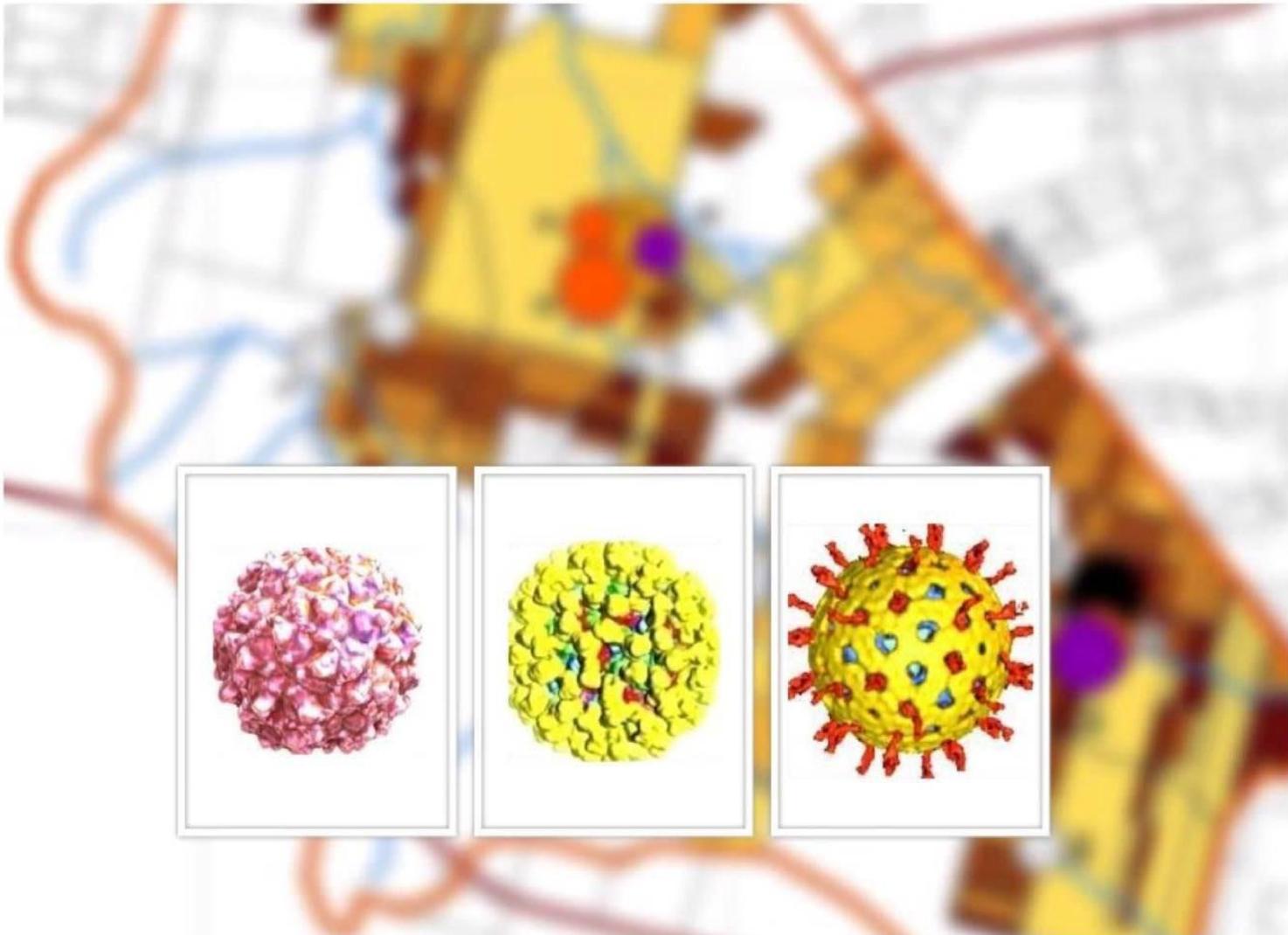


“Virus entéricos en aguas de uso recreacional en un contexto de escasa cobertura de saneamiento en Barros Blancos, Canelones, Uruguay”



Lic. Luciana Gillman

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

“Virus entéricos en aguas de uso recreacional en un contexto de escasa cobertura de saneamiento en Barros Blancos, Canelones, Uruguay”

Lic. Luciana Gillman

Orientador: Dra. Mabel Berois

Sección Virología- Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, 2016

A todos los Uruguayos y Uruguayas que con sus impuestos han financiado toda mi formación pública, gratuita y de calidad. Sobre todo a los que aún no han podido acceder a la Universidad.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1	Agua y Salud.....	1
1.2	Virus y ambiente	2
1.2.1	Norovirus.....	4
1.2.1.1	Aspectos generales.....	4
1.2.1.2	Biología Viral	5
1.2.1.3	Epidemiología.....	7
1.2.1.4	Norovirus en el ambiente.....	8
1.2.2	Rotavirus	10
1.2.2.1	Aspectos Generales	10
1.2.2.2	Biología Viral	10
1.2.2.3	Epidemiología.....	13
1.2.2.4	Rotavirus en el ambiente	15
1.2.3	Picobirnavirus	17
1.2.3.1	Aspectos Generales	17
1.2.3.2	Biología Viral	17
1.2.3.3	Epidemiología.....	19
1.2.3.4	Picobirnavirus en el ambiente	22
1.3	Virus y ambiente en Uruguay	23
1.3.1	Área de estudio.....	24
2.	Hipótesis	27
3.	Objetivos.....	27
3.1	Objetivo general.....	27
3.2	Objetivos específicos	27
4.	Metodología.....	28
4.1	Diseño del muestreo.....	28

4.2	Procesamiento de muestras	30
4.2.1	Concentración de partículas virales	30
4.2.2	Extracción del genoma viral	31
4.2.3	Obtención de ADNc.....	31
4.2.4	Fago PP7.....	32
4.2.4.1	Obtención de stock de fago.....	32
4.2.4.2	PCR en tiempo final	32
4.2.5	Caracterización molecular.....	33
4.2.5.1	PCR en tiempo final	33
4.2.5.1.1	Norovirus	33
4.2.5.1.2	Rotavirus.....	34
4.2.5.1.3	Picobirnavirus.....	35
4.2.5.2	Análisis de los productos de amplificación genómica	36
4.2.6	Cuantificación viral	36
4.2.6.1	Norovirus.....	37
4.2.6.2	Rotavirus.....	37
4.3	Mapas y análisis estadístico.....	38
5.	Resultados.....	39
5.1	Presencia de virus entéricos en las aguas de Barros Blancos.....	40
5.2	Incidencia de factores ambientales en la presencia de virus entéricos	57
6.	Discusión.....	68
7.	Conclusiones.....	79
8.	Perspectivas	81
9.	Bibliografía	82
10.	Anexo.....	94

Índice de Tablas

Tabla 1: Ejemplos de trabajos a nivel mundial de detección de Norovirus en matrices ambientales.....	8
Tabla 2: Ejemplos de trabajos a nivel mundial de detección de Rotavirus en matrices ambientales.....	15
Tabla 3: Trabajos a nivel mundial de detección de Picobirnavirus en matrices ambientales.....	22
Tabla 4: Trabajos de detección viral en agua realizados en Uruguay.	23
Tabla 5: Categorización a priori de los cuerpos de agua estudiados.	29
Tabla 6: Información sobre los puntos de toma de muestra.	30
Tabla 7: Cebadores utilizados en la PCR para detección del fago PP7.....	32
Tabla 8: Cebadores utilizados para la amplificación de la región D de Norovirus.....	33
Tabla 9: Cebadores utilizados para la amplificación de una región de los genes que codifican para las proteínas de la cápside VP4 y VP7 de Rotavirus.	34
Tabla 10: Cebadores utilizados para la amplificación del GI y GII de PBV.....	35
Tabla 11: Cebadores utilizados para la amplificación del GII de PBV.....	35
Tabla 12: Cebadores y sondas utilizadas para la amplificación y cuantificación del GI y GII de NoV.....	37
Tabla 13: Cebadores y sondas utilizadas para la amplificación y cuantificación de RV.	38
Tabla 14: Condiciones meteorológicas en cada muestreo.	39
Tabla 15: Identificación genotípica por análisis de secuencias.	41
Tabla 16: Muestras positivas para el genogrupo I y II de PBV.....	47
Tabla 17: Datos de cuantificación de Norovirus Genogrupo I considerados por muestreo y microcuenca.	53
Tabla 18: Datos de cuantificación de Norovirus Genogrupo II considerados por muestreo y microcuenca.	54
Tabla 19: Datos de cuantificación de Rotavirus considerados por muestreo y microcuenca.....	55
Tabla 20: Resultados del test de Tukey's para NoV.....	63
Tabla 21. Condiciones meteorológicas en cada muestreo.	64
Tabla 22. Resultados del test de Mann-Whitney para RV.	66

Tabla A 1. Información sobre los sitios de toma de muestra.....	94
Tabla A 2: Cuantificación de Norovirus genogrupo I y II.....	97
Tabla A 3:Cuantificación de Rotavirus.	97

Índice de Figuras

Figura 1: Primera imagen de Norwalk virus.	4
Figura 2: Organización del genoma de Norovirus humano.	5
Figura 3: Modelo de la cápside y de VP1 de Norovirus.	6
Figura 4: Microscopía Electrónica de Rotavirus.....	10
Figura 5: Perfil electroforético del genoma de Rotavirus grupo A.....	11
Figura 6: Características estructurales de Rotavirus.	12
Figura 7: Emisiones totales de Rotavirus.	15
Figura 8: Migración del ARN genómico de sepas de Picobimavirus Porcino.....	18
Figura 9: Comparación de los ORF del segmento mayor y menor de los PBVs secuenciados.	18
Figura 10: Superficie de la partícula similar a virus de PBV.	19
Figura 11: Distribución global de PBV.....	20
Figura 12: Zona de estudio.....	26
Figura 13: Mapa de la zona de estudio.....	29
Figura 14: Detección molecular del Fago PP7 en muestras ambientales de Barros Blancos.....	39
Figura 15: Detección molecular del genoma de Rotavirus en muestras ambientales de Barrios Blancos.....	40
Figura 16: Distribución de G y P-tipos.	41
Figura 17: Análisis filogenéticos de las secuencias del gen que codifica para la proteína VP4...44	
Figura 18: Análisis filogenéticos de las secuencias del gen que codifica para la proteína VP7...45	
Figura 19: Detección molecular del genoma de Picobirnavirus genogrupo I y II en muestras ambientales de Barros Blancos.....	46
Figura 20: Análisis filogenético de PBV genogrupo I.	48
Figura 21: Análisis filogenético de PBV genogrupo II.....	49
Figura 22: Alineamiento realizado con las secuencias proteicas de la RdRp obtenidas mediante la traducción de las secuencias de ADN presentes en la base de datos para el genogrupo II de PBV.	50
Figura 23: Evolución de la cuantificación viral.....	56
Figura 24: Virus en el territorio.....	61
Figura 25: Gráficas mostrando los datos de cuantificación de copias genómicas de virus por muestreo.....	63

Figura 26: Cuantificación viral por muestreo en función de las precipitaciones.....	64
Figura 27: Cuantificación viral por muestreo en función de temperatura.	64
Figura 28: Gráficas mostrando los datos de cuantificación de copias genómicas por virus por categoría.....	65
Figura 29: Correlación Binaria y predicción lineal con intervalos de confianza para RV versus CF	67
Figura A 1: Mapa del relieve del territorio de estudio.	98

Abreviaturas

A – adenosina
ADN – ácido desoxirribonucleico
ADNc – ADN copia
ANII– Agencia Nacional de Investigación e Innovación
ARN – ácido ribonucleico
ARNm – ARN mensajeros
BPBV – Picobirnavirus bovino
C – citosina
Ca²⁺ – calcio
Cg – copas genómicas
CEUTA – Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas
CF –Coliformes Fecales
DLP “Double Layer Particle” – partícula doble capa
dNTP – deoxiribonucleotidos trifosfato
EI –Enterococos Intestinales
G – guanina
GI – genogrupo I
GII – genogrupo II
H₂O – agua
H₂O_{dd} – agua bidestilada
HBGA – Antigenos de grupo histo- sanguineo
HCl – ácido clorhídrico
HPBV – Picobirnavirus humanos
ICC – Cultivo Celular Integrado
ICTV “International Committee on Taxonomy of Viruses” – Comité Internacional de Taxonomía Viral
INE – Instituto Nacional de Estadística
KCl – cloruro de potasio
kDa – kilo Dalton
log – logaritmo en base 10
LPBV – Picobirnavirus de conejo
mg – miligramos
MgCl₂ – cloruro de magnesio
Min – minutos
mL – mililitro
mM - milimolar
nm – nanómetro
NoV – Norovirus
NoVGI – Norovirus genogrupo I
NoVGII – Norovirus genogrupo II
OMS – organización mundial de la salud
OPBV – Picobimavirus de león marino

ORF "Open Reading Frame" – marco abierto de lectura
PAGE "Polyacrylamide gel electrophoresis" – Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb – pares de bases
PBS – Buffer Fosfato Salino
PBV-Picobirnavirus
PCR – reacción en cadena de la polimerasa
PP7 – Bacteriofago PP7
qPCR – PCR cuantitativa
RdRp – ARN polimerasa ARN dependiente
RT-PCR – retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
Seg – segundos
SLP "Single Layer Particle" – partícula doble capa
T – timina
TLP "Triple Layer Particle" – partículas de triple capa
U – unidades
UFC – unidades formadoras de colonia
UV – ultravioleta
 μL – microlitro
 μM – micromolar
 $^{\circ}\text{C}$ – grado Celsius

Resumen

Norovirus, Picobirnavirus y Rotavirus son virus entéricos que causan gastroenteritis aguda en diferentes mamíferos entre los cuales se encuentra el ser humano. Su vía de transmisión es la fecal-oral, la cual involucra distintas matrices ambientales, entre las que el agua cumple un rol preponderante como vehículo. Al mismo tiempo, la calidad del agua se encuentra fuertemente influenciada por las actividades antrópicas que pueden generar contaminación de este recurso por distintas vías, entre ellas la provocada por aguas residuales y los desechos animales. La circulación de estos virus en la población tanto humana como animal de diferentes regiones de nuestro país ha sido ampliamente registrada. Por su parte, la localidad de Barros Blancos (Departamento de Canelones) se presenta como una ciudad inmersa en una zona semirural sin red de saneamiento además de poseer una importante proporción de asentamientos irregulares lo que conlleva a un manejo inadecuado de las excretas. En este contexto, el estudio de estos virus en matrices ambientales adquiere gran relevancia, más aún si las mismas son utilizadas con fines recreativos.

Con ese fin, muestras de aguas recreacionales fueron obtenidas de 16 sitios distribuidos en el territorio de Barros Blancos en cuatro momentos diferentes. Las partículas virales presentes en las muestras fueron concentradas mediante ultracentrifugación, para luego ser caracterizadas molecularmente y cuantificadas por PCR cualitativa y cuantitativa, respectivamente. Los datos de cuantificación viral fueron analizados en relación a los valores de concentración de los indicadores microbiológicos de contaminación fecal, así como con factores ambientales como temperatura y pluviometría.

Los resultados muestran que el 90% de las muestras fueron positivas para al menos un virus y que los mismos están distribuidos en todo el territorio estudiado. La caracterización molecular de Rotavirus mostró que en Barros Blancos durante el período de estudio circularon cepas de origen bovino y humano. Además se detectó la co-circulación de dos variantes de Picobirnavirus genogrupo II en una misma microcuenca. La cuantificación reveló que la concentración de Norovirus detectada disminuyó a medida que aumentó la temperatura ambiente mientras que para Rotavirus se mantuvo constante, lo cual podría ser explicado considerando la viabilidad de esta partícula viral. Además, las precipitaciones no provocaron un aumento en las concentraciones virales detectadas, que es un efecto esperable por la escorrentía y re suspensión de sedimentos. Los análisis estadísticos revelaron que el Rotavirus mostró una correlación positiva con los indicadores microbiológicos de contaminación fecal de agua. Así mismo, se observó que si bien la contaminación se extiende a todo el territorio estudiado, las microcuencas Cañada C y Tajamar Caputo resultaron las de

mayor carga viral, siendo las mismas las de mayor uso en recreación. Estos resultados tomados en conjunto sugieren fuertemente que las aguas recreacionales de Barros Blancos son una fuente de contaminación fecal para la población que las utiliza y por tanto de potencial transmisión de los virus estudiados.

1. Introducción

1.1 Agua y Salud

Las diferentes actividades que el ser humano desarrolla para satisfacer sus necesidades que involucran tanto la industria, la agricultura como las vinculadas a la vida urbana son generadoras de residuos. Estos residuos causan daños crecientes a las diversas matrices ambientales como son el suelo, el aire y el agua. Dada la escasez en el Planeta Tierra del agua dulce y su esencialidad para la vida, la investigación en los impactos sufridos por esta matriz y los estudios que involucran la prevención de la contaminación se han incrementado en las últimas décadas a nivel mundial. Debido a ello, el agua se ha convertido en el centro de grandes debates en el escenario internacional tanto a nivel científico como a nivel político. Tal es así que las Naciones Unidas en el 2010, reconoció explícitamente el derecho humano al agua y al saneamiento, reafirmando que el agua potable y el saneamiento son esenciales para la realización de todos los derechos humanos [1]. Así mismo esta organización internacional se ha propuesto dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible para el 2030 garantizar el acceso a servicios de saneamiento e higiene adecuados y equitativos para todos y poner fin a la defecación al aire libre [2].

Por su parte, los ambientes acuáticos como lagos, cañadas y costas marinas son susceptibles a la contaminación fecal. Dicha contaminación tiene como origen una gran variedad de fuentes puntuales y no puntuales, entre las que se encuentra la contribución potencial de desechos de animales silvestres, domésticos y humanos. Estos desechos pueden entrar al ambiente mediante la combinación de derrame de aguas residuales (debido a la falta de saneamiento y cámaras sépticas) así como también de derrame de las propias plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. Como resultado de numerosas fuentes potenciales, muchas aguas ambientales, incluso las que aparentan estar inmaculadas, pueden contener trazas importantes de contaminación fecal de diversas fuentes [3]. En este sentido hay que prestar especial atención a las aguas recreacionales. Se calcula que una persona que se baña durante 10 minutos y realiza 3 inmersiones de cabeza se traga involuntariamente hasta 100 o 200 mililitros (mL) de agua, siendo los niños un grupo particularmente vulnerable porque juegan en el agua por períodos prolongados y son más susceptibles a tragar agua tanto de manera accidental como voluntaria. Si dicha exposición se realiza en aguas contaminadas puede provocar a los bañistas enfermedades gastrointestinales y con menor frecuencia infecciones respiratorias y auditivas [4].

La pobre calidad del agua es la mayor amenaza para la salud humana, esta matriz tiene tal relevancia a nivel de salud pública que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el planeta se producen 3,4 millones de muertes anuales relacionadas a la transmisión de patógenos mediante agua contaminada, incluyendo virus, bacterias y protozoos [4]. Dentro de las afecciones que estos causan se encuentran las enfermedades diarreicas las cuales son responsables de 1,5 millones de muertes de seres humanos por año. Estimándose que el 58% de estas muertes son atribuibles a aspectos sanitarios como el suministro de agua potable alterada y la mala higiene. Estos datos informan además la existencia de una mortalidad anual de 361.000 niños por debajo de los 5 años de edad provenientes principalmente de países en desarrollo [5]. Por otro lado, la cuarta parte de la morbilidad mundial en la población general y más de un tercio de la carga de morbilidad infantil son consecuencia de factores ambientales modificables siendo esta cifra más elevada en los países en desarrollo que en los desarrollados. Mientras que la morbilidad total a nivel mundial relacionada con diarrea es alrededor del 4%, un 94% de la misma se encuentra relacionada a factores ambientales modificables como el consumo de agua potable, el saneamiento y la higiene. Siendo las diarreas las responsables del 29% de la morbilidad relacionada con el medio ambiente en niños comprendidos entre 0 a 14 años de edad [6].

1.2 Virus y ambiente

Por lo expresado anteriormente, es fundamental poseer una adecuada evaluación de las aguas utilizadas para baño. Así mismo, la aptitud de los indicadores que son analizados comúnmente para evaluar el nivel de contaminación fecal ambiental, como los Coliformes Fecales (entre los que se encuentra *Escherichia sp*) y los Estreptococos Fecales, como los *Enterococcus*, ha sido cuestionada. Apoyan este cuestionamiento, hechos como que las bacterias son más sensibles que los patógenos virales y protozoos a la inactivación por la luz solar y a los procesos de tratamiento de aguas, sumado a que las mismas pueden encontrarse en ausencia de contaminación fecal, tienen la habilidad de multiplicarse en algunos ambientes fuera del huésped, y poseen baja correlación con la presencia de otros patógenos como ser virus [7]. Por ello, investigar en matrices acuáticas la presencia de virus que estén involucrados en las afecciones gastrointestinales es de relevancia para la salud pública. Estos microorganismos además poseen dos características relevantes, su especificidad de huésped y su incapacidad de multiplicarse en el ambiente [8].

Los virus llegan al ambiente y por tanto a fuentes de agua cuando personas o animales infectados depositan los mismos en las heces. Algunos de estos virus mantienen su infectividad por períodos de tiempo largos (meses a años). Además, habitualmente estos patógenos se encuentran en bajas concentraciones en aguas superficiales lo que provee un desafío para su detección y un problema para la salud pública. Otros riesgos adicionales de los virus son su mayor resistencia a los métodos de desinfección como

el cloro y su asociación a matrices de partículas en suspensión o en matrices solidadas. Estas últimas tienden a mantener la viabilidad de estos patógenos por más tiempo que si se mantuvieran dispersos en el agua [9]. Estas características hacen que la calidad microbiológica del agua se encuentre fuertemente influenciada por las lluvias, que en ciertos períodos pueden elevar la contaminación fecal a causa de la solubilización de los sedimentos, o por escorrentía [4].

