325 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Quantification was performed by the surrogate peaks area method and a 5-point calibration curve for each class of compounds analyzed ($r > 0.995$). Procedural blanks were performed for each group of 10 samples, and no peaks interfered with the analyses of target compounds. The recovery of surrogates ranged between 60 and 120% and the detection limit (LD) for steroids varied between 0.010 and 0.040 $\mu\text{g g}^{-1}$. Concentrations of steroids were expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry sediment. In order to reduce ambiguity in source assignment of fecal sterols and evaluate anthropogenic vs. higher vertebrates fecal contribution, parameters such as ratios of specific sterols were calculated (Table 3).

2.4. Viral concentration, nucleic acid extraction, cDNA synthesis and PCR

Viral concentration for the surface water samples was performed by the adsorption/elution method described by Katayama et al. (2002) with little modifications (Haramoto et al., 2009). Total nucleic acid extraction was performed by using the QIAamp *cador* Pathogen Mini Kit (Qiagen®) according with manufacturer's instructions which allows the simultaneous isolation of both RNA and DNA from the same sample. cDNA synthesis was carried out by using *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific®) with hexameric random primers (SBS Genetech®) following the manufacturer's instructions. For both cDNA synthesis and PCR reactions, pure and 1:10 total nucleic acid dilutions were analyzed in order to overcome inhibition of the molecular reactions. RVA, NoV Genogroup I (GI) and GII, HAdV, EV, HAdV were detected and quantified by quantitative PCR (qPCR) following the protocols described by Zeng et al. (2008), Pang et al. (2005), Dai et al. (2010), Oberste et al. (2010) and Hernroth et al. (2002), respectively. The detection limits of the qPCR reactions for RVA, NoV Genogroup I (GI) and GII,

HAdV, EV and HAdV were 5, 30, 5, 5, 5 and 25 genomic copies per qPCR reaction, respectively.

Human bocavirus was also investigated by using a nested PCR described by Iaconelli et al. (2016) followed by 2% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Standard procedures were followed for all the molecular reactions including negative and positive controls from the nucleic acid extraction to PCR reactions.

2.5. Data analysis

A correlation-based Principal Component Analysis (PCA) was performed with surface waters and sediment variables in order to identify any meaningful distribution from the samples in relation to physico-chemical characteristics and fecal contamination levels. PCA was carried out using the software PRIMER (Clarke and Warwick, 1994).

3. Results

The surface water temperature showed a variation between 0.2 and 2.7 $^{\circ}\text{C}$, with the minimum and maximum in the Tanks and Kitchen melt-water streams, respectively. Water conductivity presented the minimum values in the AINA melt-water stream (39–43 $\mu\text{S cm}^{-1}$) and the maximum in the Kitchen melt-water stream (102–144 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (Table 1).

A predominance of coarse fractions (coarse sand and gravel) of sediment grain size was observed in most of the sampling sites (Table 1). Stations C0, C1 and C3 showed higher percentages (12.8–32.7%) of fine sediments (silt + clay) than the other sampling sites. The TOM content was similar among the sites with an average of 3.8% (Table 1). Total phosphorous concentrations ranged from 597.9 to 1248.3 mg kg^{-1} being the lowest and the highest value in stations C0 and C8, respectively (Table 1). Similar total phosphorous concentrations were recorded in the AINA melt-water stream (C0 to C4) and in the Tanks melt-water stream (C10 and C11) (Table 1). In contrast, high phosphorous concentrations were recorded in the Kitchen melt-water stream with increasing values downstream from C5-9 to C8 (Table 1).

Total sterols varied between 0.09 $\mu\text{g g}^{-1}$ in station C5-9 and 5.59 $\mu\text{g g}^{-1}$ in station C7 (Table 2). Coprostanol ranged from 0.03 to 3.31 $\mu\text{g g}^{-1}$

Table 1
Water physicochemical variables and sediment characteristics (granulometric fractions, total organic matter and total phosphorus) of the three melt-water streams of the BCAA.