Más de cien patógenos virales son excretados en heces a partir de humanos y animales infectados de los cuales los más comúnmente reportados en epidemias relacionadas con el agua son Norovirus (NoV), Hepatitis A, Hepatitis E, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus y Rotavirus (RV) [3], [10]. Según datos publicados Norovirus es responsable del 45% de los brotes de gastroenteritis con origen en aguas recreacionales contaminadas, constituyéndose así en el mayor agente causal de estos brotes [11]. Además, tanto los Norovirus como los Rotavirus poseen una dosis infectiva baja y son liberados en grandes cantidades en las heces de los individuos infectados [12], [13].

1.2.1 Norovirus

1.2.1.1 Aspectos generales

Aunque sus síntomas ya habían sido descritos previamente en 1929 como la *enfermedad del vómito de invierno* [14], no fue hasta 1972 que se pudo identificar al agente etiológico causal de esta dolencia. Cuando Kapikan utilizando la técnica de Inmuno Microscopía Electrónica, Figura 1, analizó una muestra filtrada que derivaba de un brote de gastroenteritis no bacteriano ocurrido en Norwalk, Ohio-EEUU [15]. En 1998 el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV del inglés “International Committee on Taxonomy of Viruses”) introdujo a los Norwalk-like virus como una especie dentro de la familia *Caliciviridae* [16], y cuatro años más tarde designó a estos virus con el nombre de Norovirus [17].

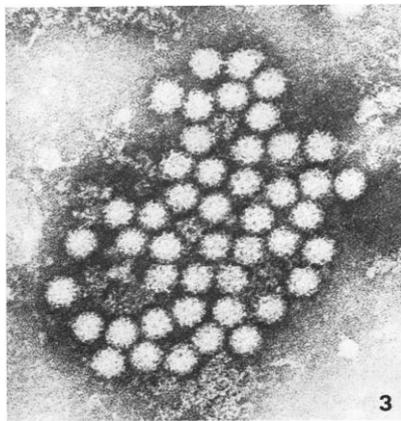


Figura 1: Primera imagen de Norwalk virus. Obtenida mediante Inmuno Microscopía Electrónica. Tomada de Kapiakian, 1972 [15].

Actualmente, la familia *Caliciviridae* está constituida por 5 géneros que causan un gran número de enfermedades en una cantidad importante de huéspedes animales diferentes y comparten características comunes [17]. Por un lado, su cápside icosaédrica desnuda de entre 27-40 nm de diámetro constituida por una proteína estructural principal que conforma 32 depresiones en forma de copa, característica morfológica que da nombre a la familia. Por otro, la ausencia de CAP (5 metilguanosina) en el extremo 5' del genoma ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva donde contiene una proteína VPg enlazada covalentemente que es esencial para que estos virus sean infectivos [16], [18].

Dentro de esta familia los Norovirus y Sapovirus son los géneros capaces de infectar humanos [18], siendo los Norovirus los agentes causales de gastroenteritis aguda más común en todas las edades alrededor del mundo [19]. Estos virus se clasifican en base a la secuencia completa del gen de la proteína mayor de la cápside en tres niveles: cepa (S), clúster o genotipo (C) y genogrupo (G) [20]. En base a esto se han descrito 6 genogrupos del I al VI [18] y recientemente se ha propuesto un nuevo genogrupo, GVII

asociado a canes [21]. Los genogrupos G I, II y IV se asocian a enfermedades humanas [20]. En los últimos años el número de secuencias genómicas del virus en las bases públicas de datos ha aumentado considerablemente, como consecuencia se ha expuesto la alta diversidad genética que presentan los Norovirus así como la elevada frecuencia de recombinación genética que sufre su genoma. Por estas razones el Grupo Internacional de Trabajo en Norovirus ha propuesto una nueva nomenclatura dual basada en la secuencia de los marcos abiertos de lectura (ORFs del inglés “Open Reading Frame”) 1 y 2 [22]. También han sido reportadas diferencias específicas entre genogrupos en lo que tiene que ver con la persistencia en el ambiente [23], sensibilidad a la remoción sobre superficie [24] y unión al receptor celular [25]. Estas diferencias biológicas tal vez refuerzan patrones epidemiológicos diferenciales entre los mismos.

1.2.1.2 Biología Viral

El genoma de los Norovirus está constituido por una hebra de ARN de polaridad positiva de entre 7.300-7.500 nucleótidos. El extremo 5' del genoma está covalentemente unido a una proteína conocida como VPg, mientras que el extremo 3' está poliadenilado. Las regiones no codificantes de los extremos del genoma son cortas [26] y contienen estructuras secundarias conservadas [27]. En la Figura 2 se muestra que el genoma de NoV se organiza en tres marcos abiertos de lectura. El ORF 1 codifica para un gran polipéptido, que es procesado para liberar 6 proteínas: cinco no estructurales, entre las que se encuentra la ARN polimerasa -ARN dependiente (RdRp del inglés “RNA-dependent RNA polymerase”), y una estructural, la proteína estructural VPg. Mientras que mediante un ARN subgenómico, que también se observa en la Figura 2, los ORF 2 y 3 son traducidos a las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente [28].

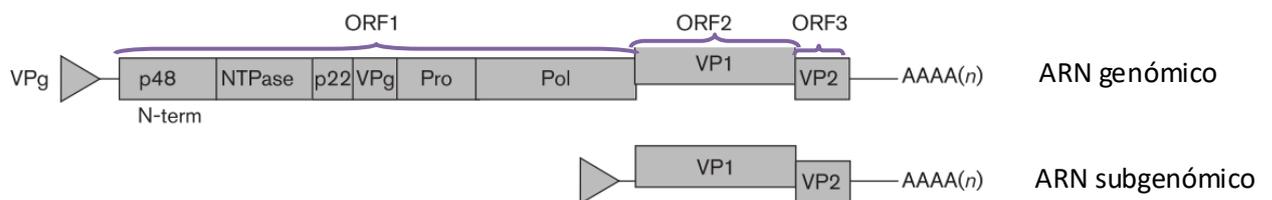


Figura 2: Organización del genoma de Norovirus humano. El genoma está covalentemente unido a la proteína VPg y a una cola poli A. Se divide en tres ORFs. ORF1 se traduce como un polipéptido. ORF2 y ORF3 se traducen mediante un ARN subgenómico. Imagen extraída y modificada de Thome y Goodfellow, 2014 [26].

Por su parte, la proteína VP1 es la proteína mayor de la cápside, la misma posee de 530-555 aminoácidos con un peso molecular de 58-60 kDa. Dos dominios conservados flanquean el dominio central variable que contiene el determinante antigénico, el cual define la cepa específica. Ciento ochenta copias de VP1 se agrupan en dímeros para formar un icosaedro de número de triangulación 3 que constituye la cápside desnuda de los Calicivirus, tanto el dímero de VP1 como la cápside viral se observan en la Figura

3. Los 90 dímeros se agrupan de tal forma que se observan 32 grandes huecos en el eje 5 y 3, estos huecos se ven como una estructura similar a copa en la superficie de estos virus [29]. Para completar el virión una o dos copias de la proteína menor de la cápside VP2 son necesarias. Esta proteína tiene entre 208–268 amino ácidos con un peso molecular calculado de 22-29 kDa y exhibe una extensa variabilidad entre cepas. Evidencias recientes sugieren que VP2 asiste en la encapsidación del genoma y el ensamblado de la cápside [28], [30].

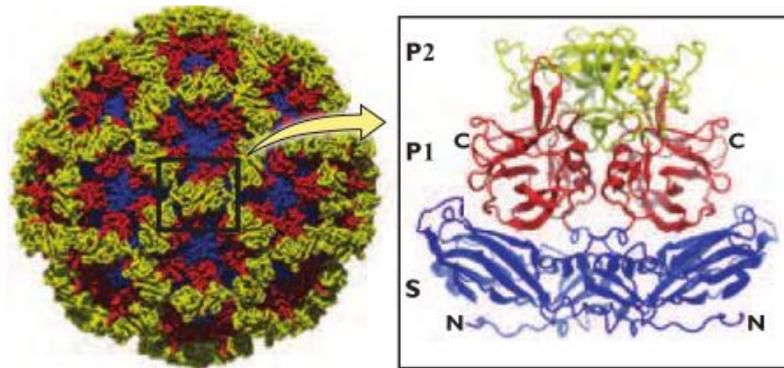


Figura 3: Modelo de la cápside y de VP1 de Norovirus. Izquierda: Modelo de la cápside de Norovirus completa, determinado a una resolución de 3,4 ångström. La cápside está compuesta por 90 dímeros de VP1, con el dominios S y los subdominios P1 y P2 (del dominio P) mostrados en azul, rojo y amarillo, respectivamente. El cuadro en la superficie del virión resalta un dímeros VP1. Derecha: Representación tridimensional del dímero VP1 derivado de cristalografía de rayos X a una resolución de 3,4 ångström de una partícula similar a virus recombinante. Se observa el arco formado por dos brazos de los subdominios P1. El dominio S forma la estructura interna del virión que rodea al genoma de ARN y posiciona el arco en la superficie del virión. Se indica con N y C al extremo C-terminal y N-terminal de VP1. Imagen modificada de Green, 2013 [18].

Por su parte, el ciclo de replicación viral de los Norovirus Humanos no ha podido ser estudiado dada la dificultad de cultivar este virus en células. Por esta razón otros miembros de la familia *Caliciviridae* se han utilizado como modelo. Los Calicivirus se unen a la célula a través de receptores específicos, para los NoV se han identificado como receptores los carbohidratos del antígeno del grupo histo-sanguíneo (HBGA), que se unen a través de la proteína VP1 del virus. Luego de su ingreso los virus liberan su genoma y su traducción se lleva a cabo mediante la maquinaria celular que es reclutada por la proteína VPg. Así mismo, ciertas proteínas virales interaccionan con proteínas celulares para establecer sitios definidos de replicación viral, mientras que la polimerasa viral replica el genoma. Los nuevos genomas ARN sintetizados se unen covalentemente a VPgs y se empaquetan en viriones que son liberados de la célula por lisis. El ciclo replicativo es rápido, las partículas virales producidas pueden ser detectadas algunas horas después de la infección [18].

1.2.1.3 Epidemiología

Los Norovirus son la principal causa de gastroenteritis en países desarrollados y en vías de desarrollo [31], [32]. Una revisión reciente estima que estos virus son los responsables del 18% de las diarreas agudas producidas a nivel mundial y se encuentran en un 7% de las personas sanas [33]. Otra característica clínica importante de los NoVs es su período de incubación relativamente corto en la mayoría de los individuos infectados que desarrollan síntomas, una revisión reciente muestra que la media del período de incubación para el genogrupo I y II es de 1,2 días [34]. Mientras que los principales síntomas causados por el virus son diarrea y vómitos, se han reportado también en menor porcentaje dolor abdominal, náuseas, fiebre, dolor de cabeza, fotofobia, rigidez en el cuello, obnubilación y coagulación intravascular diseminada. Por otro lado, el período de tiempo en el que se desarrollan los síntomas es corto, variando de 2 a 3 días según el brote y el estado de salud previo de los individuos afectados. Por último, la población general de todos los grupos etarios es vulnerable a la enfermedad, pero la mayor morbilidad/mortalidad ocurre en los grupos etarios extremos [35].

Los Norovirus son liberados en heces y en vómitos de los individuos infectados [18]. Luego de su liberación se pueden transmitir directamente (persona-persona) o indirectamente (a través de alimentos, agua o ambientes contaminados). Mediante estas fuentes de transmisión estos patógenos producen brotes especialmente en comunidades cerradas como hogares de ancianos, hospitales, complejos militares y cruceros [36]. Así mismo, algunos estudios han asociado ciertos genotipos de NoV con un modo particular de transmisión [37]. Al mismo tiempo, estos virus son resistentes a condiciones adversas en el ambiente, hecho que se ha podido evidenciar con Norovirus murino que es cultivable. Estudios de estabilidad han mostrado que estos virus son estables en un amplio rango de pH, que para inactivarlos se necesitan 63 °C, que a 4 °C en matriz fecal mantienen su viabilidad durante largos períodos de tiempo y que a temperatura ambiente también son estables [38].

Otro aspecto clave en la epidemiología de estos virus es que desde 1996 han producido 6 pandemias, 1996-1997, 2002, 2004, 2006, 2009 y 2012. Todas ellas fueron causadas por la emergencia de una variante de Norovirus humanos del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) que se expandió rápidamente alrededor del globo. Dada la falta de evidencia de una transmisión zoonótica del virus un reservorio animal sería improbable, por lo que autores proponen que individuos inmunocomprometidos crónicamente infectados son el reservorio de NoV [39].

La circulación de Norovirus en la población uruguaya ha sido estudiada previamente en pacientes con diarrea donde 14,8 % de las 230 muestras colectadas entre los años 2008 -2011 al sur del Uruguay resultaron positivas para el virus y su caracterización

molecular reveló que se trataban de los genotipos GII.12 y GII.4 [40]. Otro trabajo realizado en Montevideo, con muestras colectadas en 2010 y 2011 de niños provenientes de hogares con nivel socioeconómico alto, que mostraban síntomas de gastroenterocolitis, identificó la circulación del virus en esta población [41]. Así mismo, al norte del río Uruguay se ha mostrado la circulación en los años 2010-2011 de cepas recombinantes GII.P7/GII.6 en pacientes pediátricos con gastroenteritis [42].

1.2.1.4 Norovirus en el ambiente

Norovirus fue reportado por primera vez como agente causal de epidemias relacionadas con el agua en un brote que en 1980 afectó aproximadamente a 1.500 personas en una pequeña comunidad de Georgia, EEUU. En este brote la presencia del virus fue demostrada por el incremento del título de anticuerpos contra NoV en los pacientes infectados [43]. Desde ese entonces numerosos estudios se han desarrollado a nivel mundial con el objetivo de detectar estos virus en distintas matrices ambientales. Ejemplos de estos estudios se muestran en la Tabla 1 donde se puede observar la diversidad de matrices que han sido analizadas y las diferentes metodologías de detección utilizadas a nivel mundial. Así mismo en la tabla se observa una sección exclusiva de aguas superficiales que muestra que estos virus han sido detectados previamente en esta matriz en trabajos en todo el mundo. Otro aspecto relevante que alguno de estos trabajos muestran es la estacionalidad de NoV en el ambiente, vinculando su ocurrencia sobre todo a los meses de otoño -invierno [40], [44], [45].

Un factor a tener en cuenta es que hasta el momento todos los estudios ambientales desarrollados para este virus utilizan métodos moleculares para su detección. Dada la dificultad para conseguir cultivar este virus en sustratos celulares, no se han desarrollado técnicas que impliquen corroborar su viabilidad. Se espera que pronto estas técnicas sean desarrolladas ya que recientemente se ha reportado que estos virus son capaces de crecer en células B humanas utilizando, para ingresar a la célula, los glicanos bacterianos de *Enterobacter cloacae* [46].

Tabla 1: Ejemplos de trabajos a nivel mundial de detección de Norovirus en matrices ambientales.

Matriz	Locación	Porcentaje de muestras positivas (concentración en cg/mL)		Metodología	Referencia
		GI	GII		
Aguas subterráneas	Ghana	25		qPCR	Gibson y cols., 2011 [47]
Agua de bebida	Ghana		17		
Agua de bebida clorada	Florianópolis- Brasil	8	8	PCR anidada	Victoria y cols., 2010 [48]
Agua salobre	Florianópolis- Brasil	8		PCR anidada	
Aguas residuales	Estados Unidos, España y Etiopía		100*	Meta genómica	Cantalupo y cols., 2011 [49]
	Córdoba-Argentina		50	PCR anidada	Blanco y cols., 2011. [50]
	Río de Janeiro- Brasil	15		PCR	
		10	23	PCR anidada	Victoria y cols., 2010 [51]
		4	54 (máxima $5,3 \times 10^{-2}$)	qPCR	
Agua residuales tratadas	Florianópolis- Brasil	33 (promedio 0,3)	17 (promedio 0,4)	qPCR	Victoria y cols., 2010 [48]
Aguas residuales en Uruguay	Montevideo	3	30	PCR anidada	Alberti, 2012 [40]
Aguas residuales en Uruguay	Montevideo	13 (promedio 18×10^4)	33 (promedio 15×10^4)	qPCR	
Aguas residuales en Uruguay	Treinta y Tres, Melo, Canelones y Eilda Paullier	10 (máxima $1,5 \times 10^4$)	46 (máxima $9,3 \times 10^4$)	qPCR	Berois y cols., 2013 [52]
	Liberadas en costa del río Uruguay	21 (máxima $4,4 \times 10^5$)	39 (máxima $6,1 \times 10^6$)	qPCR	Britos y cols., 2012 [45]
Aguas superficiales África	Ghana		11	qPCR	Gibson y cols., 2011 [47]
	Sudáfrica	71	67	PCR	Mans y cols., 2013 [53]
Aguas superficiales Asia	Singapur	55	69	PCR anidada	Aw y cols., 2011 [54]
	Japón	53	44	qPCR	Haramoto y cols., 2005 [55]
Aguas superficiales Europa	Todo el continente	4	6	PCR anidada	Wyn-Jones y cols., 2011 [56]
	Inglaterra		32	PCR anidada	Hamza y cols., 2009 [57]
Aguas superficiales América del Norte	México		70*	PCR anidada	Hernandez-Morga y cols., 2009 [58]
	Estados Unidos	1,3	10	qPCR	Corsi y cols., 2014 [59]
Aguas superficiales en la región	Manaos- Brasil		5,8	PCR	Miagostovich y cols., 2008 [60]
	Río de Janeiro- Brasil		33	PCR anidada	Calgua y cols., 2013 [61]
	Río de Janeiro- Brasil		14 (promedio 3,8)	qPCR	Victoria y cols., 2014 [62]
	Florianópolis- Brasil	17	21	PCR anidada	Victoria y cols., 2010 [48]
	Buenos Aires- Argentina		45	PCR anidada	Blanco y cols., 2012 [63]
	Córdoba- Argentina		50	PCR anidada	Blanco y cols., 2011 [50]
	Salta- Argentina		9		
			9 (rango $3,1 \times 10^1 - 6,9 \times 10^2$)	qPCR	Poma y cols., 2012 [44]
Aguas superficiales en Uruguay	Barros Blancos - Uruguay		32	PCR	Alberti, 2012 [40]

*No fue determinado el genotipo.

1.2.2 Rotavirus

1.2.2.1 Aspectos Generales

Al siguiente año del descubrimiento de los Norovirus, los Rotavirus fueron vistos por primera vez mediante Microscopía Electrónica de biopsias intestinales de niños con gastroenteritis aguda en Australia [64]. Más tarde, por su tamaño y forma se los identifica como un virus diferente a los ya descritos y se los llama “Rotavirus” [65]. Como se observa en el Figura 4, son virus desnudos, de simetría icosaédrica conformados por una partícula de alrededor de 75 nm de diámetro.

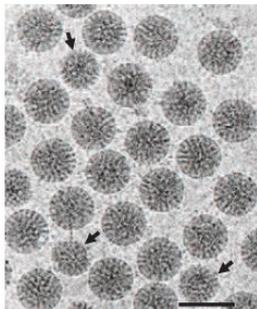


Figura 4: Microscopía Electrónica de Rotavirus. La partícula está compuesta por tres capas concéntricas de proteínas. Partículas de Rotavirus triple capa y una pocas doble capas (flechas) visualizadas en microscopía electrónica. Bar, 100 nm. Figura extraída y modificada de Estes y Greenberg, 2013 [67].

Los Rotavirus se han clasificado como un género dentro de la subfamilia *Sedoreovirinae*, familia *Reoviridae*, a su vez este género se clasifica en 8 grupos los cuales se distinguen por la secuencia de la proteína VP6, estos se denominan alfabéticamente de la A a la H. Los primeros tres grupos, A-C, se han encontrado tanto en animales como en humanos, los grupo D-G se han encontrado hasta la fecha solo en animales y el grupo H que tiene como miembro el nuevo virus llamado “rotavirus de la diarrea adulta” se ha encontrado en humanos [17], [66], [67]. Por su naturaleza de genoma segmentado, el reordenamiento genético en los RV produce distintas combinaciones entre los genes que codifican para las proteínas que constituyen la cápside externa, VP4 y VP7, por esta razón estos virus también se clasifican en diferentes serotipos en un sistema binario según los genes que codifican para estas proteínas, que conforman los P y G tipo, respectivamente. Entre los que se distingue 27 G-tipos y 35 P-tipos circulantes en humanos y animales [67].

1.2.2.2 Biología Viral

Su genoma, Figura 5, está constituido por aproximadamente 18.550 pares de base (pb) de ARN doble hebra que se agrupan en 11 segmentos que codifican para 6 proteínas estructurales y 6 no estructurales. Dichos segmentos son monocistrónicos, con excepción del segmento 11 que codifica para dos proteínas, además los mismos

carecen de señales de poliadenilación, son ricos en A+U, y contienen regiones consenso conservadas en las secuencias no codificantes de los extremos 3' y 5' [67].

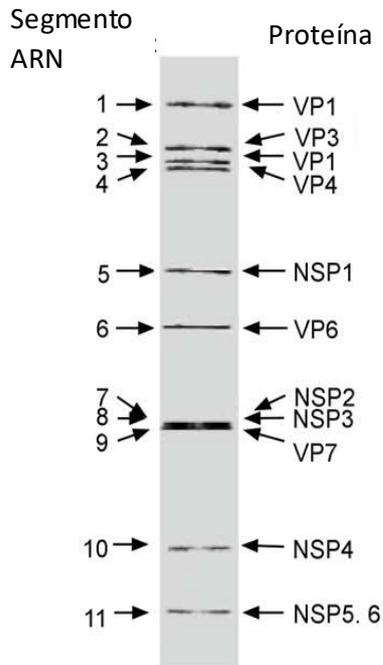


Figura 5: Perfil electroforético del genoma de Rotavirus grupo A. El genoma viral purificado fue analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se muestran los 11 segmentos que conforman el genoma de Rotavirus. Los genes están numerados a la izquierda y se indica la proteína que codifican en el derecha. Imagen extraída y modificada de Jayaram y cols. 2004 [69].