Station	Temperature (°C)	Conductivity, ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	% silt + clay	% fine sand	% medium sand	% coarse sand	% gravel	total organic matter (%)	Total phosphorus (mg kg^{-1})
C0	1.9	40.0	12.8	5.6	6.7	19.5	56.0	4.5	597.9
C1	2.2	43.1	32.7	15.0	3.5	13.9	35.1	4.5	613.3
C2	1.9	38.9	ND	ND	ND	ND	ND	4.3	609.9
C3	1.8	39.04	19.0	9.7	7.6	11.4	53.1	4.9	689.1
C4	1.9	39	ND	ND	ND	ND	ND	3.6	683.4
C5-9	ND	ND	6.1	2.0	2.5	55.9	33.6	3.6	983.9
C6	1.8	143.8	2.0	2.2	4.0	66.4	25.5	4.0	1094.6
C7	1.4	118.4	2.6	1.5	2.6	37.7	55.9	2.2	1207.1
C8	2.7	101.9	2.7	1.0	1.2	21.8	73.4	3.9	1248.3
C10	0.2	68.0	2.4	5.2	10.3	63.1	18.9	3.3	784.0
C11	0.7	55.4	5.6	3.9	6.6	57.9	26.3	3.3	828.3

ND: not determined.

and the highest levels were recorded in stations C7 and C8 located in the Kitchen melt-water stream (Table 2). Epicoprostanol was present only in stations C6, C7 and C8 of the Kitchen melt-water stream in concentrations varying from 0.35 to 0.92 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Table 2). Coprostanone also showed the highest values (0.90–1.44 $\mu\text{g g}^{-1}$) at these stations. Cholesterol was the dominant sterol in most of the sampling sites excepting C7 and C8, where coprostanol dominated (Table 2). The Coprostanol/(Coprostanol + Cholesterol) ratio and the Coprostanol/(Coprostanol + Cholesterol) ratio ranged between 0.17 and 0.90 and 0.10 and 0.77, respectively (Table 3). The highest values were obtained in stations C7 and C8. The same was observed for the Coprostanol/Epicoprostanol ratio (3.60 and 4.85) (Table 3). The ratio % (Coprostanol + Epicoprostanol)/Total OLS varied from 6.84 to 75.79 with values >50% in stations C7 and C8. The highest values of the ratio Coprostanone/(Coprostanone + Cholestanone) were also obtained in the Kitchen melt-water stream (C6, C7 and C8) (Table 3).

From the six enteric viruses investigated, only RVA was detected in surface waters of the three melt-water streams of the BCAA. RVA was present in five of the 11 sites with concentrations ranging from 1.2×10^5 genomic copies per liter (gc L^{-1}) to 5.1×10^5 gc L^{-1} (Table 2). The highest concentrations of RVA were recorded in stations C4 and C7 (Table 2). Three of the positive sites were located downstream from the septic tanks. It is worth mentioning that at the time of the sample collection, three of the septic tanks were leaking towards the AINA and Kitchen melt-water streams as confirmed by visual observation. At the end of the expedition (day 10) an extra sample was collected in site C2, since this site is located near the septic tank of the main building (AINA) where nearly 60 persons remained for the entire period of the expedition. At this time, this septic tank was also leaking to the melt-water stream and the highest concentration of RVA was detected (2.3×10^6 gc L^{-1}) in C2 (data not shown).