Basados en estudios de criomicroscopía electrónica y datos de reconstrucción de imágenes se ha reconocido la siguiente estructura de simetría icosaédrica compuesta de 3 cápsides proteicas: la interior, la intermedia y la superficial (Figura 6). La capa interior de la partícula viral conforma la estructura que se conoce como de una sola capa (SLP del inglés "Single Layer Particle") compuesta por 120 moléculas de la proteína viral 2 (VP2), agrupada en 60 dímeros, cinco de los dímeros se agrupan en decámeros alrededor del eje 5 de simetría axial donde se encuentran poros formados por VP1 al interior. Dentro del core en el eje 5 de simetría (círculos de color rojo en la Figura 6.B) se localiza el complejo de enzimas de replicación, constituido por VP1 (ARN polimerasa ARN dependiente viral) y VP3 (guanililtransferasa) en contacto estrecho con el genoma viral a través de VP1. El core viral está rodeado por 260 trímeros de VP6, que conforman la capa media y constituye la partícula doble capa (DLP del inglés "Double Layer Particle"). La estructura de VP6 ha sido determinada y se ha observado que el trímero VP6 hace contacto tanto con la proteína VP2 al interior así como al exterior con los trímeros de las proteínas VP7 y VP4, estas últimas cubren las DLPs con 260 trímeros de VP7 y 60 espigas del trímero VP4, formando las partículas de triple capa (TLP del inglés "Triple Layer Particle") [68].

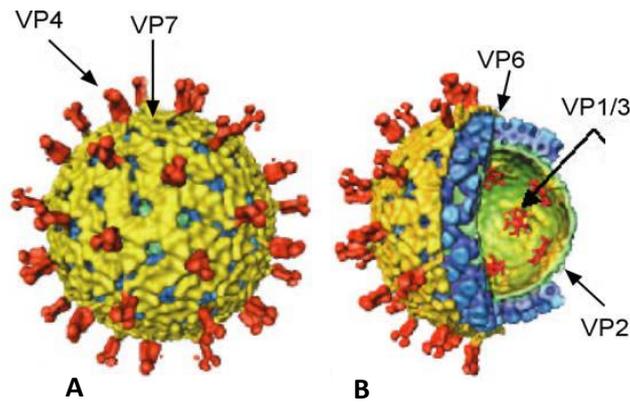


Figura 6: Características estructurales de Rotavirus. A. Reconstrucción de la criomicroscopía electrónica de la partícula de Rotavirus. Las espículas de la proteína VP4 se indican en rojo y la proteína que conforma la capa exterior, VP7 en amarillo. B. Un corte transversal de la partícula viral muestra las cubiertas internas, en azul VP6 y en verde VP2. Andadas las enzimas VP1 y VP3 se muestran en rojo en la capa interna. Imagen extraída y modificada de Jayaram y cols. 2004 [69].

La replicación de RV en el huésped está restringida al intestino, a nivel celular la misma ocurre en su totalidad en el citoplasma implicando varios pasos que comienzan con la unión de la partícula viral infecciosa a la célula blanco. La TLP interacciona con el receptor celular que por lo general contiene ácido siálico a través de la proteína VP4 y con el correceptor que pueden ser varias moléculas de la superficie celular (como las integrinas) a través de las proteínas VP7 o el producto de proteólisis de VP4 (el dominio lipofílico VP5). Aún no está claro si el virus ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptor o directamente por penetración a través de la membrana, pero se cree que la solubilización de las proteínas de la capa externa de la cápside ocurre en el endosoma, dada la baja concentración de Ca_2^+ , produciendo DLPs. Luego de este proceso ocurre la síntesis de los ARN mensajeros (ARNm) virales llevada a cabo por su propio complejo transcripcional que consiste en las proteínas VP1 y VP3. Este complejo se localiza en la superficie interna de la capa de VP2 en los ejes de simetría 5. Las partículas DLP de RV en el citoplasma producen ARN transcriptos que sirven tanto para la traducción de las proteínas virales al inicio del ciclo replicativo como de matriz para la replicación del genoma viral más tarde en el ciclo. Los ARNm son liberados al citoplasma a través de canales presentes en la partícula DLP y traducidos a proteínas. A la interacción específica de proteínas virales y ARNm en el citoplasma se le denomina viroplasma, para formarlo la presencia de las proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, es esencial y suficiente. En el viroplasma ocurre la replicación del ARN, para formar ARN doble hebra y la formación de las DLP las cuales brotan hacia el interior del retículo endoplasmático a través de la membrana del mismo, formando un intermediario de partícula envuelta. En este punto la partícula viral adquiere las proteínas de la cápside externa perdiendo la envoltura lipídica a medida que transita por el organelo celular, NSP4 controla los niveles de Calcio para favorecer el ensamblado y la integridad del virus. Finalmente, la partícula viral madura, TLP, es liberada por lisis o por transporte celular independiente del Golgi [67], [68].

1.2.2.3 Epidemiología

Los Rotavirus son la principal causa de gastroenteritis aguda entre niños menores de 5 años en todo el mundo causando alrededor de 453.000 muertes cada año, llegando en países en vías de desarrollo a representar más de 100 de cada 100.000 niños menores de esta edad. Por otro lado, anualmente 114 millones de afectados por el virus requieren cuidados, mientras que 24 millones requieren visitas a clínicas y 2,4 millones requieren hospitalizaciones, siendo estos patógenos los responsables del 36% de las hospitalizaciones causadas por diarrea. Los factores que aumentan el riesgo a la gravedad de la enfermedad son la edad (en los países de bajos recursos la gran mayoría de los casos graves por RV ocurren entre los primeros 12 a 15 meses de vida), nacimiento prematuro (estos niños no cuentan con los anticuerpos que pasan a través de la placenta) e inmunodepresión a causa de trasplantes, los dos primeros involucran la ocurrencia de infección primaria [70], [71].

El espectro de afecciones que provocan los RV puede involucrar desde una infección asintomática, la deshidratación grave, convulsiones y tal vez muerte. En los casos de desarrollo de enfermedades luego de un período corto de incubación (1-3 días), la gastroenteritis causada por Rotavirus usualmente comienza con el inicio abrupto de fiebre y vómitos seguida de 24 a 48 horas de diarrea acuosa, la persistencia de los síntomas se puede extender de 3 a 8 días involucrando fiebre, vómitos y diarrea. Niños infectados sintomáticos o no comienzan con la liberación de Rotavirus en sus heces antes del comienzo de los síntomas excretando alrededor de 10^{10} – 10^{11} partículas virales por gramo de heces, siendo necesario para infectar un nuevo individuo una dosis menor a 100 partículas [70], [72].

Las epidemias causadas por los Rotavirus poseen un patrón estacional con claros picos en invierno que involucran una variedad de factores como la sobrevivencia de los virus en el ambiente, efectos fisiológicos en el huésped y la mayor proximidad de los niños susceptibles. Su modo de transmisión que se ve favorecido por estos factores involucra la ruta fecal-oral directa o indirectamente, y otras rutas relacionadas como la ingesta de comida y/o agua contaminadas, o la dispersión de partículas virales mediante vómitos [72]. Además, estos virus pueden afectar varias especies de animales mostrando una gran diversidad genética y antigénica dada por varios mecanismos evolutivos como son acumulación de mutaciones puntuales, reordenamiento, transmisión directa de cepas entre diferentes animales y arreglos genéticos (deleciones, inserciones, duplicaciones) [73]. Así han sido demostrados casos de zoonosis, transmisión inter especie y reordenamientos genéticos entre RV humanos y de otros animales. Especialmente algunas especies de animales como bovinos, porcinos, gatos y perros contribuyen con la diversidad antigénica y genética encontrada en Rotavirus humanos presumiblemente por las interacciones entre humanos y estos animales fundamentado en factores culturales y económicos [74].

Por otro lado, a pesar de la gran diversidad de G y P tipos encontrados en las distintas especies, en humanos solo han sido aislados hasta el momento 12 G-tipos (1 al 6, 8 al 12 y 20) y 15 P-tipos (1 al 6, 8 al 11, 13, 14, 19,25 y 28) [67]. Una revisión realizada en 2005, donde se analizaron 124 trabajos publicados a nivel global entre 1989 y 2004, muestra que el P-tipo más común circulante en la población humana de América de Sur es P[8] seguido de P[4], P[6] y P[9], mientras que los G tipos más comunes en esta región son G1 seguido del G2, G4, G9, G3 y G5 [75]. Otra revisión más reciente muestra que los genotipos circulantes en los países de América Latina con vacunación son P[4], P[6], P[8], G1, G2, G9 y G12 [73]. Así mismo se han analizado las publicaciones de las últimas 3 décadas de RV Bovino donde se observa que la combinación de genotipo más frecuente en los mismos es G6P[5], aunque diferencias espacio temporales en cepas de RV fueron observadas [76].

En Uruguay, se ha mostrado la circulación de Rotavirus en la población desde hace ya dos décadas, en primer lugar este virus fue identificado en muestras de niños tomadas entre 1990-1994 [77]. Más adelante, en cepas aisladas en el período 1996-1999 se logró identificar los G-tipos circulantes identificando la presencia de G1 (64,7%), G2 (29,4%) y G4 (5,9%) [78], por otro lado 23 muestras positivas recolectadas durante 2006-2007, mostraron la circulación de los genotipos G2 (30%) y G9 (70%) [79]. Recientemente, la caracterización genotípica tanto para G-tipo como para P-tipo de un grupo de 41 muestras de heces provenientes de pacientes pediátricos de Montevideo pertenecientes al año 2002 mostró que un 85% fueron G4, un 2% G1, un 58% P[8] y un total de 49% de las muestras fueron G4P[8] [80]. Por su parte, en un trabajo donde se analizó la presencia de virus en muestras de niños con gastroenterocolitis se ha identificado la circulación del mismo [41]. Por último, en un trabajo realizado con 175 muestras clínicas del 2011 al 2012 provenientes de niños con gastroenterocolitis del norte del país, mostro también la circulación de Rotavirus del grupo A en esa región en 37% de las muestras que se distribuyeron de las siguiente manera en los distintos genotipos: 6% de G1P[8], 23% G2P[4]/G2P[X]/GXP[4], 23% G3P[8]/G3P[X], 14% G12P[8]/G12P[X], 16% GXP[8], 1,5% G12P[9] y 3% G2P[4]/[8] [81]. El análisis estadístico mostró una alta detección de infecciones por RVA en estaciones frías, otoño e invierno, comparado con estaciones calientes, primavera y verano. Así mismo, se ha evidenciado la presencia de estos virus en bovinos con diarrea [82].

1.2.2.4 Rotavirus en el ambiente

La circulación de los Rotavirus en matrices ambientales ha sido ampliamente estudiada. En una revisión publicada recientemente, se muestra que los RV han sido detectados en aguas residuales de África, América, Asia, Europa y Oriente Medio, con una positividad que oscila entre 8 a 100% siendo, en la mayoría de los casos estudiados, superior al 40% [83]. Para analizar los datos de emisiones de Rotavirus, Kiulia y cols., 2015, se basaron en un modelo que divide el planeta en cuadrículas, cuyos lados se encuentran conformados por 0.5 grados de longitud y latitud. Mediante este modelo estimaron que las emisiones globales del virus fueron 2×10^{18} partículas virales/cuadrícula/año, de las cuales 87% se producen en poblaciones urbanas. Los puntos calientes se encuentran en las zonas densamente pobladas del planeta como Bangladesh y Nigeria, mientras que las emisiones bajas se encuentran en zonas rurales en el Norte de Rusia y el desierto de Australia, como muestra la Figura 7 [83].

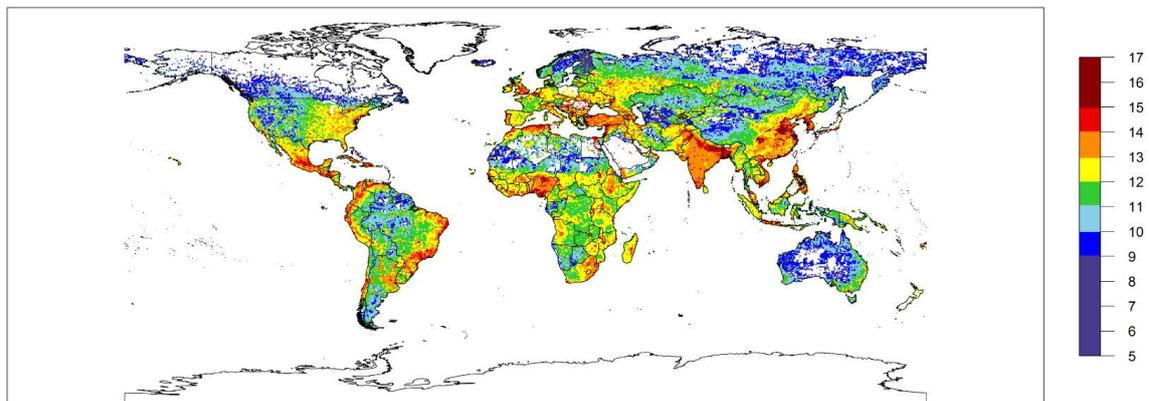


Figura 7: Emisiones totales de Rotavirus. Representado en logaritmo en base 10 de partículas virales por cuadrícula (basado en los datos de publicaciones de 2010). Extraído de Kiulia y cols., 2015. [83]

Estudios en otras matrices ambientales se han realizado en todo el mundo. Ejemplos de ello se presentan en la Tabla 2 donde a modo de resumen se observa la diversidad de técnicas moleculares utilizadas para la detección de este virus, así como su amplia dispersión a nivel mundial en aguas superficiales. Por otro lado, estudios realizados en aguas superficiales de establecimientos agrícolas de Río Grande del Sur mostraron que luego de un período seco el virus se encuentra en mayor porcentaje de muestras que luego de un período de lluvias prolongadas [84]. Así mismo en Río de Janeiro se observó que luego de un evento de lluvia estos virus mostraron una permanencia más larga que los indicadores bacterianos en las aguas estudiadas [62].

Tabla 2: Ejemplos de trabajos a nivel mundial de detección de Rotavirus en matrices ambientales.

Matriz	Locación	Porcentaje de muestras positivas (concentración en cg/mL)	Genotipo	Metodología	Referencia
Agua de bebida embotellada	China	100		qPCR	Yates, 2014 [85]
Agua de grifo	Río Grande del Sur- Brasil	16		PCR	Kluge y cols., 2014 [86]
Aguas residuales Uruguay	Canelones y Escilda Paullier	37 86 (entre $1,2 \times 10^3$ - $6,5 \times 10^4$)	G1, G9, G3, G10, P[4], P[8], P[9] y P[11]	PCR qPCR	Betancourt, 2013 [87]
	Melo, Treinta y Tres	32 (entre $1,7 \times 10^5$ - 2×10^7)	G2, P[4], G12 y P[3]	qPCR	Lizasoain, 2012 [88]
	Liberadas en costa del río Uruguay	49	G1, G2, G3, G12, P[4], P[8], y P[3]	PCR	Britos y cols., 2012; Lopez y cols., 2015 [45], [89]
Aguas superficiales África	Sudáfrica	14 (entre $2,5 \times 10^{-2}$ - $2,1$)		qPCR	Chigor y Okoh, 2012 [90]
	Sudáfrica	50 (entre $2,8 \times 10^{-4}$ - $2,8$)		qPCR	Chigor y cols., 2014 [91]
Aguas superficiales Asia	Singapur	40 (promedio $2,6 \times 10^{-1}$)		qPCR	Rezaeinejad y cols., 2014 [92]
	Tailandia	27	G1, G2, G3, G9	PCR anidada	Kittigul y cols., 2014 [93]
Aguas superficiales Europa	Países Bajos	69		PCR semi-cuantitativa	Schets y cols., 2008 [94]
	Inglaterra	90 (rango $1,2 \times 10^{-2}$ - $4,2 \times 10^1$)		qPCR	Hamza y cols., 2009 [57]
Aguas superficiales América del Norte	Estados Unidos	6		qPCR	Corsi y cols., 2014 [59]
Aguas superficiales en la región	Córdoba- Argentina	100 (promedio $5,7 \times 10^2$)	G1, P P[8], G3, G9 y P P[4]	qPCR	Fongaro y cols., 2015 [95]
		19 (promedio $8,5 \times 10^{-1}$)	G1, G2 y G3, P[4] y P[10]		
	Santa Catarina- Brasil	22		PCR	Rigotto y cols., 2010 [96]
		67		qPCR	Fongaro y cols., 2015 [97]
	Río Grande del Sur- Brasil	21		PCR	Oliveira y cols., 2012 [84]
	Manaos - Brasil	12	P[8], P[4] y G1	PCR	Miagostovich y cols., 2008 [60]
Río de Janeiro- Brasil	67		PCR anidada	Calgua y cols., 2013 [61]	
		37 (promedio 20)		qPCR	Victoria y cols., 2014 [62]
Aguas superficiales Uruguay	Barros Blancos - Uruguay	32		PCR	CUETA y cols., 2013 [98]

1.2.3 Picobirnavirus

1.2.3.1 Aspectos Generales

Los Picobirnavirus (PBV) fueron descubiertos fortuitamente en 1988 cuando se observó por primera vez en Brasil que un pequeño número de extracciones de ácidos nucleicos de muestras provenientes de pacientes con diarrea mostraban dos bandas electroforéticas en Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE del inglés “*Polyacrylamide gel electrophoresis*”). Este hallazgo fue el inicio para la búsqueda del virus al que pertenecía este genoma, así estos mismos investigadores no tardaron en revelar que el nuevo virus estaba constituido por una pequeña partícula uniforme de alrededor de 35 nm de diámetro y dos hebras de ARN doble cadena, atribuyéndole por estas características su nombre “pico” y “birna”, respectivamente [99], [100]. Dos décadas más tarde, estos virus fueron clasificados por el ICTV como un nuevo género perteneciente a la nueva familia *Picobirnaviridae*, compuesto por las especies *Human Picobirnavirus* y *Rabbit Picobirnavirus* [17].

Según la secuencia del gen que codifica para la RdRp los Picobirnavirus se han clasificado en los genogrupos I (GI) y II (GII) distinguiéndose dos parejas de cebadores a utilizar en cada caso para su amplificación por el método de RT-PCR [101]. Una revisión reciente muestra que el 83% de las secuencias de Picobirnavirus que se encontraban en las bases públicas de datos a principios de 2014 correspondían al GI, mientras que para el GII sólo lo hacían un 3% y las secuencias restantes aún se encuentran sin clasificar [102]. Datos epidemiológicos presentes en diferentes reportes revelan una limitada eficiencia de las parejas de cebadores descrita para detectar PBVs circulantes en EEUU, Argentina e India. Esto sugiere que los PBVs humanos tal vez presentan una mayor diversidad genética [103], así mismo recientemente se ha propuesto la existencia de un nuevo genogrupo denominado genogrupo III [104].

1.2.3.2 Biología Viral

Para determinar el tamaño de los segmentos que conforman el genoma de los PBV se utiliza la técnica de PAGE con el genoma de Rotavirus como referencia. De esta manera se ha estimado que el tamaño de dichos segmentos varía entre 2.500-2.600 pb y 1.700-1.900 pb para el segmento mayor y menor, respectivamente. En la Figura 8 se muestra la migración de los segmentos genómicos de PBV en una electroforesis donde se observa en los carriles 2 y 3 las bandas correspondientes a ambos segmentos virales [105].

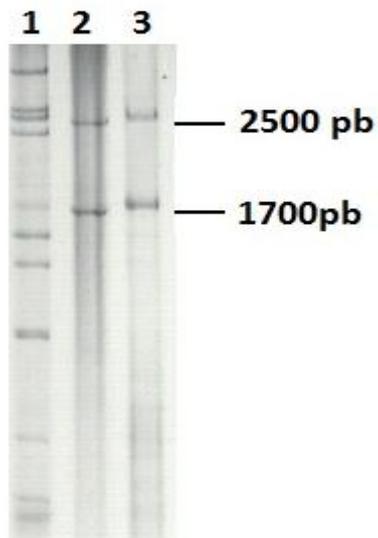


Figura 8: Migración del ARN genómico de cepas de Picobimavirus Porcino. El ARN doble hebra extraído de muestras de cerdos fue corrido en un gel de PAGE al 7% y revelado con plata. El carril 1 es una muestra positiva para RV. Los carriles 2 y 3 muestran las dos banas electroforéticas esperadas. Extraído y modificada de Nates y cols, 2011 [105].

Por otro lado, se ha podido secuenciar totalmente el genoma de Picobirnavirus humanos (HPBV) y de león marino (OPBV), mientras que el de conejo (LPBV) se encuentra secuenciado el segmento mayor y de bovino (BPBV) el segmento menor. En la Figura 9 se muestran diferencias y similitudes entre los segmentos de PBV secuenciados de distintas cepas. El segmento menor posee un único marco abierto de lectura en todas las cepas secuenciadas que codifica para una única proteína de tamaño variable entre 532-554 aminoácidos. La secuencia de esta proteína -deducida a partir de la secuencia nucleotídica- muestra motivos característicos de las ARN polimerasa ARN dependiente de virus ARN doble cadena y algunos simple cadena [102], [105].