The two first components of the PCA explained together almost 71% of the total variance, where PC 1 explained 52.9% and PC 2 17.7% (Fig. 2). PC 1 was positively correlated with fine sediment particles (% silt + clay) and TOM content and negatively correlated with chemical indicators (coprostanol, epicoprostanol, total sterols and total

phosphorous) (Table 4 and Fig. 2). PC 2 was positively correlated with RVA and coprostanol concentration, and negatively correlated with coarse sand percentage and cholesterol (Fig. 2 and Table 4). The sites showed a spatial distribution according to both axes. The sites located along AINA melt-water stream (C0, C1, C2 and C3) and Tanks melt-water stream (C5-9, C10, C11) presented predominance of fine sediments and high TOM contents but low levels of fecal indicators and total phosphorous (Fig. 2). In contrast, the sites along the Kitchen melt-water stream (C7 and C8) showed the highest levels of fecal contamination. In addition, C4 site (downstream AINA stream), was mostly associated with PC 2 due to higher RVA values. A spatial arrangement was associated with RVA and wastewater contamination (cholesterol, coprostanol, epicoprostanol and total sterols), reflecting anthropogenic effects that were associated with PC 1 according to granulometric conditions and a gradient of organic matter.

4. Discussion

The present study revealed a wastewater contamination of the three melt-water streams evidenced by the presence of RVA in surface waters and high concentrations of sterols (like coprostanol and epicoprostanol) in sediments of these aquatic systems located near the BCAA in maritime Antarctica which is likely due to the leaking from the septic tanks to these streams.

Values of granulometric fractions that were found in this study are in agreement with the soil characteristics already determined in previous studies in Fildes peninsula (Michel et al., 2014). A low content of TOM was observed in the sediments of the three melt-water streams which is in agreement with previous studies performed in Fildes peninsula where similar percentages of TOM were observed (Cury et al., 2014; Michel et al., 2014).

The wastewater contains human effluents and associated nutrients (nitrogen, phosphorous), microorganisms (including potential pathogens), organic matter, detergents, heavy metals, disinfection by-products and hydrocarbons (Smith and Riddle, 2009). It is estimated that an adult usually excretes between 1.0 and 1.6 g of phosphorus

Table 2
Concentrations of steroids ($\mu\text{g g}^{-1}$) in surface sediments and rotavirus (gc L^{-1}) in surface waters from the three melt-water streams of the BCAA.

	C0	C1	C2	C3	C4	C5-9	C6	C7	C8	C10	C11
Rotavirus	ND	ND	ND	ND	5.1×10^5	ND	1.2×10^5	3.2×10^5	1.6×10^5	ND	2.3×10^5
Coprostanol	0.03	0.07	0.03	0.07	0.03	<LD	<LD	3.31	1.70	0.03	0.04
Epicoprostanol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.62	0.92	0.35	<LD	<LD
Cholesterol	0.25	0.40	0.17	<LD	0.23	0.06	3.18	1.00	0.64	0.30	0.32
Cholestanol	0.07	0.14	0.05	0.12	0.04	0.04	0.48	0.36	0.28	0.17	0.10
Total OLS	0.35	0.60	0.25	0.20	0.29	0.09	4.28	5.59	2.97	0.50	0.47
Coprostanone	<LD	0.02	<LD	0.02	<LD	<LD	1.09	1.44	0.90	<LD	0.04
Cholestanone	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0.11	0.05	0.12	<LD	<LD

<LD: below detection limit.

ND: not detected.

Table 3
Steroids diagnostic ratios for surface sediment samples of the BCAA sites and threshold values reported in the literature.

	Sites											Threshold levels	Reference
	C0	C1	C2	C3	C4	C5-9	C6	C7	C8	C10	C11		
Coprostanol/(Coprostanol + Cholestanol)	0.32	0.32	0.41	0.38	0.41	N.C.	N.C.	0.90	0.86	0.17	0.30	<0.30 = pristine environments >0.50 = sewage contamination	Grimalt et al. (1990) Leeming et al. (1998)
Coprostanol/(Coprostanol + Cholesterol)	0.11	0.14	0.16	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.77	0.73	0.10	0.12	>0.50 = sewage contamination	Takada et al. (1994)
Coprostanol/Epicoprostanol	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	3.60	4.85	N.C.	N.C.	>2.5 = sewage contamination	Venkatesan and Santiago (1989)
% (Coprostanol + Epicoprostanol)/Total OLS	9.03	10.93	13.21	38.07	9.56	N.C.	14.49	75.79	69.10	6.84	9.38	>50% = high sewage contamination	Venkatesan and Kaplan (1990)
Coprostanone/(Coprostanone + Cholestanone)	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.91	0.97	0.88	N.C.	N.C.	<0.3 = not contaminated >0.7 = contaminated	Grimalt et al. (1990)

N.C.: not calculated.

per day (approximately 548 g person/year) (Jönsson and Vinnerås, 2004) which is disposed to the environment through the contributions of sewage. In addition, detergents ("grey waters") containing phosphorus correspond to another source of this element to the system since phosphorus content in detergents range from 5% to 9%. Considering the total phosphorus determination in the present study, the higher values observed in the Kitchen melt-water stream in a gradient manner suggests that there is an input of this element along this melt-water stream with an accumulation in the downstream collection site (C8). Anthropogenic phosphorus inputs can modify their natural cycle promoting eutrophication processes in aquatic environments (Rockström et al., 2009). In addition, the input of sewage and grey water derived pollutants can have a broad spectrum of ecological impacts at many different trophic levels from bacteria to invertebrates in Antarctic ecosystems (Tin et al., 2009).

Coprostanol has been used as a biomarker of sewage contamination in several environmental studies (Frena et al., 2016; Martins et al., 2014; Peng et al., 2005) and the threshold of the concentration to be considered as "significant" wastewater contamination has been determined as $>0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (González-Oreja and Saiz-Salinas, 1998) with values $<0.30 \mu\text{g g}^{-1}$ indicating uncontaminated environments. Based on this threshold, stations C7 and C8 evidenced wastewater contamination of the sediments of the Kitchen melt-water stream. High concentrations like that detected in site C7 and C8 have been detected in sediments analyzed in other research stations in the Antarctic region even up to 2 km

from the macerated wastewater outfall, evidencing that initial dilution and rapid dispersal of this wastewater is not enough to mitigate the impact of sewage in sediments of the surrounding area of this outfall (Hughes and Thompson, 2004; Stark et al., 2016). On the other hand, the low concentration of coprostanol observed in the others sites of the three melt-water streams are in agreement with results obtained for uncontaminated sediments in Admiralty Bay, Antarctica (Martins et al., 2014; Montone et al., 2010). All diagnostic ratios showed that high levels of sewage contamination are restricted to stations C7 and C8, with the presence of fecal sterols of human origin (coprostanol/epicoprostanol > 2.5 and coprostanol $> 0.10 \mu\text{g g}^{-1}$) (Martins et al., 2014; Venkatesan and Santiago, 1989). The high fecal contamination in stations C7 and C8 located in the Kitchen melt-water stream can be attributable to the leaking of the kitchen septic tank (as confirmed by visual observation) and its proximity to these sites. When the BCAA is crowded, the kitchen septic tank exceeds its capacity and by the slope of the ground, a fraction of fecal material may runoff to this melt-water stream and accumulates in sediments.

The relatively high concentrations of RVA reported in this study are similar to those detected in raw sewage in several studies performed worldwide, suggesting the transport of this virus from symptomatic or asymptomatic people to the septic tank and by leaking to the melt-water streams of the BCAA (Barril et al., 2015; Victoria et al., 2014; Zhou et al., 2016). Unfortunately we were not able to determine the genotype of these strains through a nested PCR with primers towards the VP4 and VP7 genes (Gómara et al., 2001; Simmonds et al., 2008; WHO, 2009) since these samples gave negative results for this assay (data not shown). Previous comparison of the qPCR used in this study with conventional nested PCR evidenced the higher sensitivity of the former assay (Fumian et al., 2011; Zeng et al., 2008). The highest concentration of RVA that was observed at the end of the expedition in C2 could be originated by the accumulation of RVA excreted for several days from an infected person hosted in the AINA building of the BCAA. This is the first study in which a human enteric virus was detected in the Antarctic