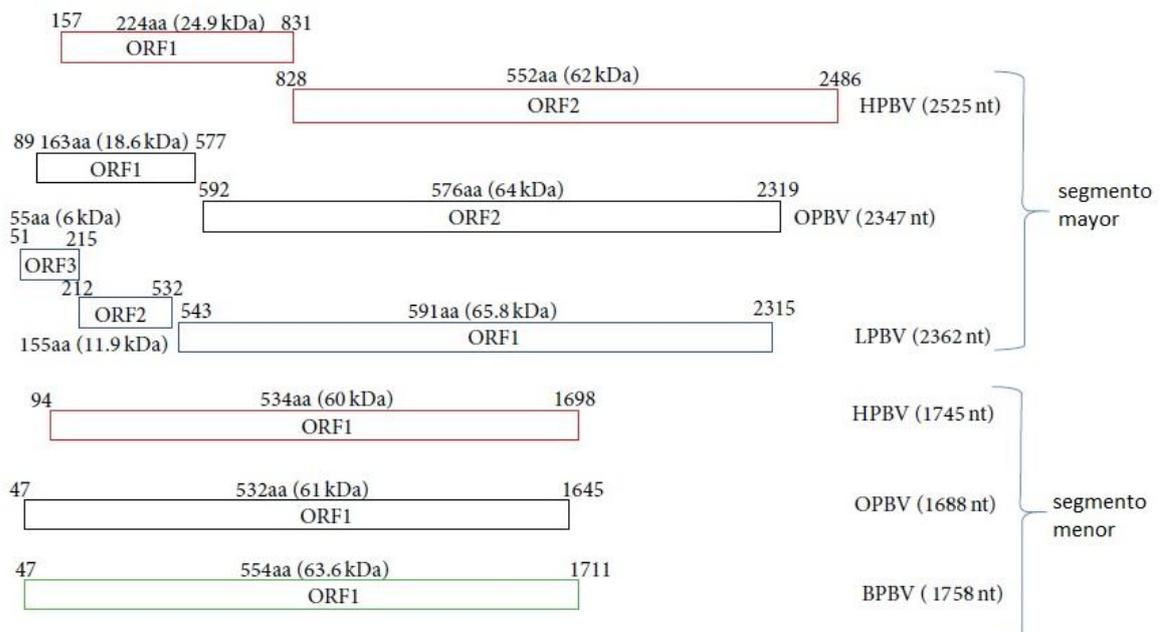


Figura 9: Comparación de los ORF del segmento mayor y menor de los PBVs secuenciados. HPBV: PBV humano. OPBV: PBV de León Marino, LPBV: PBV de Conejo. BPBV: PVB Bovino. Figura extraída y modificada de Malik y cols., 2014 [102].

Por su parte, el segmento mayor posee dos o tres marcos abiertos de lectura según la cepa analizada. La proteína de mayor tamaño obtenida a partir de este segmento es de entre 552-592 aminoácidos de longitud y es codificada por el ORF 2 para HPBV y OPBV o por el ORF 1 para LPBV. Esta proteína conforma la cápside de los PBV, Figura 9 [102]. La microscopía electrónica de las partículas similares a virus producidas in vitro mostró que la cápside icosaédrica está conformada por 60 dímeros simétricos constituidos por 120 subunidades de una proteína de cubierta de 55 kDa. Esta proteína sufre un procesamiento autoproteolítico, liberando un péptido que permanece asociado al ácido nucleico dentro de la cápside. La imagen de la reconstrucción de la partícula similar a virus de los Picobirnavirus se muestra en la Figura 10 [106].

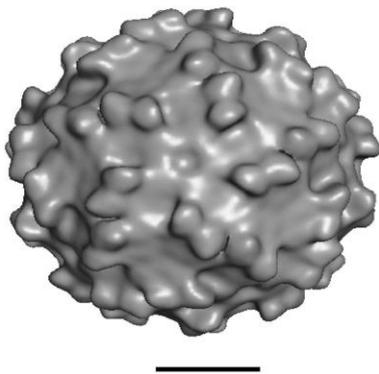


Figura 10: Superficie de la partícula similar a virus de PBV. Reconstrucción 3D de la Microscopía Electrónica de la partícula formada por 60 dímeros constituidos por 120 subunidades de una proteína de 55 kD. Bar: 100Å. Figura extraída de Duquerroy y cols, 2009 [106].

1.2.3.3 Epidemiología

Se ha descrito la presencia de los Picobirnavirus en 28 especies animales diferentes que involucran mamíferos, aves y reptiles. Dichas especies son humanos, monos, serpientes, león marino, león, gato montés, puma, tigre, zorro, conejo, ratón, porcinos, equinos, perros, pollo, cobayo, hámster, vacunos, oso hormiguero, ñandú, oca china, pelícano, burro, orangután, armadillo, faisán y ovinos. La detección de los PBVs en varias especies de animales domésticos y en cautiverio sugiere que estos virus poseen un amplio rango de huésped. Además se ha observado una distribución amplia en el planeta, que incluye América, Europa, Asia y Oceanía, como se muestra en la Figura 11 donde se presentan todos los países en que el virus ha sido reportado en al menos una especie o en aguas residuales. Así mismo el reporte de PBVs genéticamente relacionados provenientes de caballos, cerdos, humanos y aguas ha planteado la preocupación acerca del potencial zoonótico de este virus [102], [103].

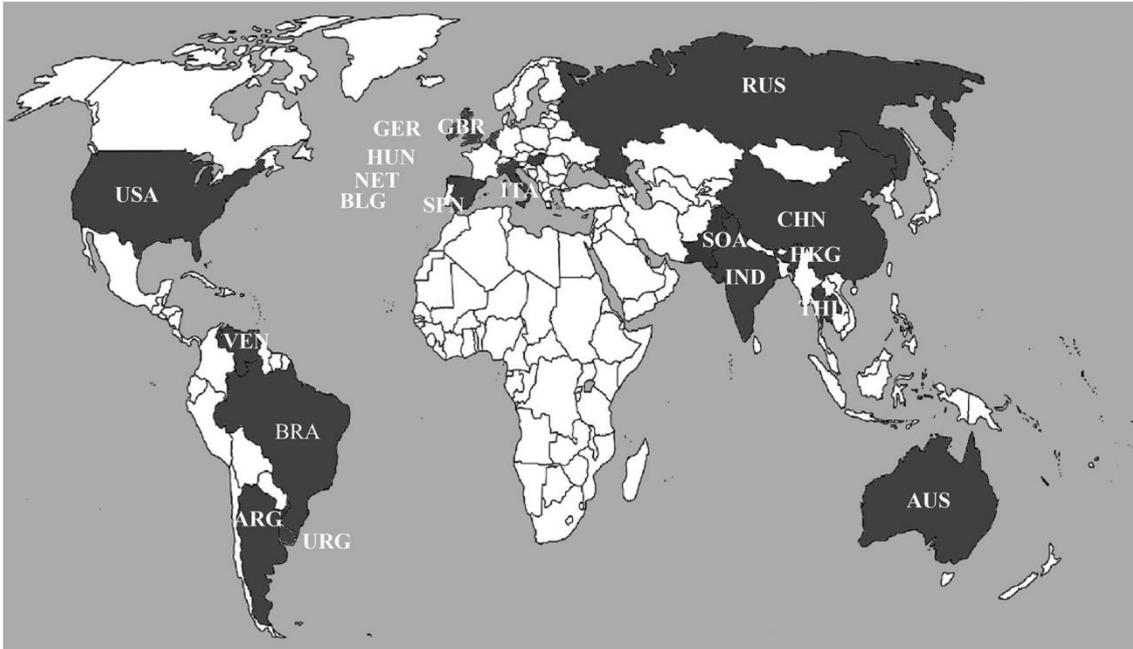


Figura 11: Distribución global de PBV. En color negro se indican todos los países donde el virus ha sido reportado en alguna especie o en aguas residuales. Extraído y modificado de Ganesh y cols., 2014 [103].

Los estudios de la asociación de PBV con la gastroenterocolitis arrojan resultados contradictorios. Por un lado, existen investigaciones que sugieren fuertemente que PBV es un agente viral ocasional en muestras de niños y no un agente etiológico primario de diarrea. Ejemplo de ello lo constituyen estudios realizados en niños menores de 5 años con gastroenteritis en Italia, Brasil, Venezuela, Argentina e India en donde la prevalencia de PBV estuvo entre 0,09-0,5%. Adicionalmente, estudios que utilizan grupos de individuos control, también, confirman la hipótesis de que los PBV son virus ocasionales ya que no se encontró diferencia entre el porcentaje de muestras positivas de ambos grupos. Al mismo tiempo, estudios metagenómicos en humanos revelan que la excreción de PBV puede ser un evento común en poblaciones sanas. Por otro lado, estudios como el realizado en India demuestran una asociación entre PBV y la gastroenterocolitis. Sumado a esto, análisis moleculares demostraron que las cepas circulantes en este país poseen gran heterogeneidad y tienen muy poca homología de secuencia con respecto al resto de las secuencias depositadas en las bases públicas de datos. Así mismo, análisis en diferentes especies animales también arrojan resultados contradictorios. Por su parte, investigaciones realizadas en cerdos en Brasil y Argentina han encontrado una asociación entre la presencia viral y el estado de salud del animal. En Brasil el porcentaje de animales positivos fue de 15,3% y 9,6% para los cerdos enfermos y sanos, respectivamente y en Argentina resultó en 10,4 y 2,2%, respectivamente. Contrariamente a los que ocurrió en un estudio realizado en México donde se encontró el virus en frecuencias similares en ambos grupos 10 y 12% de cerdos enfermos y sanos, respectivamente [105], [107].

Por otro lado, la presencia de PBV en animales sin ninguna manifestación clínica sugiere que el estado fisiológico del animal afecta la presencia viral en las heces.

Factores como el estrés o la edad se han asociado a la alta excreción de PBV en cerdos durante la lactancia y la etapa final de preñez, así mismo en animales en cautiverio se ha asociado a las condiciones de estrés provocadas en las granjas o en los zoológicos. Además, también han sido clasificados como patógenos oportunistas dado que han sido detectados en humanos inmunocomprometidos y con tratamientos inmunosupresores que desarrollan gastroenteritis. Se ha observado también la presencia del virus en individuos hospitalizados con diferentes condiciones clínicas, como neumonía o parálisis flácida aguda, sugiriendo que estos virus pueden encontrarse en las heces de los pacientes que cursan diferentes situaciones patológicas, pero sin asociación con episodios de diarrea. Así mismo, los PBVs han sido asociados con gastroenteritis en animales tanto como patógeno único como con otros patógenos entéricos conocidos e igualmente coinfecciones del GI y GII del virus han sido evidenciadas en humanos, porcinos y bovinos [107].

Otro aspecto destacable es la identificación de PBV GI y GII en el tracto respiratorio de cerdos en Asia lo que ha expandido el conocimiento acerca del tropismo de estos virus en el huésped, estos cerdos no mostraron problemas respiratorios ni otro signo clínico en el momento de la toma de muestras [108]. Más tarde este mismo grupo identificó el virus en algunos lavados bronqueo alveolares obtenidos de pacientes con enfermedades respiratorias inexplicables en los Países Bajos [109]. Por otro lado, un trabajo de metagenómica en muestras de heces de humanos con diarrea en las cuales no había sido posible identificar el agente etiológico, detectó a los Picobirnavirus en varias de las muestras, identificando principalmente Picobirnavirus humano pero también se observó en algunas muestras cepas con una elevada identidad nucleotídica con PBV porcinos y de león marino [104].

La persistencia viral también es un factor importante en la epidemiología de estos virus. El estudio de animales mantenidos en cautiverio reveló para el orangután y el armadillo la excreción de PBV durante 7 y 6 meses, respectivamente. Es de destacar que en estos estudios fueron obtenidas muestras negativas para Picobirnavirus intercaladas con muestras positivas para el mismo [107]. Por otro lado, ratas inoculadas oralmente con el virus mostraron la liberación de los mismo en las heces durante 17 días sin mostrar síntomas de gastroenteritis [105].

En nuestro país también se ha demostrado la circulación de los Picobirnavirus. Por un lado en humanos han sido estudiadas 167 muestras de pacientes VIH positivos, de los cuales 37 presentaban signos de gastroenteritis, los 130 restantes, no. Al analizar todas las muestras por la técnica de PAGE se obtuvieron cuatro muestras positivas para PBV las cuales pertenecían al grupo de pacientes sin diarrea. Por otra parte, mediante la técnica de RT-PCR se analizó la presencia del genogrupo I en las 37 muestras provenientes de pacientes con episodios de diarrea y 37 muestras de pacientes sin diarrea seleccionadas al azar. Los resultados revelaron 6 nuevas muestras positivas, 3

pertenecientes a cada grupo de muestras. Por lo que en total en este trabajo se detectaron 10 muestras positivas para PBV, mediante las técnicas de PAGE y/o PCR [110], [111]. Por otro lado, mediante la técnica de RT-PCR utilizando cebadores tanto para el genogrupo I como para el genogrupo II se pudo evidenciar la circulación del GI del virus en gato montés, puma, jaguar y león del Jardín Zoológico Villa Dolores. Ninguno de estos animales mostró síntoma de enfermedad [112].

1.2.3.4 Picobirnavirus en el ambiente

La presencia del virus en matrices ambientales ha sido demostrada previamente tanto en aguas residuales como en recreacionales. En la Tabla 3 se detallan las publicaciones previas que muestran la presencia de PBV.

Tabla 3: Trabajos a nivel mundial de detección de Picobirnavirus en matrices ambientales.

Matriz	Locación	Porcentaje de muestras positivas (%)	Genogrupo	Metodología	Referencia
Planta de tratamiento de agua residuales	Estados Unidos	100 Afluyente 33 Efluyente	GI	PCR	Symonds y cols., 2009 [113]
	Inglaterra	25 Afluentes Eficiencia de reducción 0,7-2,4 log	GI	qPCR	Hamza y cols., 2011 [114]
	China	100	GI	PCR	Zhang y cols., 2015 [115]
Aguas residuales	Estados Unidos y España	100		Metagenómica	Cantalupo y cols., 2011 [49]
Plantas de tratamiento de aguas residuales Uruguay	Esilda Paullier (Sistema de lagunas)	33 Afluyente 22 Efluyente	GII mas prevalente que GI	PCR	Berois y cols., 2012 [51]
	Canelones, Melo y Treinta y Tres (Tercera Generación)	62 Afluyente 15 Efluyente 7 Efluyente posterior UV			

1.3 Virus y ambiente en Uruguay

La virología ambiental es una disciplina que se desarrolla desde mediados del siglo pasado en los países desarrollados. En estos se ha acumulado un caudal de conocimiento importante en lo que tiene que ver con la vigilancia epidemiológica, políticas de estado y técnicas para el estudio de las diversas matrices que se encuentran en el ambiente. Sin embargo este progreso no ha sido acompañado en igual medida en los países con menor desarrollo científico como Uruguay. En nuestro país el desarrollo de esta disciplina es incipiente existiendo hasta el momento cuatro casos de estudio en esta área. Algunos de los resultados de estos trabajos han sido mencionados en los modelos virales nombrados anteriormente por lo que en la Tabla 4 desarrollaremos los resultados desde una perspectiva global. En todas las investigaciones se detecta la presencia viral en un número importante de muestras.

Tabla 4: Trabajos de detección viral en agua realizados en Uruguay.

	Virus analizados	Porcentaje de muestras positivas (concentración en cg/mL)	Metodología	Referencia
Plantas de tratamiento empresa OSE	Norovirus Rotavirus Picobirnavirus	Plantas de tratamiento de tercera generación: 67 afluentes	qPCR y PCR	Berois y cols., 2012 Betancourt, 2013 Lizasoain, 2012 [52], [87], [88]
		28 efluentes sin tratamiento UV 16 efluentes con tratamiento UV		
Plantas con sistemas de lagunas:		44 afluentes	qPCR y PCR	
		41 Laguna Facultativa 26 Laguna Maduración		
Aguas residuales volcadas directamente al Río Uruguay	Rotavirus Norovirus Astrovirus Humano	51 NoV 49 RV 45 Astrovirus	qPCR	Britos, 2012 Victoria y cols., 2014 [45], [116]
Aguas residuales volcadas al Río de la Plata.	Norovirus	GI 13 (promedio 184) GII 33 (promedio 155)	qPCR	Alberti, 2012 [40]
Aguas recreacionales Barros Blancos	Norovirus Rotavirus	50	PCR	CEUTA, 2013 [98]

En esta tesis nos planteamos seguir profundizando en los conocimientos generados en virología ambiental en nuestro país, así como contribuir a la comprensión global de la epidemiología de virus entéricos profundizando el trabajo ya comenzado en aguas recreacionales de Barros Blancos. Así mismo, es de destacar que las aguas estudiadas en este trabajo provienen de un contexto particular, un conjunto de microcuencas que involucran una población vulnerable a las infecciones gastrointestinales donde cuerpos de agua que son utilizados con fines recreativos son posibles blancos de contaminación fecal.

1.3.1 Área de estudio

El área de estudio para este trabajo es la ciudad de Barros Blancos. La misma se encuentra al sur del departamento de Canelones siendo parte del área metropolitana y extendiéndose desde el Km. 22 al Km. 29 de la ruta 8, limitando al sur con la ruta 101, al norte con el camino José Gervasio Artigas, al suroeste con el departamento de Montevideo y al noreste con la ciudad de Pando. Barros Blancos conforma la microrregión 6 del Departamento junto con las localidades de Suárez, Empalme Olmos, Toledo y Pando, microrregión con fuerte vocación industrial tecnológica [117].

A mediados del siglo XX, vinculado con fábricas que se instalaron en la zona, Barros Blancos vivió una explosión demográfica, que produjo la construcción de viviendas, escuelas públicas y un liceo. Con el tiempo esta actividad económica disminuyó y los pobladores se vieron obligados a viajar hasta localidades vecinas para trabajar constituyéndose en ciudad dormitorio. A su vez, el alto valor de los inmuebles en Montevideo generó que en los años noventas muchas personas migraran hacia Barros Blancos, al mismo tiempo se establecieron asentamientos irregulares modificando su paisaje y las condiciones de seguridad. Sin embargo en la actualidad, se está viviendo allí un nuevo auge económico debido a la ubicación estratégica de esta localidad. Es así que esta ciudad se constituye en un espacio fragmentado, semi-urbano y semi-rural, donde conviven pequeñas quintas, con cooperativas de viviendas, villas y asentamientos precarios donde a su vez muchos pobladores crían animales de granja, además de poseer una estrecha convivencia con animales domésticos [98], [117], [118].

Esta ciudad cuenta con una población de 31.650 habitantes con una distribución etaria notoriamente más joven que el resto del país, con un alto índice de pobreza (54%) e indigencia (21%) acompañados de un bajo nivel educativo, 15% de los habitantes tiene primaria incompleta. Además, en el último censo del Instituto Nacional de Estadística (INE) se pudo observar un alto flujo migratorio proveniente desde otras localidades del departamento de Canelones, así como el hecho que 10% de los hogares se encuentra en situación de hacinamiento, mientras que el 46% de la población tiene al menos una necesidad básica insatisfecha. En el 2011, la tasa de desempleo para la población de Barros Blancos fue de 8,8%, un valor superior al desempleo registrado a nivel de todo el país el mismo año (6,4%), siendo sensiblemente mayor en las mujeres donde alcanza un 13,6%. Este porcentaje es influido fuertemente por el nivel educativo alcanzado por las habitantes [118]–[121].

Un trabajo que documentó los problemas que perciben los pobladores de Barros Blancos reveló que la pobreza y exclusión sociocultural, la división que produce la ruta 8, el crecimiento desorganizado de la urbanización, inundaciones y contaminación

ambiental son los temas que más preocupa a los ciudadanos locales. En este trabajo se documenta que muchos problemas ambientales derivan del crecimiento poblacional en territorios no preparados para ello y de la producción industrial. Otro aspecto característico de esta zona es la relación de dependencia económica y sociocultural respecto de Montevideo, especialmente en lo que tiene que ver a la centralización de las decisiones y las políticas públicas, así mismo la falta de lugares de esparcimiento preocupa a los vecinos de la zona [122].

Por otro lado, dada la instalación de una unidad asistencial de la Facultad de Medicina en el centro Salvador Allende de Barros Blancos se realiza desde 2008 un relevamiento de las condiciones y habitantes de la zona. En el mismo se destaca la falta de saneamiento que conlleva a un manejo inadecuado de las excretas, así como el hecho de que las enfermedades más comunes en la población local son las enfermedades infecciosas como diarrea aguda, parasitosis intestinal y enfermedades respiratorias [120]. Años más tarde, se demostró el alto índice de parasitosis por análisis coproparasitarios en niños de la Escuela Nº 187, estos microorganismos se transmiten por vía fecal oral, generalmente por contacto de persona a persona, o por la ingesta de agua, alimentos o tierra contaminados por materia fecal [98].

En este contexto nos centramos en estudiar la calidad de aguas de cunetas, tajamares, pozos y cañadas del sureste de Barros Blancos que son visitadas con fines recreativos por los niños que concurren a la Escuela Nº 187, en la Figura 12 se encuentra delimitada por una línea naranja el área de estudio. Se buscará identificar virus humanos y de otras especies animales, dado el carácter zoonótico de alguno de los virus antes mencionados y de la estrecha convivencia entre humanos y animales. Como se detalló anteriormente dos de estos virus: RV y NoV son de importancia fundamental en salud pública, pudiendo estar directamente involucrados con el alto número de casos de gastroenteritis encontrados en investigaciones previas de Facultad de Medicina. Así mismo, bajo la hipótesis de que las fuentes de agua se encuentran estrechamente relacionadas con el estado de salud de los niños este estudio pretende trazar una ruta de contaminación fecal-oral que sirva para la prevención sanitaria y para la toma de acciones de los organismos públicos.

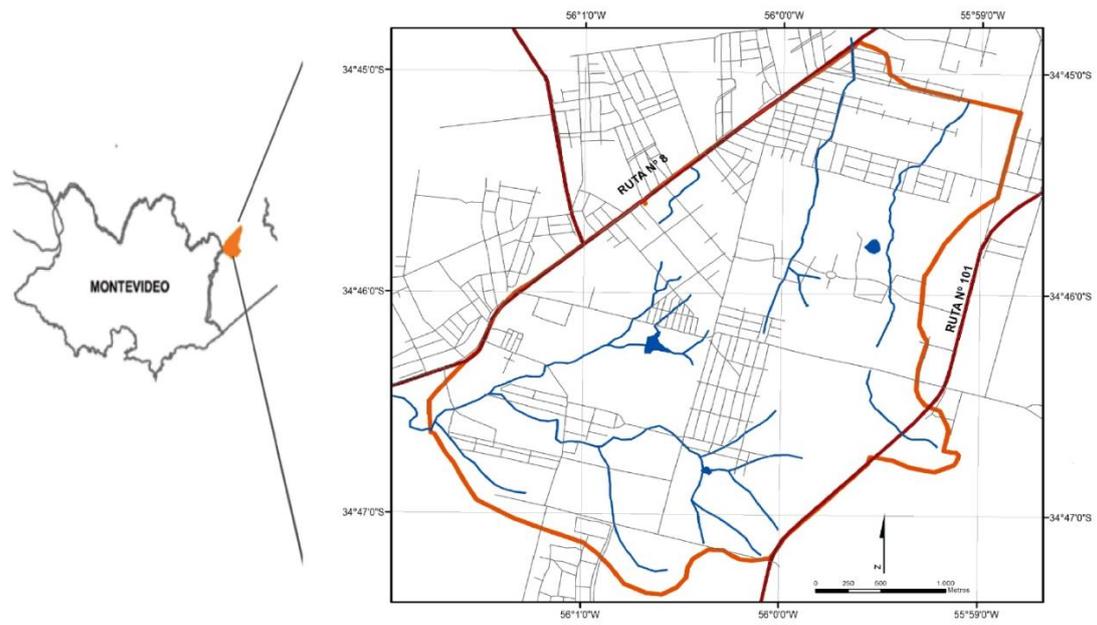


Figura 12: Zona de estudio. Mapa que muestra la localización de la zona de estudio delimitada por la línea naranja. Extraído y modificado de CEUTA y cols., 2013 [98].

2. Hipótesis

En un contexto donde una población es vulnerable a enfermedades gastrointestinales, sin condiciones de calidad de agua y saneamiento correctas como ocurre en Barros Blancos, es posible detectar la circulación de virus entéricos en las aguas superficiales de sus microcuencas y asociar la carga viral y diversidad de los mismos a la actividad humana y a factores ambientales.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

El objetivo general es evaluar la presencia a nivel ambiental de virus entéricos relevantes para la salud pública en aguas recreacionales en el contexto de una población vulnerable y aportar a la comprensión de la dinámica de estos virus en aguas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Detectar y caracterizar molecularmente Rotavirus, Norovirus y Picobirnavirus en aguas ambientales procedentes de la localidad de Barros Blancos, Canelones.
2. Cuantificar Rotavirus y Norovirus en aguas ambientales procedentes de la localidad de Barros Blancos, Canelones.
3. Comparar los resultados virales obtenidos con análisis bacteriológicos en dichas muestras, así como con parámetros ambientales registrados en los muestreos: pluviosidad y temperatura ambiente.

4. Metodología

4.1 Diseño del muestreo

El área de estudio se definió a partir de talleres realizados con la comunidad, donde se identificaron los lugares que los niños de la Escuela N° 187 frecuentan. Dada la falta de espacios recreativos en la zona, los niños de Barros Blancos utilizan pozos, cunetas u otras fuentes de agua cercanas para jugar cuando el tiempo lo permite. Así se identificaron las zonas que se muestran en el mapa de la Figura 13: Villa Carmen, Villa Universitaria, Bella Vista Chico, Paso Escobar y Bella Vista de Carrasco. Esto fue definido en el marco de un proyecto de Alto Impacto Social (ANII) a cargo de la organización no gubernamental Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas (CEUTA).

Se realizaron cuatro muestreos en octubre, noviembre y diciembre de 2011 y febrero de 2012, tratando de abarcar diferentes condiciones pluviométricas. Así es que el segundo muestreo fue realizado 24 horas después de la ocurrencia de lluvias abundantes, mientras que el tercer muestreo lo fue luego de ocho días de lluvias ocasionales y el primero luego de un período largo de sequía. Por otro lado, a medida que transcurrieron los muestreos la temperatura ambiente y la radiación UV fueron aumentando, dado el transcurso de la primavera y el ingreso del verano. En estos muestreos se tomaron un total de 55 muestras de 16 sitios distintos elegidos en base a la observación llevada a cabo con los vecinos de la zona de la utilización de los cuerpos de agua como aguas recreacionales, además se representó la diversidad de tipos de aguas presentes y las posibles fuentes de contaminación. Por su parte, el cuarto muestreo se centró en 7 puntos seleccionados a partir de los 16 primeros, buscando entender mejor la dinámica de los patógenos en los mismos. En el desarrollo de esta tesis las muestras se nombrarán con números que identifican el muestreo del que provienen y el sitios muestreado, por ejemplo 112, es la muestra que proviene del muestreo uno, sitio 12. Así mismo, los puntos de muestreo se clasificaron en tres categorías en función de la densidad de población y observaciones de campo donde se identificaron eventuales aportes de agua de cunetas provenientes de áreas pobladas, Tabla 5.

Tabla 5: Categorización a priori de los cuerpos de agua estudiados.

Categoría	Descripción	Nivel esperado de contaminación	Color de identificación
1	Cuneta o cañada donde predominan los aportes de aguas servidas	Alto	Rojo
2	Cuerpo de agua con aportes significativos de aguas servidas	Medio	Amarillo
3	Cuerpo de agua sin aportes significativos de aguas servidas	Bajo	Verde

Extraída y modificada de CEUTA, 2013 [98]

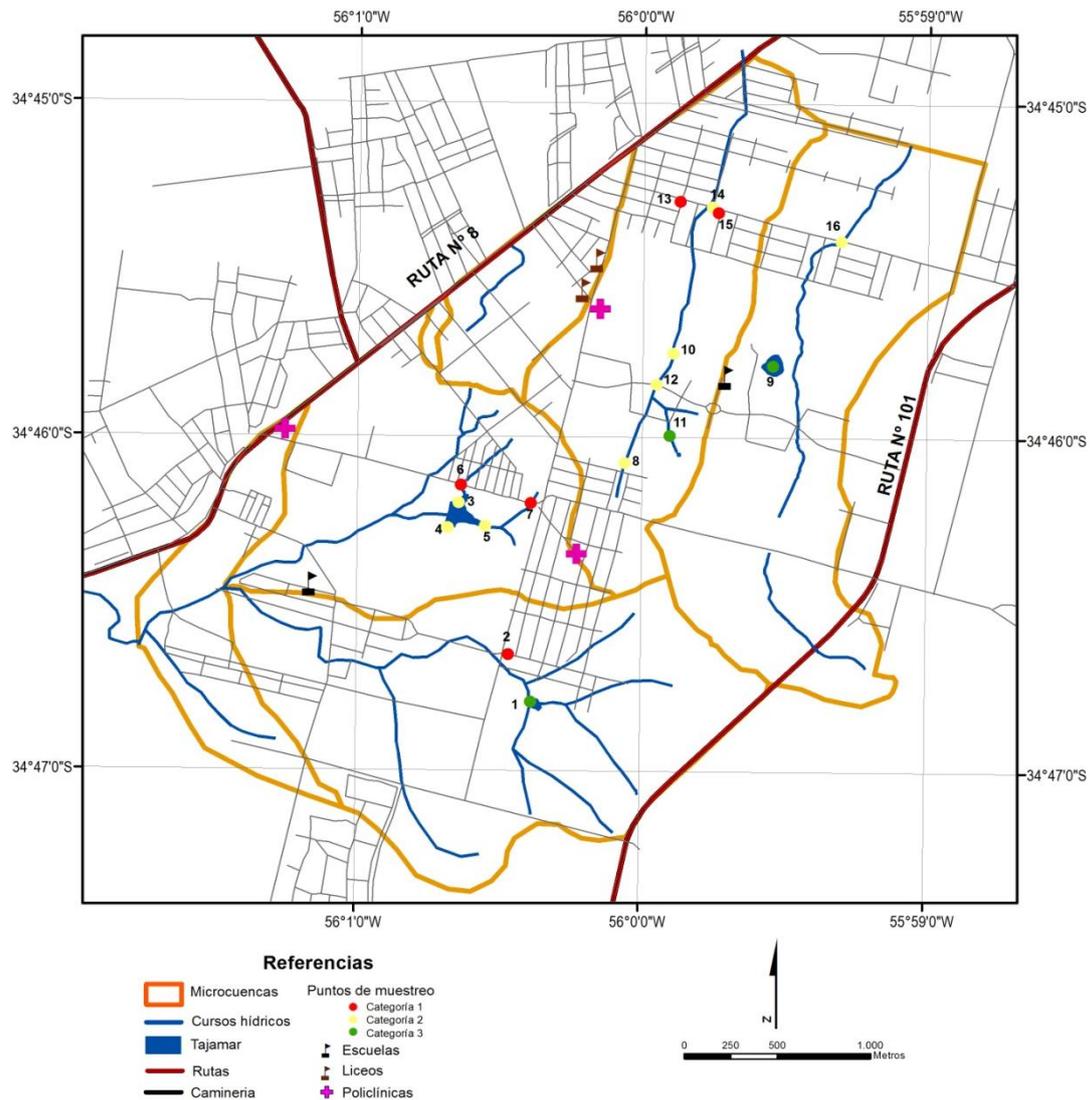


Figura 13: Mapa de la zona de estudio. Se detallan las principales fuentes de agua y los puntos de muestreo.

Extraída y modificada de CEUTA, 2013 [98]

Las muestras fueron tomadas en frascos estériles en los ocho principales lugares de baño, en tres cunetas y en dos cañadas, luego fueron guardadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su

utilización. Los sitios de muestreo así como la categoría a la que pertenecen se pueden observar en la Figura 13, mientras que la Tabla 6 y Anexo I desarrollan información sobre los mismos.

Tabla 6: Información sobre los sitios de toma de muestra.

Sitios de muestreo	Microcuenca	Nombre sitio de muestreo	Coordenadas (longitud, latitud)	
1	Tajamar El Coronel	Parte oeste del tajamar El Coronel	-34,7799 -56,0065	
2	■	Cuneta en avenida José María García a unos metros del punto donde se vierte en la cañada emisora del tajamar El Coronel	-34,7775 -56,0078	
3	Tajamar Caputo	En el tajamar Caputo cerca de la confluencia con las cañadas provenientes de Paso Escobar y de Bella Vista	-34,7700 -56,0108	
4		En el tajamar Caputo a unos metros del caño de salida de agua	-34,7712 -56,0114	
5		En el tajamar Caputo cerca de la confluencia con las cañadas provenientes de Paso Escobar y de Bella Vista	-34,7711 -56,0092	
6		▲	Cañada A	-34,7691 -56,0107
7		Cañada B	-34,7700 -56,0065	
8		●	Puente de la calle Tala	-34,7680 -56,0011
9	◆	Cantera de los Militares	-34,7631 -55,9924	
10	Cañada C	Pozo de los Bomberos	-34,7625 -55,9982	
11		Último pozo de la Ladrillera	-34,7666 -55,9984	
12		Puente de la calle 19 de Junio	-34,7640 -55,9992	
13		●	Cuneta de la calle Maldonado	-34,7549 -55,9979
14		Puente del camino República	-34,7552 -55,9960	
15		Cuneta de la calle Cabildo	-34,7555 -55,9957	
16	◆	Cañada D	-34,7568 -55,9885	

Se detalla la microcuenca a la que pertenece cada punto y la localización. Cuadrado: Tajamar El Coronel. Triángulo: Tajamar Caputo. Círculo: Cañada C. Rombo: Cañada D. Información extraída de CEUTA, 2013 [98].

4.2 Procesamiento de muestras

4.2.1 Concentración de partículas virales

La metodología utilizada busca concentrar las partículas virales al mismo tiempo que se desechan materiales contaminantes e interferentes presentes en la muestra para luego extraer el genoma y amplificarlo. Antes de comenzar con la etapa de concentración a cada muestra se le agregó 200 μ L de stock de Fago PP7, el cual servirá como control interno del proceso de concentración de partículas virales, extracción de ARN viral y obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) copia (ADNc).

La concentración viral se llevó a cabo por el método descrito por Puig y cols., 1994, para aguas residuales con las modificaciones realizadas previamente por Pina y cols., 1998 [123], [124]. Brevemente, en primer lugar se realizó la ultracentrifugación de 52 mL de la muestra de agua a 110000 xg durante 1 hora, el sedimento se resuspendió en 4 mL de buffer glicina 0,25 Normal pH 9,5 y fue incubado en hielo durante 30 minutos con agitación. A esta suspensión se le agregaron 4 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) 2x pH 7,2 y se centrifugó durante 20 minutos a 12000 xg, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 110000 xg durante 1 hora y el sedimento fue resuspendido en 0,3 mL de PBS 1x pH 7,2 y guardado a -80 °C. Todos los pasos fueron realizados manteniendo la cadena de frío.

4.2.2 Extracción del genoma viral

Para contar con el menor número posible de interferentes de la PCR y obtener un buen rendimiento en el ARN recuperado se utilizó para la extracción del mismo, el kit comercial "QIAmp Viral RNA Mini Kit®" (Qiagen, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de 140 microlitros (μL) del concentrado y se obtuvo un producto final en 60 μL suspendido en agua bidestilada (H_2O dd). Las muestras fueron guardadas a -80 °C hasta la síntesis del ADNc.

4.2.3 Obtención de ADNc

Al producto de la extracción genómica se le realizó la retrotranscripción con cebadores hexaméricos randómicos utilizando la enzima SuperScript® II (ambos de Invitrogen™, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 8 μL del ARN total se le agregaron 250 nanogramos de cebadores hexaméricos randómicos y 1,25 mM de cada deoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en un volumen final de 12 μL . Se incubó durante 5 minutos a 95 °C, seguido de un incubación en hielo durante 3 minutos, posteriormente se le agregó 8 μL de mezcla conteniendo 4 μL de Buffer First-Strand 5x, 20 unidades (U) de inhibidor de las ARNasas, 2 μL de DTT 0,1 M y 200 U de SuperScript™ II y agua bidestilada hasta completar. Se incubó 10 minutos a 25 °C, la transcripción reversa se efectuó durante 50 minutos a 42 °C, con una extensión final de 15 minutos a 70 °C. Todos los productos utilizados para esta reacción fueron de la línea Invitrogen. De esta manera el ARN total fue copiado a ADNc y el producto de esta reacción fue utilizado para la detección y/o cuantificación de cada uno de los virus como se detalla a continuación.

4.2.4 Fago PP7

El bacteriófago PP7 que infecta a *Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Leviviridae*. Es un virus con genoma ARN simple hebra de polaridad positivo de 26 nm de diámetro [125]. Este virus fue utilizado primariamente por Rajal y cols., 2007, como control interno de la eficiencia en el proceso de concentración e inhibición de la PCR por sus características biológicas y porque no se ha reportado hasta el momento su existencia en agua de la naturaleza [126]. En esta investigación una alícuota del fago se aplicó a cada muestra antes de comenzar con el proceso de concentración, así mismo a cada muestra se le realizó la PCR para la detección del fago con el objetivo de verificar que el proceso de concentración, extracción de ARN y síntesis de ADNc funcionaron correctamente.

4.2.4.1 Obtención de stock de fago

Primariamente se crecieron las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* en caldo de cultivo TSI durante una noche a 36 °C, el cultivo fue inoculado con el fago PP7 e incubado durante una noche a 36 °C. Para cosechar el bacteriófago el medio de cultivo fue filtrado con un filtro de 0,22 micras (Merck Millipore Corporation, Alemania). El producto de la filtración fue fraccionado de a 1mL y guardado en -20 °C hasta su posterior utilización.

4.2.4.2 PCR en tiempo final

Con el objetivo de detectar el fago PP7, a partir del ADNc producido con los cebadores randómicos, se llevo a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores descritos anteriormente por Rajal y col. 2007 [126]. A 2 µL de ADNc se le agregaron 23 µL de reacción conteniendo: 1X PCR Buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM Cloruro de Magnesio (MgCl₂), 1,25 unidades de Taq ADN Polimerasa (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos) y 0,2 µM de cada uno de los cebadores PP7 247f y 320r, que se detallan en la Tabla 7. La mezcla se sometió a una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3min, seguida de 40 ciclos de 94 °C, 30 seg; 50 °C, 30 seg; 72 °C, 45 seg, para finalizar con una extensión de 72 °C, 7 min. La visualización de los fragmentos amplificados y el resto de las condiciones de reacción se realizaron según lo descrito en 4.2.5.1.

Tabla 7: Cebadores utilizados en la PCR para detección del fago PP7.

Cebador	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
247f	Replicasa	Sentido	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT	74
320r		Antisentido	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG	

Datos extraídos de Rajal y col. 2007 [126].

4.2.5 Caracterización molecular

4.2.5.1 PCR en tiempo final

Con el objetivo de realizar la caracterización molecular se realizó la PCR en tiempo final de todas las muestras para cada uno de los virus estudiados partiendo del ADNc obtenido en la retrotranscripción con cebadores randómicos. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, 2004 Estados Unidos), utilizando como control positivo ARN extraído a partir de una muestra positiva de uso interno del laboratorio y como control negativo agua bidestilada (Gibco, Estados Unidos). Los productos de la amplificación fueron chequeados en geles de agarosa al 1,5 o al 2 % bajo luz UV utilizando Good View™ (SBS, China) como agente intercalante y un marcador de peso molecular de ADN de 100pb (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos).

4.2.5.1.1 Norovirus

Se llevo a cabo la PCR de la región D del gen que codifica para la proteína de la cápside VP1 según el protocolo descrito por Vinjé y cols., 2004, [127] que utiliza distintos cebadores para obtener la secuencia correspondiente del Genogrupo I y II. Para ello se preparó la mezcla de reacción conteniendo 1X PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 unidades de Taq ADN Polimerasa (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos), 0,2 μM de cada uno de los cebadores para el genogrupo I (CapA, CapB1 y CapB2) y para el genogrupo II (CapC, CapD1 y Cap D3) y H₂O dd hasta completar 22,5 μL. Los datos de los cebadores se encuentran en la Tabla 8.

La mezcla se sometió a una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C, 1 min; 40 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, para finalizar con una extensión de 72 °C, 7 min.

Tabla 8: Cebadores utilizados para la amplificación de la región D de Norovirus.

Genogrupo	Cebador	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
GI	CapA	VP1	Antisentido	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	177
	CapB2		Sentido	TAT GTI GAY CCW GAC AC	
	CapB1		Sentido	TAT GTT GAC CCT GAT AC	
GII	CapC		Antisentido	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	253
	CapD3		Sentido	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	
	CapD1		Sentido	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	

Extraída y modificada de Vinjé y cols., 2004 [127].

4.2.5.1.2 Rotavirus

Para Rotavirus, se amplificaron dos fragmentos que permiten la caracterización de los P y G tipos correspondientes a los genes que codifican para las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7, utilizando las reacciones de PCR semi-anidada descritas previamente [128]–[131]. En esta tesis se realizó una única primera ronda de amplificación incluyendo cebadores para ambos genotipos P y G en dicha reacción, en un volumen final de 20 µl con 5 µl de ADNc como molde. En la mezcla de reacción se colocó el volumen necesario para una concentración final de 0,5 µM de cada cebador (Con3dg, Con2dg, RA1 and RA4), buffer de PCR 1X con MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 2U de Taq ADN polimerasa (Kapabiosystems, Inglaterra) y agua bidestilada hasta completar 15 µl. En la Tabla 5 se muestra la información de los cebadores utilizados. Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 46 °C por 60 segundos y 72 °C durante 2 minutos, y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

La segunda ronda de amplificación fue llevada a cabo independiente para cada gen con 5 µl de una dilución 1/20 de la primera ronda en agua bidestilada. El volumen final de reacción fue de 50 µl utilizando los cebadores Con1dg/Con2dg o RA2/RA4 para VP4 y VP7, respectivamente. La PCR se llevó a cabo con los mismos reactivos, concentración y condiciones de ciclado para ambos genes. En la mezcla de reacción se colocó una concentración final de 1X buffer de PCR con MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 1 U Taq ADN polymerase (Kapabiosystems, Inglaterra) y agua bidestilada hasta completar. En la Tabla 9 se muestra la información de los cebadores utilizados. Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 60 seg., 42 °C por 2 min y 72 °C durante 1 min, finalizando con una extensión de 72°C durante 7 minutos.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la amplificación de una región de los genes que codifican para las proteínas de la cápside VP4 y VP7 de Rotavirus.

Cebador	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
Con3dg	VP4	Sentido	TGS YKW SBY TMA TTT ATA GAC A	876
Con2dg		Antisentido	ATT YCN GRC CAY TTA TAH CC	
Con1dg		Sentido	YTR CCA CCM ATK CAR AAT AC	201
RA1	VP7	Sentido	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1062
RA4		Antisentido	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	
RA2		Sentido	GGA CCA AGA GAA AAC GTA GC	257

4.2.5.1.3 Picobirnavirus

La detección de PBV fue realizada con los cebadores descritos por Rosen y cols., 2000, que amplifican el genogrupo I y II del virus, con la modificaciones introducidas por Bányai y cols., 2003 [101], [132] que permite la detección de ambos genogrupos en la misma reacción de PCR. Se utilizaron los pares de cebadores B23/B24 y B25/B43, Tabla 10. Para la reacción 5 µL de ADNc fueron agregados a una mezcla de 45 µL conteniendo buffer de PCR 1x con MgCl₂, 0,3 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 1,25U de la PFU ADN polimerasa (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos).

El ciclado utilizado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificación de 94 °C durante 1 minuto (desnaturalización), 49 °C durante 2 min (hibridación) y 72 °C durante 3 min (elongación), seguido de una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Tabla 10: Cebadores utilizados para la amplificación del GI yGII de PBV.

Genogrupo	Cebador	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
GI	B25	RdRp	Sentido	TGG TGT GGA TGT TTC	201
	B43		Antisentido	A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T	
GII	B23		Sentido	CGG TAT GGA TGT TTC	369
	B24		Antisentido	AAG CGA GCC CAT GTA	

Tabla extraída y modificada de Rosen y cols., 2000 [101].

Para poder secuenciar las muestras positivas del G II de PBV se realizó otra reacción de PCR con los cebadores para este genogrupo descritos por Smits y cols., 2011 [108]. A 5 µL de ADNc se le agregó una mezcla conteniendo buffer de PCR 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5mM MgCl₂, 0,3µM de cada primer (smitsF y R), Tabla 11, y 1,25 U Taq ADN polymerase (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos) y agua bidestilada estéril hasta completar los 50 µL. El ciclado se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C, 30 seg; 56 °C, 30 seg; 72 °C, 20 seg.