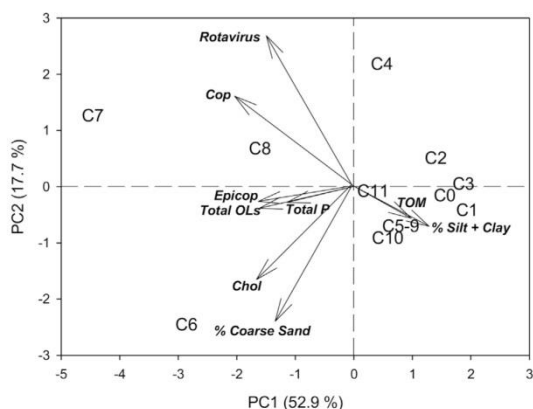


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of steroids, rotavirus, sediment grain size, total organic matter (TOM) and total phosphorus (P) from the three melt-water streams located at the BCAA.

Table 4
Values of the eigenvectors of each variable according to the PCA results.

Variable ^a	PC1	PC2
Rotavirus	-0.235	0.541
TOM	0.19	-0.123
Total P	-0.301	-0.055
% silt + clay	0.244	-0.147
% coarse sand	-0.191	-0.548
Cop	-0.384	0.36
Epicop	-0.477	-0.027
Chol	-0.34	-0.483
Total OLS	-0.481	-0.056

^a Abbreviations are the same of Tables 1 and 2.

continent evidencing that the contamination of environmental waters with these viruses is possible even in isolated regions like this one. Further studies are needed to determine if this RVA detection was an isolated event or it is frequently excreted by people residing in the BCAA.

Based on the PCA results, two groups were observed, the first corresponding to stations impacted by wastewater and where rotavirus and sterols were detected (C7 and C8) and a second group with no evidence of pollution. In site C6 the dominance of cholesterol together with high levels of epicoprostanol and coprostanone can be attributed to higher vertebrate's signatures, probably penguins and skuas that can be seen closed to the BCAA. High levels of cholesterol, epicoprostanol and 5 β -coprostanone in Antarctic coastal sediments have been related to the feces of marine mammals (seals and whales) and penguins or other birds (Green and Nichols, 1995). The absence of coprostanol in this site and the low value of the percentage of coprostanol + epicoprostanol in total sterols supports that this contamination is due to the presence of these vertebrates (Venkatesan and Santiago, 1989; Green and Nichols, 1995). C4 and C11 was RVA contaminated but with low concentration of coprostanol. This is likely due to the occurrence of recent sewage input and fecal contamination in surface waters with low accumulation of fecal material in the sediments along the time. Interestingly, through the PCA results it is suggested that there is a positive association between the presence of RVA in surface water and coprostanol in sediments in most of the analyzed samples, emphasizing the complementation of using the two different matrices for sewage contamination assessment.

Only a few studies worldwide determined the presence of both sterols and enteric viruses for accessing the fecal pollution in the environment, however this is the first that performed this approach in the Antarctic continent (Rusiñol et al., 2016; Souza et al., 2012). The complementation of these two kind of fecal indicators in our work was important since the presence of enteric viruses in the water of these streams suggests a relatively recent fecal contamination and high concentrations of sterols in the sediment suggests a prolonged presence of fecal material. This is a pilot study performed during one expedition which lasted 10 days in the Antarctic station. A limitation of our study was that we only performed one sample collection due to the logistic of the journey to the Antarctic continent and a temporal variation of the concentration of fecal sterols is likely to occur mainly due to the occupational level of the BCAA Station. The data obtained in this study is being using to promote environmental management strategies in order to reduce the wastewater contamination.