Tabla 11: Cebadores utilizados para la amplificación del GII de PBV.

Cebador	Región Genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
smitsF	RdRp	Sentido	GACCGGTWTGGATGTTTCCGATG	231
smitsR		Antisentido	GTATCTGTGCTGGSCGCAT	

4.2.5.2 Análisis de los productos de amplificación genómica

Los productos de PCR fueron analizados como se detalla en 4.2.5.1 y en los casos en que se visualizaron bandas del tamaño esperado se purificaron utilizando el kit de purificación de productos de PCR de Macherey Nagel, Alemania, siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron a secuenciar a Macrogen, Korea.

Las secuencias recibidas de Macrogen fueron editadas manualmente utilizando el programa BioEdit 7.2.5 y analizadas mediante el algoritmo Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) del NCBI (del inglés “National Center for Biotechnology Information”). Este programa analiza la relación de las secuencias obtenidas con las presentes en la base de datos públicas. Las secuencias que pertenecieron al virus estudiado fueron alineadas con secuencias de la base pública de datos utilizando el algoritmo Clustal W en el programa BioEdit 7.2.5. Para escoger el modelo evolutivo apropiado a aplicar en el conjunto de datos se utilizó el algoritmo Find Model del programa Mega 6. Se realizaron los árboles filogenéticos con el mismo programa mediante el método de máxima verosimilitud con el modelo evolutivo apropiado para cada alineamiento. Por otro lado, tanto la traducción de las secuencias nucleotídicas como el alineamiento de las secuencias proteicas se llevó a cabo mediante el programa BioEdit.

Las secuencias fueron nombradas según las convenciones establecidas para cada virus [133], [134]. En el caso de los Picobirnavirus a la nomenclatura establecida se le agregó un término que indica el muestreo y el sitio de donde fue tomada la muestra, ejemplo BB112. En el caso de los Rotavirus cada muestra se la nombró de igual manera.

4.2.6 Cuantificación viral

La cuantificación de las copias genómicas de Norovirus y Rotavirus presente en las muestras concentradas fue llevada a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el ADNc producto de la retrotranscripción con cebadores randómicos que se describió en el punto 4.2.3. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y las muestras fueron consideradas positivas cuando en los dos tubos se amplificó previo al ciclo 40 acorde al resultado del control negativo. Además cada ensayo de amplificación incluyó dos controles negativos para evitar falsos positivos y la curva de calibración correspondiente. Así mismo, todos los ensayos fueron realizadas en un equipo ABI 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos) con la tecnología de sondas TaqMan® sintetizadas por IDT. Los datos de amplificación fueron colectados y analizados utilizando el programa Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0.

4.2.6.1 Norovirus

La técnica descrita previamente por Pang y cols., 2005 [135], permite detectar y cuantificar en una sola reacción los genogrupos I y II de Norovirus. Para esto se utilizaron los cebadores y sondas descritos por Kageyama y cols., 2003, que poseen como blanco la región del genoma de Norovirus, ubicada en la conjunción del ORF1 y ORF2 donde existe alta homología de secuencia [136]. Las sondas para ambos genogrupos fueron marcadas con distintos fluoróforos que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda, de manera que en una misma reacción se los cuantifica independiente uno de otro. Así para el genogrupo I se utilizaron dos sondas marcadas con el fluoróforo FAM mientras que para el genogrupo II se utilizó una sonda marcada con el fluoróforo Cy5. Las sondas y cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 12.

Para la cuantificación se realizaron dos curvas de calibración constituidas cada una por 7 diluciones seriadas en base 10 a partir de los plásmidos conteniendo el fragmento blanco de concentración conocida $6,1 \times 10^7$ y $7,7 \times 10^7$ cg/ μ l para el genogrupo I y II, respectivamente. Para realizar este ensayo a 23 μ L de reacción se mezclaron las cantidades necesarias para obtener una concentración final de 0,4 μ M de cada cebador (G1F, G1R, G2R y G2F), 0,2 μ M de cada sonda (G1a probe, G1b probe y G2 probe), 50 nM de 5-carboxy-X-rhodamine succinimidyl éster, Master Mix PCR 1X SensiMixTM II Probe Kit (BIOLINE[®]) y agua bidestilada hasta completar. A esta mezcla se le agregaron 2 μ L de ADNc, las diluciones del plásmido o agua. El ciclado utilizado fue 95 °C; 10 min, 40 ciclos (95 °C, 20 seg; 60 °C, 1 min).

Tabla 12: Cebadores y sondas utilizadas para la amplificación y cuantificación del GI y GII de NoV.

Genogrupo	Cebador o sonda	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
GI	G1F	Conjunción del ORF1 y ORF2	Sentido	GYTGGATGCGNTTYCATGA	85
	G1R		Antisentido	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
	G1a probe		Antisentido	FAM-AGATYCGCATCYCCTGTCCA-TAMRA	
	G1b probe		Antisentido	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	
GII	G2F		Sentido	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	98
	G2R		Antisentido	TCGACGCCATCTTCATTACA	
	G2 probe		Sentido	Cy5-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	

TAMRA es el quencher utilizado. Tabla extraída y modificada de Pang y cols., 2005 [135].

4.2.6.2 Rotavirus

La cuantificación de Rotavirus fue llevada a cabo usando el protocolo descrito previamente por Zeng y cols., 2008 [137], que tienen como blanco una región conservada del gen que codifica para la proteína NSP3. La curva de calibración se realizó con siete diluciones seriadas al décimo de un plásmido que contiene el

fragmento de NSP3 a amplificar de concentración $7,6 \times 10^7$ cg/ μ l. Para realizar el ensayo a 2 μ L de ADNc, de las diluciones del plásmido o agua bidestilada se le agregó 23 μ L de la mezcla de reacción conteniendo 50 nM 5-carboxy-X-rhodamine succinimidyl éster, Master Mix 1X PCR SensiMix™ II Probe Kit (BIOLINE®), 0,4 μ M de cada cebador y 0,2 μ M de cada sonda, las sondas (NSP3 probe) y cebadores (NSP3 f y r) se muestran en la Tabla 13. Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C; 20 s, 60 °C; 1 min.

Tabla 13: Cebadores y sondas utilizadas para la amplificación y cuantificación de RV.

Cebador o sonda	Región genómica	Polaridad	Secuencia 5´-3´	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
NSP3 f	NSP3	Sentido	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	86
NSP3 r		Antisentido	GGTCACATAACGCCCTATAGC	
NSP3 probe		Sentido	FAM-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB	

MGB es el quencher utilizado.

4.3 Mapas y análisis estadístico

Mediante el programa ArcGis 10 se realizaron los mapas donde se incluyeron datos de densidad poblacional tomados del censo poblacional realizado por el INE en 2011 [119] y la cuantificación viral realizada en esta tesis.

El programa Past 3.11 fue empleado para los test estadísticos aplicados a los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis. Para que el resultado sea comparable con los datos bacteriológicos obtenidos por el Servicio de Evaluación y Calidad Ambiental de la Intendencia Municipal de Montevideo que se encuentran publicados en el libro “Diagnóstico socioambiental orientado al estudio de las parasitosis intestinales y zoonosis” [98] se tomó en cuenta los resultados de los tres primeros muestreos.

Se analizó mediante el test de Levene’s la distribución de los datos. Para las variables con distribución normal se realizó el test de ANOVA, mientras que para las variables que no mostraron distribución normal se realizó el test de Kruskal-Wallis y posteriormente el test de Mann-Whitney para comparar entre pares de variables. Para todos los análisis se consideró un nivel de significación de p menor a 0,05.

Así mismo, mediante el programa Excel (Microsoft Office Package) se llevó a cabo la comparación de los datos de cuantificación obtenidos con los datos de temperatura y precipitación tomados en la estación de Carrasco ubicada a 6 km. al suroeste del territorio de estudio. Los datos de temperatura y precipitación fueron cedidos por el Instituto Nacional de Meteorología y se utilizó un promedio de los mismos de las 48 horas anteriores a la colecta.

5. Resultados

Un total de 55 muestras fueron colectadas de 16 sitios en cuatro muestreos, realizados en octubre, noviembre y diciembre de 2011 y febrero de 2012. Las condiciones meteorológicas en ese período fueron diversas por lo que en la Tabla 14 se presenta la situación para cada muestreo.

Tabla 14: Condiciones meteorológicas en cada muestreo.

Muestreo	1	2	3	4
Temperatura (°C)	15,3	20,1	19,2	24,3
Precipitaciones (mL)	0	15,3	7,8	1

Se presenta el promedio de las 48 horas previas al muestreo para cada parámetro.

A la totalidad de las muestras se le realizó la concentración de partículas virales, extracción de su genoma y retrotranscripción con cebadores hexaméricos randómicos. Este proceso se llevó a cabo en forma exitosa dado que la PCR con cebadores específicos del control interno, fago PP7, mostró bandas del tamaño esperado en gel de agarosa al 2% para todas las muestras, Figura 14. Una vez corroborada la eficiencia de la concentración de partículas virales, de la extracción de su genoma y de la retrotranscripción, se llevó a cabo la detección y cuantificación de los virus entéricos estudiados. De la interpretación general de los datos obtenidos se desprende que en 50 (90,1%) de las muestras analizadas se logró detectar al menos un virus, mientras que RV fue detectado en 37 (67%) muestras, Norovirus lo fue en 28 (50,1%) muestras y Picobirnavirus en 5 (9%) muestras. Así mismo, se destaca la amplia distribución de los NoV y RV en todo el territorio estudiado luciendo sitios positivos en todas las microcuencas, a saber Tajamar El Coronel, Tajamar Caputo, Cañada C y Cañada D.

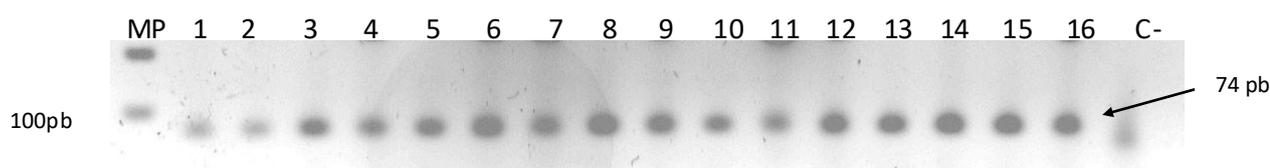


Figura 14: Detección molecular del Fago PP7 en muestras ambientales de Barros Blancos. Gel de agarosa al 2% de las muestras del tercer muestreo del carril 1 al 16 correspondiente a los sitios 1 al 16, respectivamente. Control negativo de las PCR, C-. El marcador de peso molecular (MP) utilizado fue de 100pb (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder).

5.1 Presencia de virus entéricos en las aguas de Barros Blancos

A partir del ADNc obtenido se llevó a cabo la caracterización molecular de Norovirus para la cual se utilizó la técnica de PCR que amplifica la región D del virus, mediante esta metodología en ninguna muestra se visualizó la banda esperada en gel de agarosa al 1,5%.

Por otro lado, para Rotavirus se llevaron a cabo las PCRs anidadas que amplifican un fragmento de los genes que codifican para las proteínas VP4 y VP7 de manera de identificar los P y G tipos circulantes en la zona. En la Figura 15 se muestra un gel de agarosa donde se visualizan fragmentos genómicos amplificados del tamaño esperado para la segunda ronda de PCR de ambos genes. Las bandas de 211pb corresponden al producto de amplificación esperado para el gen que codifica para la proteína VP4, mientras que las bandas de 257pb corresponden al producto de amplificación del gen que codifica para la proteína VP7. Mediante esta técnica 12 de los 16 sitios presentaron al menos una muestra positiva en alguno de los muestreos y mostraron una banda de tamaño esperado para al menos VP4 y/o VP7 el 36% de las muestras. De este 36%, 18 muestras amplificaron la región correspondiente al gen que codifica para la proteína VP4 mientras que 9 lo hicieron para VP7.

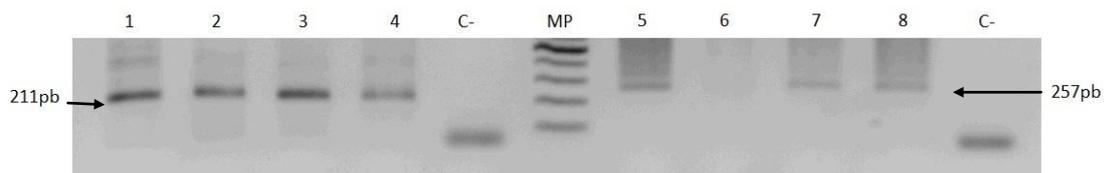


Figura 15: Detección molecular del genoma de Rotavirus en muestras ambientales de Barrios Blancos. Gel de agarosa al 1,5% de la PCR de los genes que codifican para la proteína VP4, izquierda, y VP7, de derecha, para muestras del segundo muestreo. Carril 1-4: muestras del sitio 5, 6, 7 y 8 amplificadas para VP4, Carril 5-8: muestras del sitio 2, 3, 5 y 6 amplificadas para VP7. C-: control negativo. El marcador de peso molecular (MP) utilizado fue de 100pb (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder).

Dieciséis de las muestras positivas para VP4 y la totalidad de las positivas para VP7 fueron secuenciadas y las secuencias obtenidas analizadas mediante el algoritmo Blastn del NCBI, el cual refleja la relación de las secuencias obtenidas con las presentes en la bases públicas de datos. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 15 con la descripción de la secuencia de la base pública de datos que mostró mayor porcentaje de identidad con la secuencia obtenida. Se puede observar que las secuencias presentadas en esta tesis poseen una alta identidad con secuencias de Argentina, Brasil, de Madagascar y Japón, así como secuencias provenientes de humano y bovinos. Como se muestra en la Tabla 15, las muestras positivas se encuentran distribuidas en las distintas microcuencas estudiadas y en todos los muestreos realizados. Así mismo, en la Figura 16 se gráfica el porcentaje de los P y G tipos detectados.

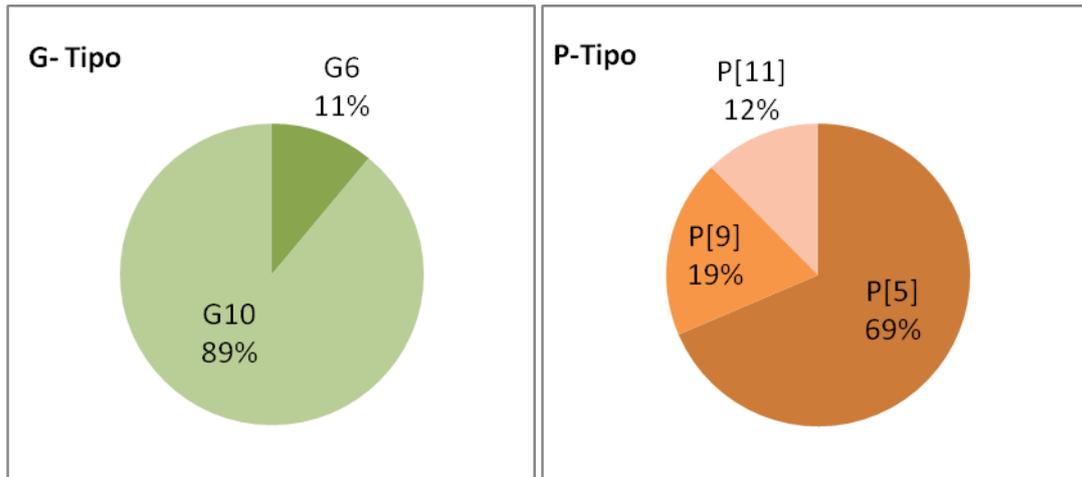


Figura 16: Distribución de G y P-tipos. Gráficos circulares que muestran la distribución porcentual de los G y P tipos detectados en esta tesis.

Tabla 15: Identificación genotípica por análisis de secuencias.

Sitios de muestreo	Microcuenca	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3		Muestreo 4	
		VP4	VP7	VP4	VP7	VP4	VP7	VP4	VP7
1	■								
2	■	Cow Arg G6P[5]		Hu Mad G3P[9]	Hu Bra G10P[9]				
3	▲	Cow Arg G6P[5]							
4	▲	Cow Arg G6P[5]						Cow Arg G10P[11]	
5	▲	Hu Mad G3P[9]	Hu Bra G10P[9]	Cow Arg G6P[5]	Hu Bra G10P[9]			+	
6	▲			Cow Arg G6P[5]	Hu Bra G10P[9]	Cow Arg G6P[5]			
7	▲		Hu Bra G10P[9]	Cow Arg G6P[5]	Hu Bra G10P[9]				
8	●			Cow Arg G6P[5]	Hu Bra G10P[9]				
9	◆	+			Hu Bra G10P[9]				
13	●	Bovin Jap G10P[11]							
14	●							Cow Arg G6P[5]	
15	●	Cow Arg G6P[5]				Hu Mad G3P[9]			
16	◆							Cow Arg G6P[5]	Cow Arg G6P[5]

Muestras positivas mediante la técnica de caracterización molecular de Rotavirus, la descripción en cada muestra corresponde a la secuencia de la base pública de datos que mostró mayor porcentaje de identidad mediante el algoritmo Blastn. Cow Arg: vaca Argentina; Bovin Jap: bovino Japon; Hu Bra: Humano Brasil; Hu Mad: Humano Madagascar; +: muestra positiva de la cual no fue posible obtener secuencia. Los sitios acentuados en negrita corresponden a aquellos incluidos en el muestreo 4. Cuadrado: Tajamar El Coronel. Triangulo: Tajamar Caputo. Circulo: Cañada C. Rombo: Cañada D.

Para estudiar la relación entre las secuencias circulantes en aguas de Barros Blancos con las publicadas previamente a nivel mundial en las bases de datos y las obtenidas en investigaciones previas realizadas en aguas de Uruguay se efectuaron análisis filogenéticos para cada gen utilizando el programa Mega 6. Es de destacar que las secuencias publicadas en los artículos recientes de López Tort no pudieron ser incluidas en el análisis dado que las regiones amplificadas en ambos trabajos no son solapantes con las secuencias generadas en esta tesis [81], [89]. Para estos análisis se descartaron las secuencias menores a 200pb para VP4 y 224pb para VP7, constituyendo un número final de 13 muestras de VP4 y 7 de VP7. En las Figuras 17 y 18 se muestran los árboles filogenéticos correspondientes a los P y G tipos, respectivamente.

La topología del árbol filogenético realizado con secuencias de VP4 (Figura 17) muestra la formación de 7 clados bien definidos acorde a la clasificación en P tipos para este gen, formando parte de los agrupamientos de los genotipos P[5], P[9] y P[11] las secuencias presentadas en esta tesis. El clado P[5] incluye secuencias que congregan variantes bovinas de Europa y América, de G- tipo G6 y G10, circulantes entre en 1993 y 2002. Así mismo este grupo incluye la única secuencia de humanos P[5] descrita hasta el momento, la cual proviene de Japón, 1994, y se ha clasificado como G1. Las secuencias publicadas en este trabajo forman un grupo con alto apoyo estadístico, el cual se encuentra constituido por 9 secuencias provenientes de las microcuencas Tajamar El Coronel (muestreo 1 sitio 2), Tajamar Caputo (muestreo 1 sitio 3 y 4; muestreo 2 sitio 5, 6 y 7 y muestreo 3 sitio 6) y Cañada C (muestreos 1 sitio 15 y muestreo 2 sitio 8). Por otro lado, dentro del clado del genotipo P[9] se observan secuencias Humanas de América y Asia que han sido clasificadas para el gen VP7 como G3 y G10 circulantes entre 1982 y 2013. Con estas agrupan tres secuencias presentadas en esta tesis que a su vez se encuentran formando un grupo con alto apoyo estadístico con una secuencias de Estados Unidos circulante en 2013, genotipo G3P[9], y una proveniente de aguas residuales de Ecilda Paullier que circuló en febrero de 2012 coincidiendo con el período de toma de muestras de esta tesis. Estas tres secuencias pertenecen cada una a distintas microcuencas y muestreos a saber Tajamar El Coronel (muestreo 2 sitio 2), Tajamar Caputo (muestreo 1 sitio 5) y Cañada C (muestreos 3 sitio 15). Para las dos primeras muestras también se pudo determinar por secuenciación el G-tipo, siendo estas G10P[9] en la clasificación binaria de RV. Por último, se observa el clado P[11] el cual está constituido por una secuencia de RV humano genotipo G10P[11] proveniente de India circulante en 2004, dos variantes bovinas de América circulantes en 2003 y 2004, G6P[11] y G10P[11] respectivamente, además secuencias ambientales provenientes de aguas residuales de Canelones del año 2011 y 2012 y las secuencia proveniente de esta tesis del sitio 2, Tajamar El Coronel, tomada en el cuarto muestreo en febrero de 2012. Es de destacar que las

muestras ambientales uruguayas tomadas en la ciudad de Canelones nuevamente coinciden temporalmente a las presentadas en esta tesis.

Por su parte, la Figura 18 muestra el árbol filogenético de los G tipos donde se encuentran representados los principales grupos de clasificación de éstos. Del análisis se desprende que las secuencias presentadas en esta tesis se encuentran en el clado del genotipo G10 formando un único agrupamiento con alto apoyo estadístico. En éste se observan las secuencias provenientes de Tajamar El Coronel (muestreo 2 sitio 2), tajamar Caputo (muestreo 1 sitio 5 y 7; muestreo 2 sitio 5 y 7), Cañada C (muestreo 2 sitio 8) y Cañada D (muestreo 2 sitio 9). Así mismo, este grupo se une con alto apoyo estadístico con una secuencia proveniente de aguas residuales circulante en Canelones

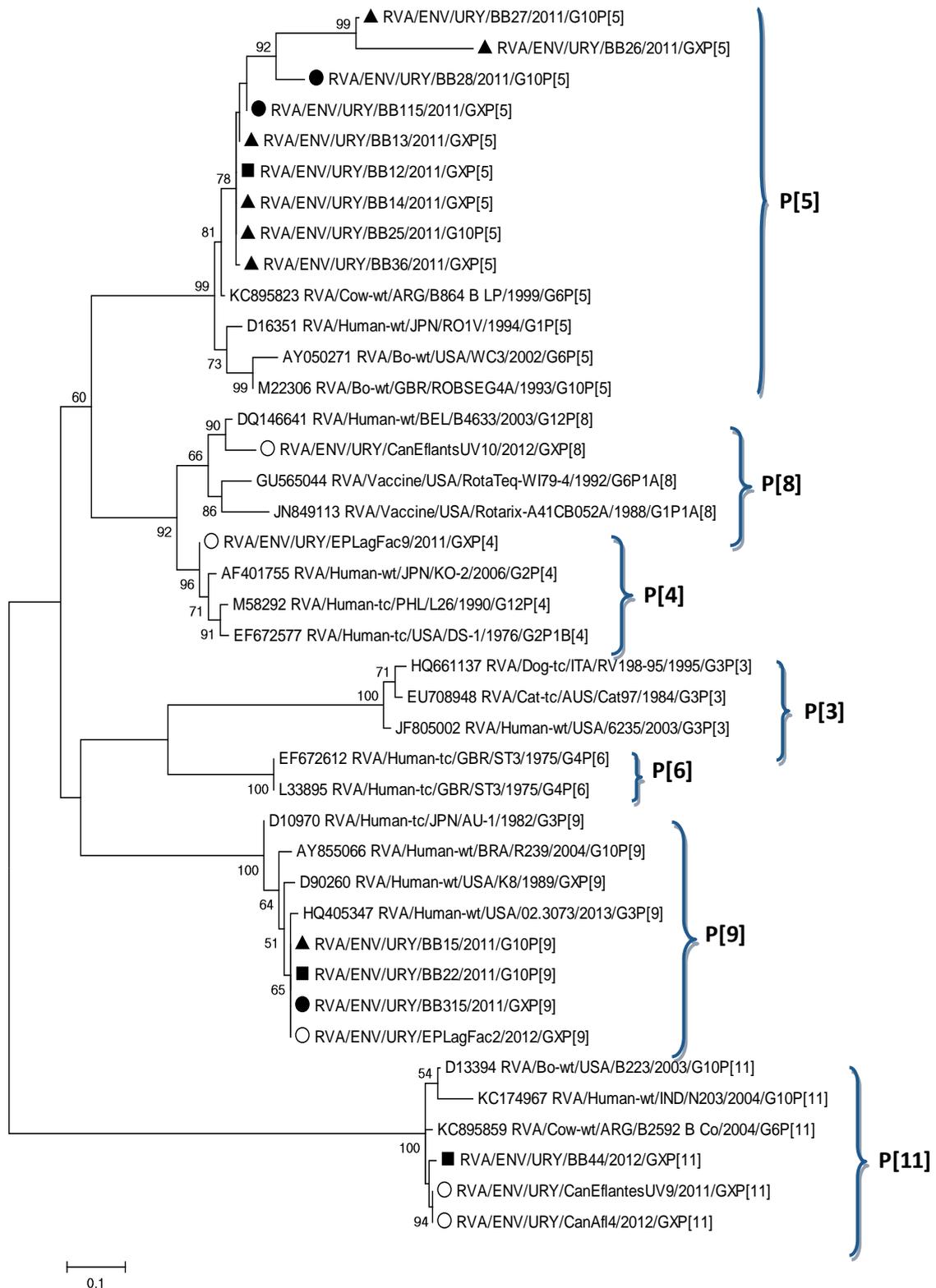


Figura 17: Análisis filogenéticos de las secuencias del gen que codifica para la proteína VP4. Árbol realizado con el método de máxima verosimilitud con el modelo Tamura 3 parámetros con distribución gama y sitios invariables. El árbol se construyó con un alineamiento de 184 nt. Cuadrado: Tajamar “El coronel”, Triángulo: Tajamar Caputo y círculo: Cañada C. Círculo hueco: Secuencias uruguayas procedentes de trabajos anteriores. Se muestran los valores de “bootstrap” mayores a 50.

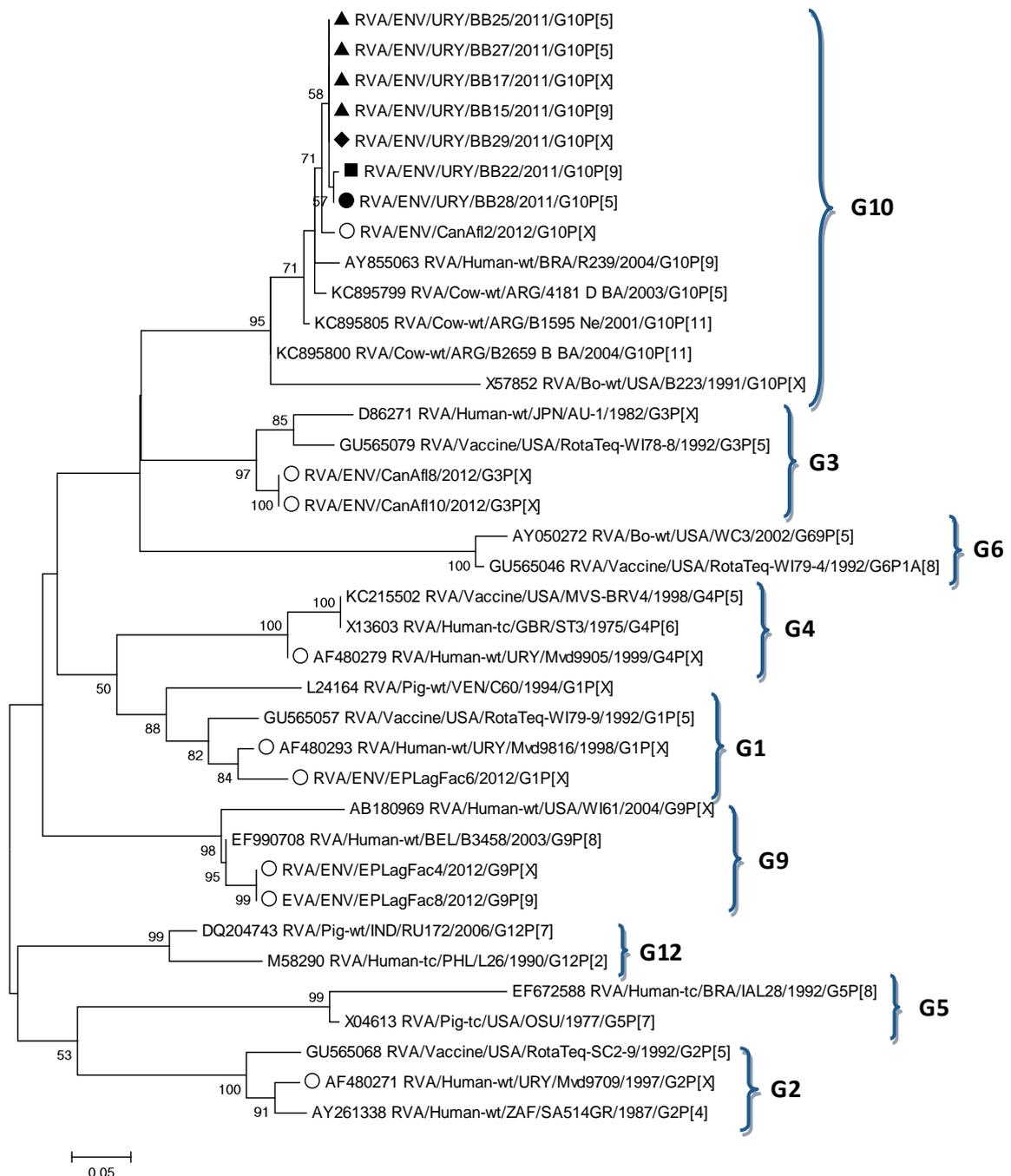


Figura 18: Análisis filogenéticos de las secuencias del gen que codifica para la proteína VP7. Árbol realizado con el método de máxima verosimilitud con el modelo Tamura 3 parámetros con distribución gama y sitios invariables. El árbol se construyó con un alineamiento mayor de 259 nt. Se muestran los valores de "bootstrap" mayores a 50. Cuadrado: Tajamar "El coronel", triángulo: Tajamar Caputo, círculo: Cañada C y rombo: Cañada D.

en febrero de 2012, mismo periodo temporal de este estudio. El clado G10 también se encuentran constituido por tres cepas bovinas provenientes de Argentina circulantes entre el 2001 y 2004, de genotipos G10P[5] y G10P[11], una secuencia de bovino proveniente de Estados Unidos circulante en 1991 y una secuencia humana de Brasil obtenida en 2004 genotipo G10P[9].

Como se desprende del análisis de ambos árboles, algunas de las muestras pudieron ser doblemente genotipificadas, en este sentido observamos tres muestras con el genotipo G10P[5] y dos con el genotipo G10P[9]. Las muestras del genotipo G10P[5] pertenecen todas al segundo muestreo realizado en las microcuencas Tajamar Caputo y Cañada C, mientras que las de genotipo G10P[9] pertenecen a los muestreos uno y dos a las microcuencas Tajamar El Coronel y Tajamar Caputo, respectivamente.

Por otro lado, con el objetivo de realizar la caracterización molecular de los PBV se llevó a cabo una multiplex con los cebadores para la detección del gen que codifica la RdRp los cuales sirven para detectar el genotipo I y II del virus en la misma reacción. Posteriormente a las muestras positivas para el genotipo II se les realizó una segunda PCR cuyo producto fue utilizado para secuenciar. En la Figura 19 se muestran los geles que contienen los productos de amplificación para cada genogrupo. Un total de cinco muestras, 9% del total, mostraron bandas en el tamaño esperado, dos para el genogrupo I y tres para el genogrupo II como se detalla en la Tabla 16.



Figura 19: Detección molecular del genoma de Picobimavirus genogrupo I y II en muestras ambientales de Barros Blancos. Geles de agarosa que muestran la amplificación de la RdRp. Izquierda: genogrupo I. Carril 1: muestra 13 del segundo muestreo; Carril 2: control negativo. Derecha: producto de amplificación de la PCR con los cebadores smitsF y R, en los carriles 1, 2, y 3 se muestra el producto de la amplificación de las muestras 3, 4 y 5 del tercer muestreo, respectivamente. MP: Marcador de Peso Molecular 100pb (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder).

Tabla 16: Muestras positivas para el genogrupo I y II de PBV.

Microcuenca	18/10/2011	10/11/2011	20/12/2011
3	▲		GII
4	▲		GII
5	▲		GII
12	●	GI	
13	●		GI

GI: Genogrupo I, GII: Genogrupo II. Triángulo: taja mar Caputo. Círculo: Cañada C.

En cuanto a la caracterización molecular de los PBV, se pudo obtener la secuencia de un fragmento de la ARN polimerasa ARN dependiente del segundo muestreo en el sitio 13 correspondiente al genogrupo I y de las 3 muestras del GII. Para ambos genogrupos se construyeron árboles filogenéticos con el fin de estudiar la relación de las secuencias obtenidas con las registradas previamente en la base de datos pública. En la Figura 20, se observa el árbol construido para el Genogrupo I, la topología del mismo muestra dos grandes clados con subgrupos. El primer clado está constituido por cinco subgrupos, uno de estos muestra la secuencia presentada en este trabajo agrupada con secuencias de PBV provenientes de humanos, monos y ambiente de América, Asia y Europa que han circulado entre 1995 y 2009. Es interesante notar que otras secuencias uruguayas se encuentran en otros agrupamientos del primer clado como las secuencias de muestras humanas y en el segundo clado las secuencias de muestras animales.

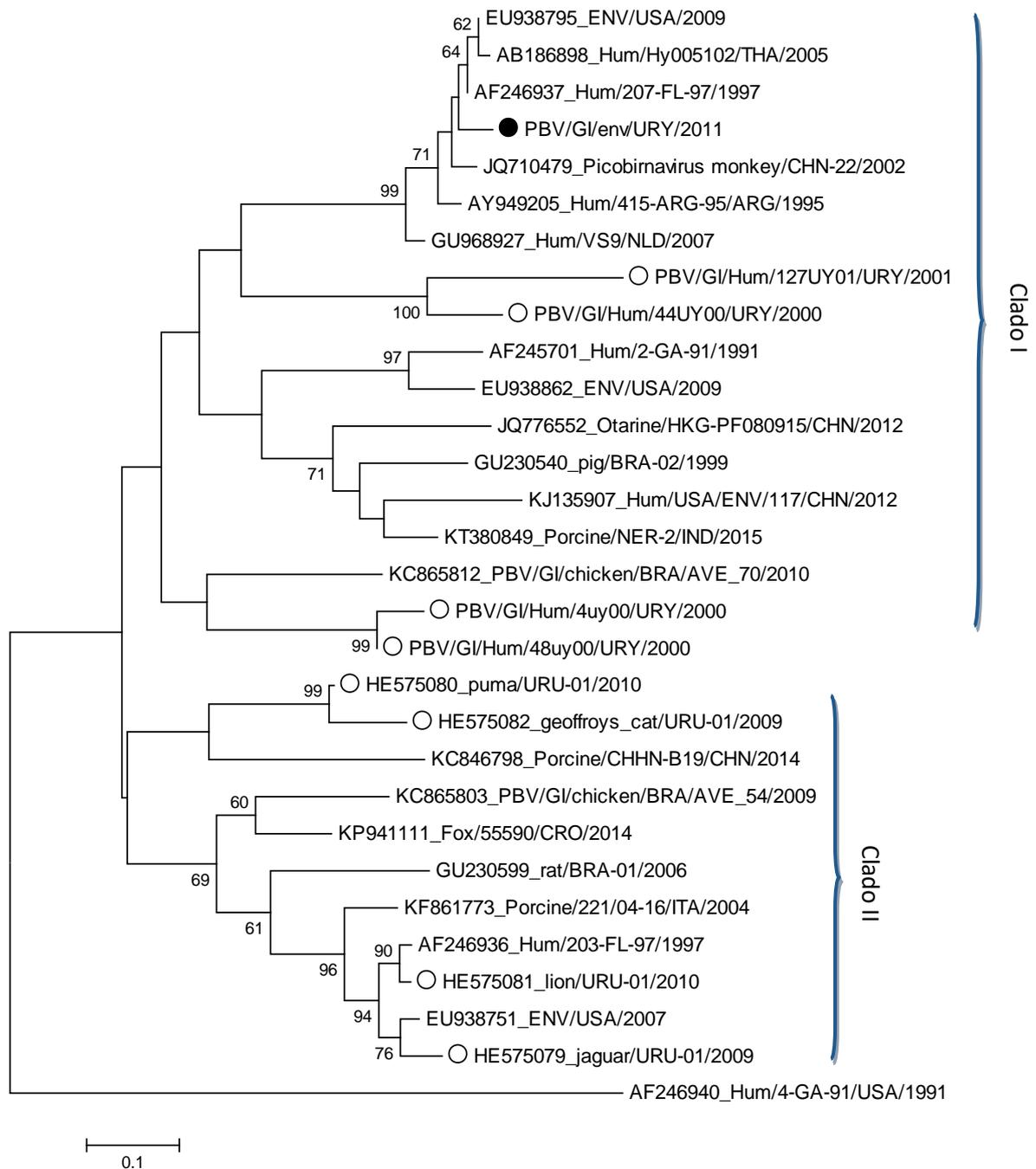


Figura 20: Análisis filogenético de PBV genogrupo I. El árbol se realizó con el método de máxima verosimilitud y el modelo Kimura 2 parámetros, con un alineamiento de 175 nt de un fragmento del gen que codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente. La secuencia que se presenta en este trabajo se encuentra precedida por un círculo que representa la microcuenca Tajamar “El Coronel”. Círculo hueco: secuencias de PBV uruguayas publicadas previamente. Grupo externo: AF246940 Human 4-GA-91, secuencia perteneciente al GII. Se muestran los valores de “bootstrap” mayores a 50.

Por otro lado, se pudo obtener la secuencia de las tres muestras pertenecientes al genogrupo II de PBV y realizar el análisis filogenético con la secuencia de la RdRp que se presenta en la Figura 21, del cual se desprende que las secuencias se encuentran en dos agrupamientos definidos en esta tesis como grupo I y II. El primer grupo cuenta con alto apoyo estadístico e incluye una de las secuencias presentadas en este trabajo

del sitio 5 en el tercer muestreo, secuencias humanas provenientes de América, Asia y Europa y porcinas provenientes de Asia y Europa, todas ellas circulantes entre 1991 y 2012. Por otro lado, el segundo grupo cuenta con las otras dos secuencias de este genogrupo (tercer muestreo sitio 3 y 4) agrupadas entre si con un apoyo estadístico elevado y con otras secuencias porcinas de Asia y Europa, así como secuencias humanas de India que circularon entre 2007 y 2012.

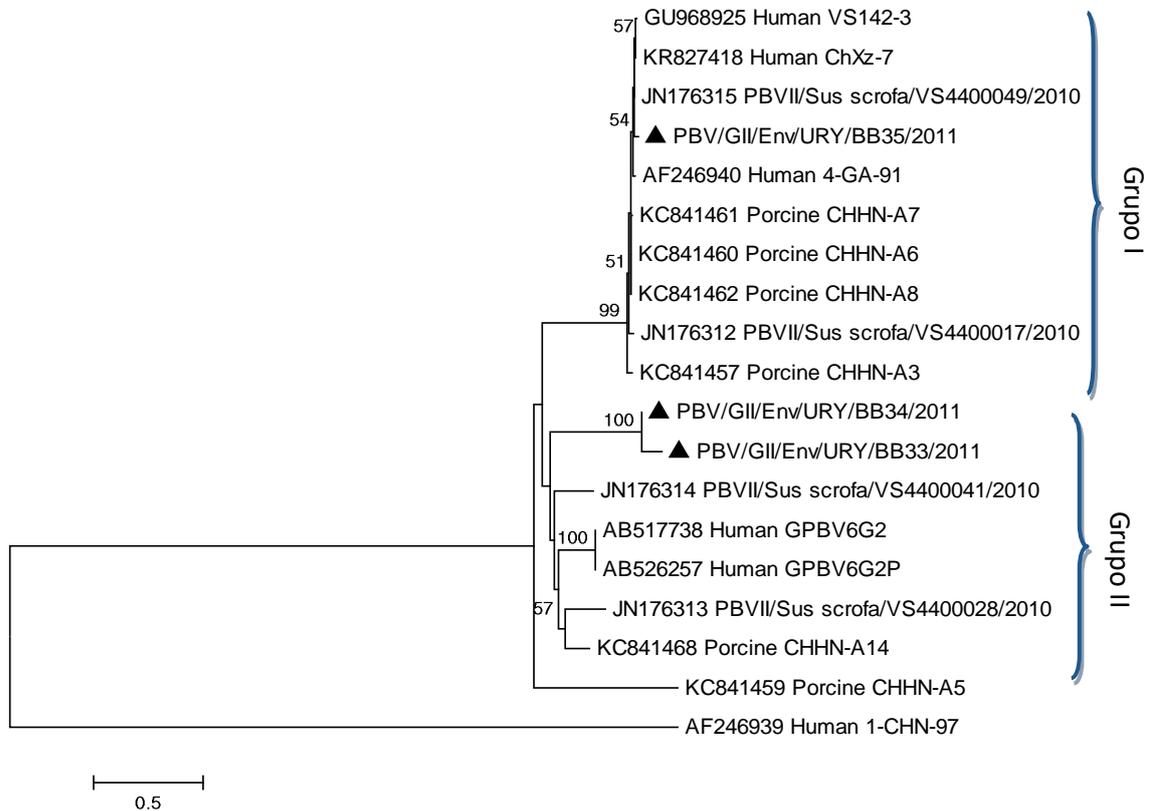


Figura 21: Análisis filogenético de PBV genogrupo II. Realizado con el método de máxima verosimilitud y el modelo Tamura 3 parámetros con distribución gama y sitios invariables con un alineamiento de 227 nt de un fragmento del gen que codifica para la RdRp. Las secuencias presentadas en este trabajo se encuentran precedidas por un Triángulo, las mismas corresponden a la microcuenca Tajamar Caputo. Se muestran los valores de “bootstrap” mayores a 50.

Es interesante señalar que estas tres muestras de PBV GII corresponden a un mismo muestreo y a la misma microcuenca, sin embargo fueron discriminadas en dos clados bien diferenciados. Así para continuar con el análisis del Genogrupo II de los Picobirnavirus y con el objetivo de observar si hay diferencias entre los dos grupos mostrados en el árbol de la Figura 21 se realizó el alineamiento de la secuencias proteicas de la RdRp que se muestra en la Figura 22. El mismo muestra que entre ambos grupos existen diferencias, entre las que lucen una delección en la posición 226 del aminoácido Lisina y sustituciones puntuales de varios aminoácidos como de Alanina por Serina, Tirosina por Aspartato, Treonina por Glutamina, Prolina por Glicina en las posiciones 215, 243, 251 y 255, respectivamente.