In the Antarctic systems, sewage waste and 'grey water' are originated from scientific stations toilets, laundry facilities, accommodation and cooking areas. According to the Madrid Protocol (1991), sewage and domestic liquid waste must not be discharged on to sea ice, ice shelves or grounded ice-sheets, but may be discharged into the marine environment provided that the conditions are favorable for initial dilution and rapid dispersal.

Further studies are needed at the BCAA and other research stations in order to determine the spread of these two sewage indicators along the melt-water streams and in the marine adjacent coastal area in order to determine the impact of human activities and ecological effect in these Antarctic aquatic environments.

5. Conclusions

This study shows the presence of both virological and organic molecular markers of fecal contamination in surface waters and sediments of three melt-water streams in the vicinity of the Uruguayan research station in the Antarctica. Our results highlight the relevance of performing the complementary analysis of these two indicators in two different matrices to a more reliable assessment of wastewater pollution and management in Antarctic environments.

Acknowledgments

We thank the Instituto Antártico Uruguayo (IAU) (P-DCC-15) for providing logistic and financial support. The BCAA crew "Antarkos XXXI" is especially acknowledged by their support during sampling campaign. We also acknowledge support from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Dedicación Total, UdeLaR), Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) (5000005779) and Sistema Nacional de Investigadores, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (SNI-ANII). Also, we want to thank our colleagues from the LAQUIMAR and the LabQOM of the Oceanographic Institute of Sao Paulo University for their help with sediment chemical analyses.

References

- Barril, P.A., Fumian, T.M., Prez, V.E., Gil, P.I., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Ferreyra, L.J., Ré, V.E., Miagostovich, M., Pavan, J.V., Nates, S.V., 2015. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ. Res.* 138, 409–415.
- Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R.M., 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (3), 295–301.
- Braun, C., Mustafa, O., Nordt, A., Pfeiffer, S., Peter, H.-U., 2012. Environmental monitoring and management proposals for the Fildes region (King George Island, Antarctica). *Polar Res.* 31:18206. <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v31i0.18206>.
- Braun, C., Hertel, F., Mustafa, O., Nordt, A., Pfeiffer, S., Peter, H.-U., 2014. In: Tin, et al. (Eds.), *Environmental assessment and management challenges of the Fildes Peninsula Region*. Antarctic Futures, Springer Media, Dordrecht, pp. 169–191. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6582-5_7.
- Byers, S.C., Mills, E.L., Sewart, P.L., 1978. A comparison of methods to determining organic carbon in marine sediments, with suggestion for a standard method. *Hydrobiologia* 58, 37–43.
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 1994. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth (144 pp.).
- Curry, J.C., Jurelevicius, D.A., Villela, H.D.M., Jesus, H.E., Peixoto, R.S., Schaefer, C.E.G.R., Bicego, M.C., Seldin, L., Rosado, A.S., 2014. Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller Peninsula, South Shetland Islands. *Antarct. Sci.* 1–14.
- Dai, Y.C., Xu, Q.H., Wu, X.B., Hu, G.F., Tang, Y.L., Li, J.D., Chen, Q., Nie, J., 2010. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch. Virol.* 155 (6), 977–982.
- Delille, D., Delille, E., 2000. Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding the Dumont d'Urville permanent station (Adelie Land). *Mar. Pollut. Bull.* 40, 869–872.
- Frena, M., Bataglioli, G.A., Tonietto, A.E., Eberlin, M.N., Alexandre, M.R., Madureira, L.A., 2016. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). *Sci. Total Environ.* 544, 432–438.
- Fumian, T.M., Leite, J.P., Rose, T.L., Prado, T., Miagostovich, M.P., 2011. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res.* 45 (17), 5755–5763.
- Gómara, M.I., Cubitt, D., Desselberger, U., Gray, J., 2001. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J. Clin. Microbiol.* 39 (10), 3796–3798.
- González-Oreja, J.A., Saiz-Salinas, J.I., 1998. Short-term patio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 868–875.
- Green, G., Nichols, P.D., 1995. Hydrocarbons and sterols in marine sediments and soils at Davis Station, Antarctica: a survey for human-derived contaminants. *Antarct. Sci.* 7, 137–144.
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Boyona, J.P., Albraiges, J., 1990. Assessment of faecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 19, 90–96.
- Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E., Ohgaki, S., 2009. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J. Virol. Methods* 160 (1–2), 206–209.
- Hemroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (9), 4523–4533.
- Howington, J.P., Mcfeters, G.A., Barry, J.P., Smith, J.J., 1992. Distribution of McMurdo Station sewage plume. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 324–327.
- Hughes, K.A., Thompson, A., 2004. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and faecal sterol markers. *Environ. Pollut.* 127, 315–321.
- Iaconelli, M., Divizia, M., Della Libera, S., Di Bonito, P., La Rosa, G., 2016. Frequent detection and genetic diversity of human bocavirus in urban sewage samples. *Food Environ. Virol.* 8 (4), 289–295.
- Jönsson, H., Vinnerås, B., 2004. Adapting the nutrient content of urine and faeces in different countries using FAO and Swedish data. Ecosan – Closing the loop. Proceedings of the 2nd International Symposium on Ecological Sanitation, Incorporating the 1st IWA Specialist Group Conference on Sustainable Sanitation, 7th–11th April 2003, Lübeck, Germany, pp. 623–626.

- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3), 1033–1093.
- Kawakami, S.K., Montone, R.C., 2002. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal sterols in marine sediments. *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 226–232.
- Leeming, R., Nichols, P.D., Ashbolt, N.J., 1998. Distinguishing sources of faecal pollution in Australian inland and coastal waters using sterol biomarkers and microbial faecal indicators. CSIRO Report 98 and WSAA Report 204. Water Services Association of Australia, Melbourne (46 pp).
- Leeming, R., Stark, J.S., Smith, J.J., 2015. Novel use of faecal sterols to assess human faecal contamination in Antarctica: a likelihood assessment matrix for environmental monitoring. *Antarct. Sci.* 27 (1), 31–43.
- Madrid Protocol, 1991. Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty.
- Martins, C.C., Aguiar, S.N., Bicego, M.C., Montone, R.C., 2012. Sewage organic markers in surface sediments around the Brazilian Antarctic station: results from the 2009/10 austral summer and historical tendencies. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (12), 2867–2870.
- Martins, C.C., Aguiar, S.N., Wisniewski, E., Ceschim, L.M., Figueira, R.C., Montone, R.C., 2014. Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 78 (1–2), 218–223.
- Martins, C.C., Montone, R., Carvalho, R., Pellizari, V., 2005. Sterols and fecal indicator microorganisms in sediments from Admiralty Bay, Antarctica. *Brazilian Journal Oceanography*—>Braz. J. Oceanogr. 53, 1–12.
- Michel, R.F.M., Schafer, C.E.G.R., López-Martínez, J., Simas, F.N.B., Haus, N.W., Serrano, E., Bockheim, J.G., 2014. Soils and landforms from Fildes Peninsula and Ardley Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology* 225, 76–86.
- Montone, R.C., Martins, C.C., Bicego, M.C., Taniguchi, S., da Silva, D.A., Campos, L.S., Weber, R.R., 2010. Distribution of sewage input in marine sediments around a maritime Antarctic research station indicated by molecular geochemical indicators. *Sci. Total Environ.* 408 (20), 4665–4671.
- Mudge, S.M., Seguel, C.G., 1999. Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1011–1021.
- Muller, G., Kanazawa, A., Teshima, S., 1979. Sedimentary record of fecal pollution in part of Lake Constance by coprostanol determination. *Naturwissenschaften* 66, 520–522.
- Oberste, M.S., Peñaranda, S., Rogers, S.L., Henderson, E., Nix, W.A., 2010. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J. Clin. Virol.* 49 (1), 73–74.
- Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Lee, B., 2005. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 33 (2), 168–171.
- Peng, X., Zhang, G., Mai, B., Hu, J., Li, K., Wang, Z., 2005. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. *Mar. Pollut. Bull.* 50 (8), 856–865.
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., et al., 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461 (7263), 472–475.
- Rusiñol, M., Moriarty, E., Lin, S., Bofill-Mas, S., Gilpin, B., 2016. Human-, ovine-, and bovine-specific viral source tracking tools to discriminate between the major fecal sources in agricultural waters. *Food Environ. Virol.* 8 (1), 34–45.
- Simmonds, M.K., Armah, G., Asmah, R., Banerjee, I., Damanka, S., Esona, M., Gentsch, J.R., Gray, J.J., Kirkwood, C., Page, N., Iturriza-Gómara, M., 2008. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J. Clin. Virol.* 42 (4), 368–373.
- Smith, J.J., Riddle, M.J., 2009. Sewage disposal and wildlife health in Antarctica. In: Kerry, K.R., Riddle, M.J. (Eds.), *Health of Antarctic Wildlife*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 271–315.
- Souza, D.S., Ramos, A.P., Nunes, F.F., Moresco, V., Taniguchi, S., Leal, D.A., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Montone, R.C., Durigan, M., Teixeira, A.L., Pilotto, M.R., Delfino, N., Franco, R.M., Melo, C.M., Baily, A.C., Barardi, C.R., 2012. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2), 153–161.
- Stark, J.S., Bridgen, P., Dunshea, G., Galton-Fenzi, B., Hunter, J., Johnstone, G., King, C., Leeming, R., Palmer, A., Smith, J., Snape, I., Stark, S., Riddle, M., 2016. Dispersal and dilution of wastewater from an ocean outfall at Davis Station, Antarctica, and resulting environmental contamination. *Chemosphere* 152, 142–157.
- Sugio, K., 1973. *Introdução a sedimentologia*. Edgard Blucher, Edusp, São Paulo (317 pp).
- Takada, H., Farrington, J.W., Bothner, M.H., Johnson, C.G., Tripp, B.W., 1994. Transport of sludge-derived organic pollutants to deep-sea sediments at deep water dump site 106. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1062–1072.
- Tin, T., Fleming, Z.L., Hughes, K.A., Ainley, D.G., Convey, P., Moreno, C.A., Pfeiffer, S., Scott, J., Snape, I., 2009. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarct. Sci.* 21 (1), 3–33.
- Tin, T., Lamers, M., Liggett, D., Maher, P.T., Hughes, K.A., 2014. In: Tin, et al. (Eds.), *Setting the scene: human activities, environmental impacts and governance arrangements in Antarctica*. Antarctic Futures, Springer Media, Dordrecht, pp. 1–24 http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6582-5_7.
- USEPA, 1996. Method 3050B. Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soil. Revision 2. December.
- Venkatesan, M.I., Kaplan, I.R., 1990. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, southern California. *Environ. Sci. Technol.* 24, 208–214.
- Venkatesan, M.I., Mirsadeghi, F.H., 1992. Coprostanol as sewage tracer in McMurdo Sound, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 328–333.
- Venkatesan, M.I., Santiago, C.A., 1989. Sterols in oceans sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. *Mar. Biol.* 102, 431–437.
- Victoria, M., Tort, L.F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., 2014. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ. Virol.* 6 (2), 116–124.
- WHO, 2009. *Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods*. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/08.17.
- Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L., Vesikari, T., 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods* 153 (2), 238–240.
- Zhou, N., Lv, D., Wang, S., Lin, X., Bi, Z., Wang, H., Wang, P., Zhang, H., Tao, Z., Hou, P., Song, Y., Xu, A., 2016. Continuous detection and genetic diversity of human rotavirus A in sewage in eastern China, 2013–2014. *Virol. J.* 13 (1), 153.