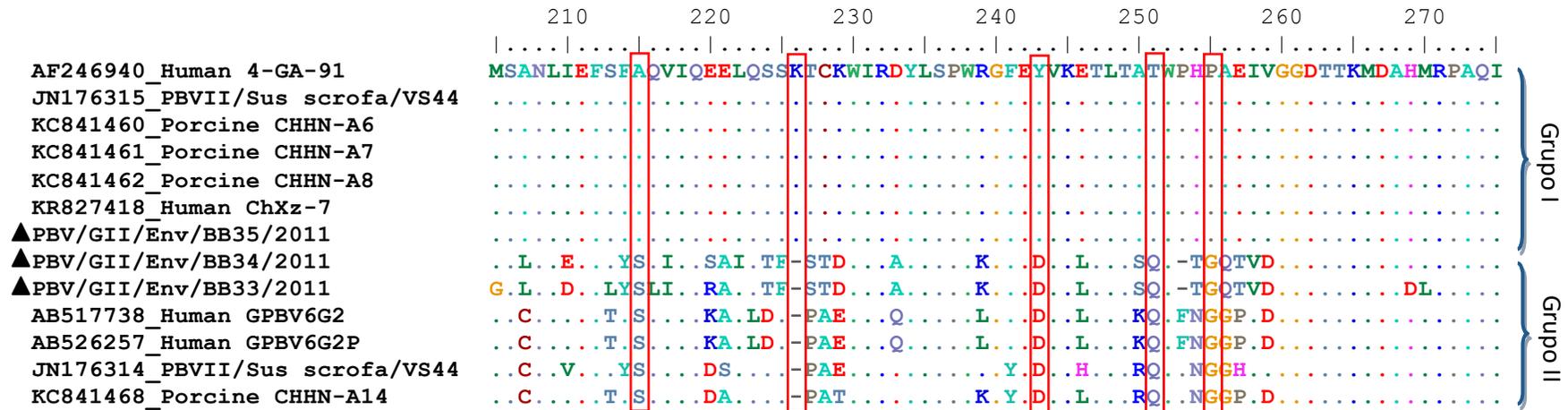


Figura 22: Alineamiento realizado con las secuencias proteicas de la RdRp obtenidas mediante la traducción de las secuencias de ADN presentes en las bases públicas de datos para el genogrupo II de PBV. Tanto la traducción como el alineamiento se realizaron mediante el programa BioEdit. Las secuencias de este trabajo se presentan anteceditas de un triángulo. El rectángulo rojo indica las diferencias entre ambos grupos.

Continuando con los análisis y con el objetivo de cuantificar el genoma viral presente en cada muestra se realizó mediante la técnica de PCR en Tiempo Real la cuantificación de Norovirus y Rotavirus. Para Norovirus se utilizó sondas Taqman específicas para el genogrupo I y II, mientras que para Rotavirus se utilizó una sonda específica del grupo A. Se realizaron las curvas de calibración puestas a punto en tesis anteriores de Alberti y Betancour [40], [87] a partir de las cuales se calculó el número de copias genómicas virales para cada muestra las cuales se encuentran en el Anexo I. Es de destacar que mediante el uso de esta metodología en todos los sitios de toma de agua se detectó al menos un virus en alguno de los muestreos realizados y que 40 (72,7%) de las muestras fueron positivas para al menos uno de los virus analizados. Ninguno de los dos genomas virales fue detectado y cuantificado en el muestreo 4 y en los sitios correspondientes a la microcuenca Tajamar El Coronel muestreo 2 sitio 2, la microcuenca Tajamar Caputo muestreo 1 sitio 7, muestreo 3 sitio 5, a la microcuenca Cañada C muestreo 2 y 3 sitio 11, y a la microcuenca Cañada D muestro 2 y 3 sitio 9 y muestro 3 sitio 16.

Por su parte, la Tabla 17 muestra que los NoVGI se detectaron en las microcuenca Tajamar Caputo y Cañada C en los primeros tres muestreos y que el mayor promedio de cuantificación de copias genómicas se obtuvo en el tercer muestreo en la microcuenca Tajamar Caputo, mientras que el menor se obtuvo en el primer muestreo en la misma microcuenca. Así mismo, en la Tabla 17 se observa que el rango de concentraciones mas amplio para este virus se obtuvo en la microcuenca Cañada C en el primer muestreo.

En la Tabla 18 se observa que NoVGII fue detectado en las cuatro microcuencas, aunque en el segundo y tercer muestreo sólo se detectó en dos de ellas, a saber en el segundo muestreo Tajamar Caputo y Cañada C y en el tercer muestreo Cañada C y D. Por otro lado, el mayor promedio de concentración se obtuvo en el primer muestreo en el tajamar Caputo y el menor en las microcuencas Tajamar el Coronel y Cañada D en el primer y tercer muestreo, respectivamente. Así mismo, el mayor rango de concentración se observó en el Tajamar Caputo, muestreo 1.

De la Tabla 19 se desprende que RV fue detectado en las cuatro microcuencas solo en el muestreo 2, mientras que en el muestro 1 no se detectó este virus en las microcuencas Tajamar El Coronel y Cañada D y en el tercer muestreo en la microcuenca Cañada C. El mayor promedio de concentración para este virus se obtuvo en la microcuencas Cañada C en el tercer muestreo y el menor en la microcuenca Tajamar El Coronel en el muestreo 2. Mientras que el rango de concentración mas amplio se obtuvo en la microcuenca Cañada C del primer y tercer muestreo.

En la Figura 23 se observan gráficos donde se presentan los tres virus en conjunto, en estos se destaca que NoVGI fue detectado en menor medida que el resto de los virus. Mientras que en los datos presentados por muestreo en la Figura 23 (gráficos superiores) se visualiza que este virus obtuvo un porcentaje de detección alto en el primer muestreo que disminuyó drásticamente en los siguientes, en los que sólo se detectaron dos muestras positivas (Tabla 17). De la Figura 23 (gráficos inferiores) se desprende que el Norovirus GI sólo se detectó en las microcuencas Tajamar Caputo y Cañada C en porcentajes y promedios de concentración bastante menores que los otros dos virus estudiados, por estas razones en los siguiente análisis sólo se tomaron en cuenta los datos obtenidos para los virus NoVGII y RV.

Por otro lado en la Figura 23 (gráficos superiores) también se observa que tanto el porcentaje de muestras positivas por muestreo para NoVGII como para RV fue mayor al 30% en los primeros tres muestreos y que NoVGI mostró mayor porcentaje de positividad en el muestreo 1 y 2, mientras que en el muestreo 3 Rotavirus obtuvo más sitios positivos. La Figura 23 (gráficos inferior izquierdo) muestra que la microcuenca que obtuvo menor porcentaje de muestras positivas para ambos virus fue la Cañada D, mientras que la que obtuvo la mayor fue la Cañada C para NoVGII y Tajamar Caputo para RV, en ambos casos superando el 50 % de positividad. Así mismo luce en las gráficas donde se muestra el logaritmo del promedio de la concentración por virus (Figura 23, gráficos superior e inferior derechos) que los RV fueron los virus con mayor promedio tanto si se considera los datos por muestreo como por microcuenca.

Tabla 17: Datos de cuantificación de Norovirus Genogrupo I considerados por muestreo y microcuenca.

Muestra	Porcentaje muestras positivas/total muestreo (%)	Rango concentración (cg/mL)	Microcuenca	Sitios positivos	Rango concentración (cg/mL)	Promedio cuantificación* (cg/mL)
1	62,5	10-45	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	3- 5	1,2-1,7E+01	1,4
			Cañada C	8, 10-15	1,0-4,5 E+01	1,9E+01
			Cañada D	-	-	-
2	12,5	24,8-26,6	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	6	2,5E+01	2,5E+01
			Cañada C	15	2,7E+01	2,7E+01
			Cañada D	-	-	-
3	12,5	23,4-31,2	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	6	3,1E+01	3,1E+01
			Cañada C	15	2,3E+01	2,3E+01
			Cañada D	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-

*Se consideran sólo los sitios positivos.

Tabla 18: Datos de cuantificación de Norovirus Genogrupo II considerados por muestreo y microcuenca.

Muestra	Porcentaje muestras positivas/total muestreo (%)	Rango concentración (cg/mL)	Microcuenca	Sitios positivos	Rango concentración (cg/mL)	Promedio cuantificación* (cg/mL)
1	94	1,6 E+01-1,2 E+03	Tajamar El Coronel	1,2	1,6-2,1 E+01	1,9 E+01
			Tajamar Caputo	3- 6	2,4 E+01-1,2E+03	3,6 E+02
			Cañada C	8, 10-15	4,4 E+01- 7,1 E+02	3,1 E+02
			Cañada D	9, 16	2,3-2,4 E+01	2,4 E+01
2	50	1,0-4,5 E+01	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	4-7	1,0 - 3,0 E+01	2,5 E+01
			Cañada C	10-12-13-15	1,2 - 4,5 E+01	2,5 E+01
			Cañada D	-	-	-
3	31	1,3-6,3 E+01	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	-	-	-
			Cañada C	10, 12, 13, 15	1,3-6,3 E+01	3,3 E+01
			Cañada D	8	1,9 E+01	1,9 E+01
4	-	-	-	-	-	-

*Se consideran sólo los sitios positivos.

Tabla 19: Datos de cuantificación de Rotavirus considerados por muestreo y microcuenca.

Muestra	Porcentaje muestras positivas/total muestreo (%)	Rango concentración (cg/mL)	Microcuenca	Sitios positivos	Rango concentración (cg/mL)	Promedio cuantificación* (cg/mL)
1	56,3	1,0 E+01-1,0 E+05	Tajamar El Coronel	-	-	-
			Tajamar Caputo	3- 6	1,0 E+01- 7,7 E+03	1,9 E+03
			Cañada C	8, 10, 13-15	2,7 E+01- 1,0 E+05	3,5 E+03
			Cañada D	-	-	-
2	43,8	2,5- 3,3 E+02	Tajamar El Coronel	1	2,4 E+00	2,4 E+00
			Tajamar Caputo	3,6,7	4,0 E+00 - 3,3 E+02	1,7 E+02
			Cañada C	8, 14	3,6 E+01 - 1,1 E+02	7,3 E+01
			Cañada D	16	7,2 E+01	7,2 E+01
3	68,8	4,7 E+01 -4,9 E+05	Tajamar El Coronel	1,2	4,7 E+01 - 1,8 E+02	1,4 E+02
			Tajamar Caputo	3,4,6,7	1,2 E+02 - 5,4 E+03	2,2 E+04
			Cañada C	8,10, 13- 15	6,5 E+01 - 4,9 E+05	9,8 E+04
			Cañada D	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-

*Se consideran sólo los sitios positivos.

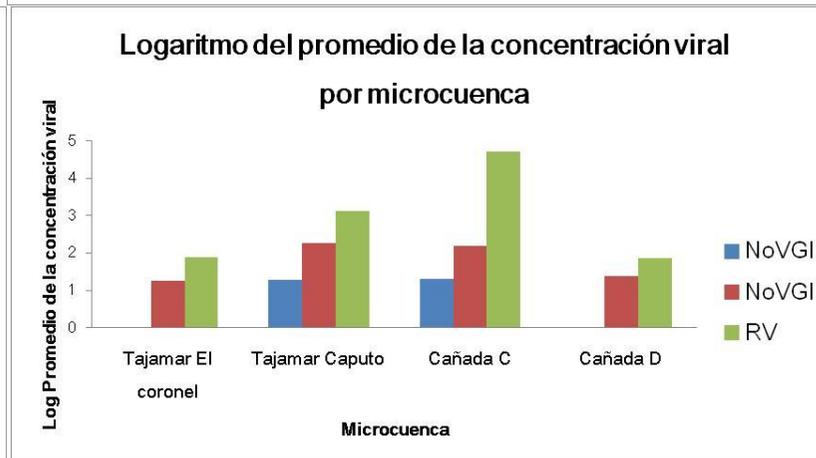
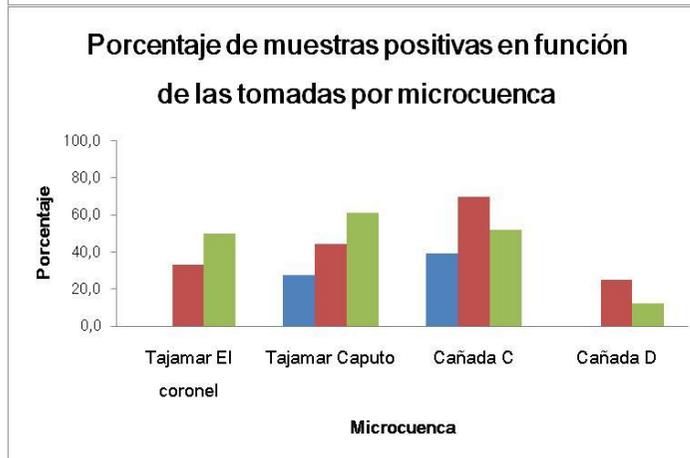
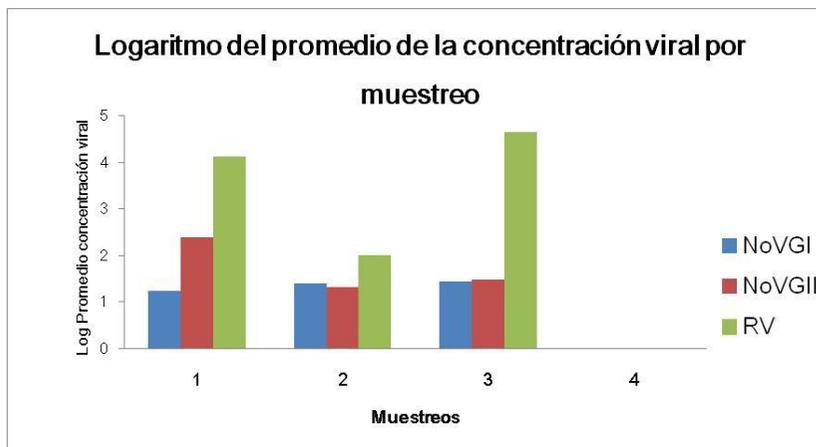
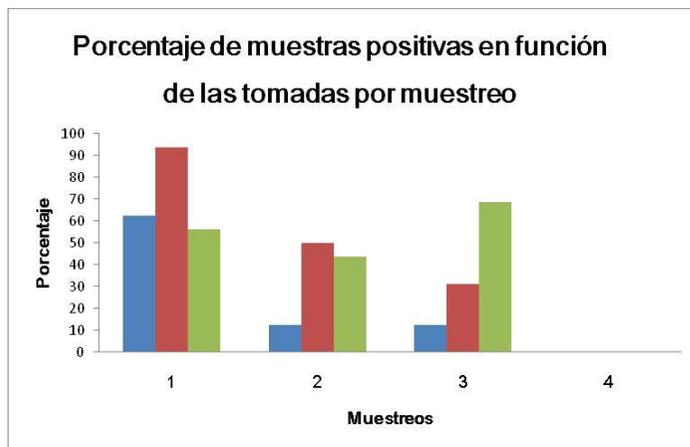


Figura 23: Evolución de la cuantificación viral. Los gráficos representan el porcentaje de muestras positivas y el promedio de la cuantificación viral de NoVGI, NoVGII y RV considerando los datos por microcuenca y por muestreo.

5.2 Incidencia de factores ambientales en la presencia de virus entéricos

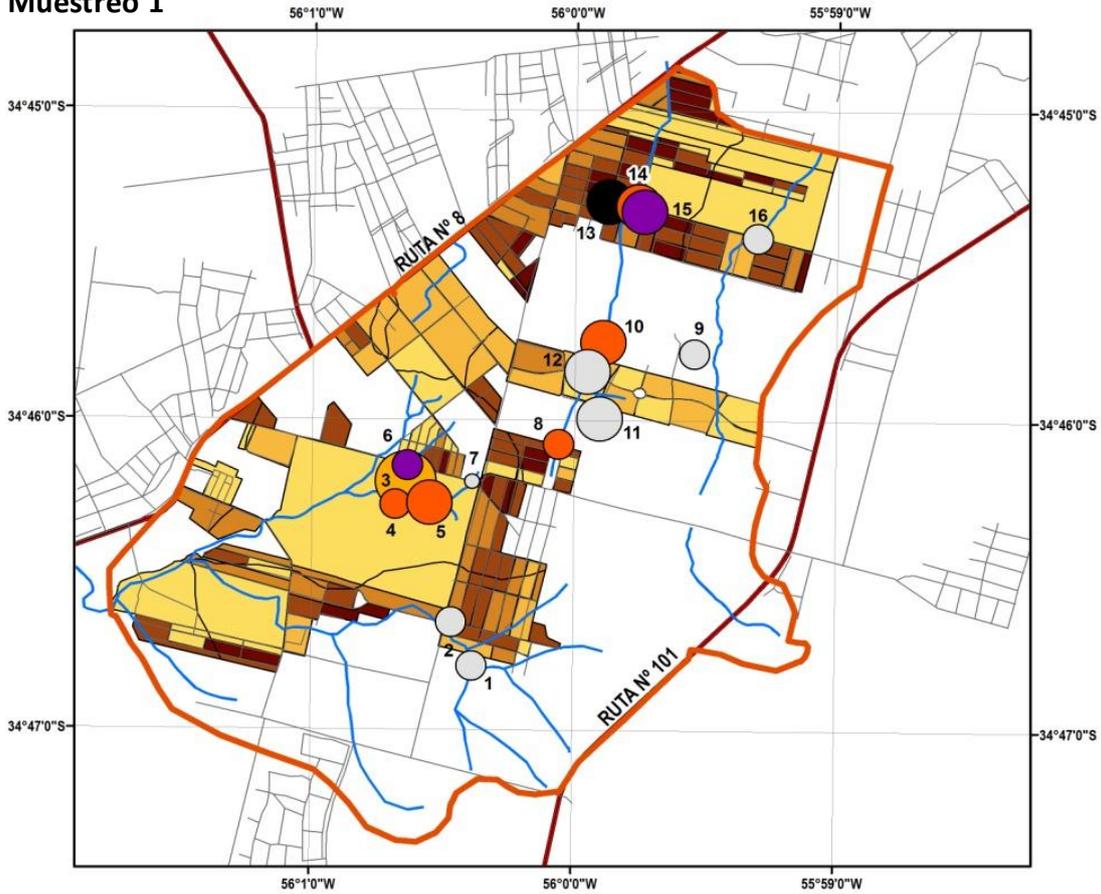
Con el objetivo de estudiar el efecto de factores ambientales en la presencia de Norovirus y Rotavirus en esta sección se analizó la relación de la densidad poblacional, la temperatura, las precipitaciones y los indicadores microbiológicos en la presencia de RV y NoVGII, en adelante NoV. Los datos obtenidos para el GI de NoV no fueron considerados en esta sección por ser poco abundantes.

Para visualizar los resultados en el territorio estudiado y analizar la incidencia de la densidad poblacional en los mismos se realizó un mapa para cada muestreo donde se observa la cuantificación de las copias genómicas de ambos virus en cada sitio de toma de agua, Figura 24. Así mismo, en el mapa de la Figura A1 se observa el relieve del territorio estudiado del cual se infiere el sentido de la corriente de las aguas analizadas. De los mapas de la Figura 24 se desprende que ambos virus poseen una amplia distribución en la totalidad del territorio estudiado. Si se analizan los resultados por sitio de muestreo se puede observar que para el sitio 1 de la microcuenca Tajamar El Coronel hay aportes de virus entéricos ya sea de RV como de NoV, este último se detectó solo en el primer muestreo, mientras que RV se detectó en los muestreos 2 y 3 con el incremento de un orden. Por otro lado, se observa en el mapa que sobre el sitio uno la densidad de población es nula y que la microcuenca asociada a este es grande pero poco poblada, encontrándose los habitantes en el extremo sur de la misma donde en algunas regiones la densidad de población por hectárea alcanza entre las 50 y 75 personas. En esta zona donde la densidad de población es de las más altas de la microcuenca se encuentra el sitio 2, el mismo solo mostró presencia de NoV en el primer muestreo y de RV en el tercer muestreo con una concentración moderada. Como se mencionó en la Tabla 1 este sitio se encuentra sobre una cuneta que es drenada por las aguas servidas de las viviendas. Vale destacar que los niveles de detección de NoV en el primer muestreo son equivalentes en ambos sitios (1 y 2) lo que llama la atención dado que el sitio 1 no se encuentra en una zona poblada.

Por su parte la microcuenca Tajamar Caputo, que presenta los sitios de 3 al 7, es una microcuenca relativamente pequeña que en el sur muestra una zona poco poblada mientras que en el norte y oeste cuenta con una densidad poblacional moderada, llegando en algunos sectores a contar con un volumen de 75-100 personas por hectárea. Como se muestra en los mapas los puntos 3, 4 y 5 se encuentran sobre el Tajamar Caputo, que es la mayor reserva de agua de la zona estudiada, de manera general se observa que mediante la técnica de qPCR el Tajamar cuenta con la presencia de ambos virus en los tres muestreos. Tanto el sitio 3 como el 5 se

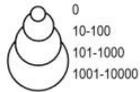
encuentran en las zonas de drenaje de cañadas que provienen de la zona norte y la otra de la zona noroeste, ambas zonas con alta densidad poblacional, mientras que el punto 4 se encuentra en la salida del mismo. La cañada que drena al tajamar en la zona norte ha sido muestreada mediante el sitio 6, mientras que la cañada del noroeste mediante el 7. El punto 3 muestra la presencia de RV en los tres muestreos con un aumento de la carga viral en el tercero mientras que para NoV la detección sólo ocurre en el primer muestreo con el valor mas alto observado de carga viral para este virus en este estudio. Por otro lado, en el sitio 4 se observa la detección de NoV en los muestreos 1 y 2; mientras que los RV se pudieron detectar en el muestreo 1 y 3, con mayor concentración en este último. Para el punto 5 la situación es similar para NoV solo que el muestreo 1 posee la concentración superior a la del muestreo 2, mientras que RV solo fue posible detectarlo en el primer muestreo. Observando el sitio 6 se puede apreciar que la concentración de RV en el mismo se mantuvo elevada durante los tres muestreos mostrando igualmente una disminución en el muestreo 2, así mismo para NoV en este sitio una baja carga viral se observó en los primeros dos muestreos. Por último, el sitio 7 muestra la presencia de NoV solo en el segundo muestreo y la presencia de RV en el segundo y tercer muestreo con niveles de carga viral moderados.

Muestreo 1

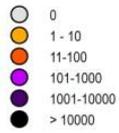


Referencias

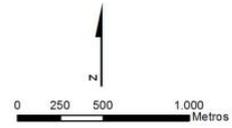
Norovirus GI (cg/ml)



Rotavirus (cg/ml)



Densidad de población (Pers/Ha)

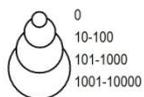


Muestreo 2

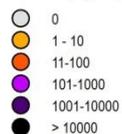


Referencias

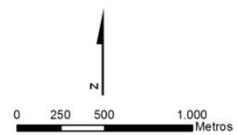
Norovirus GI (cg/ml)



Rotavirus (cg/ml)



Densidad de población (Pers/Ha)



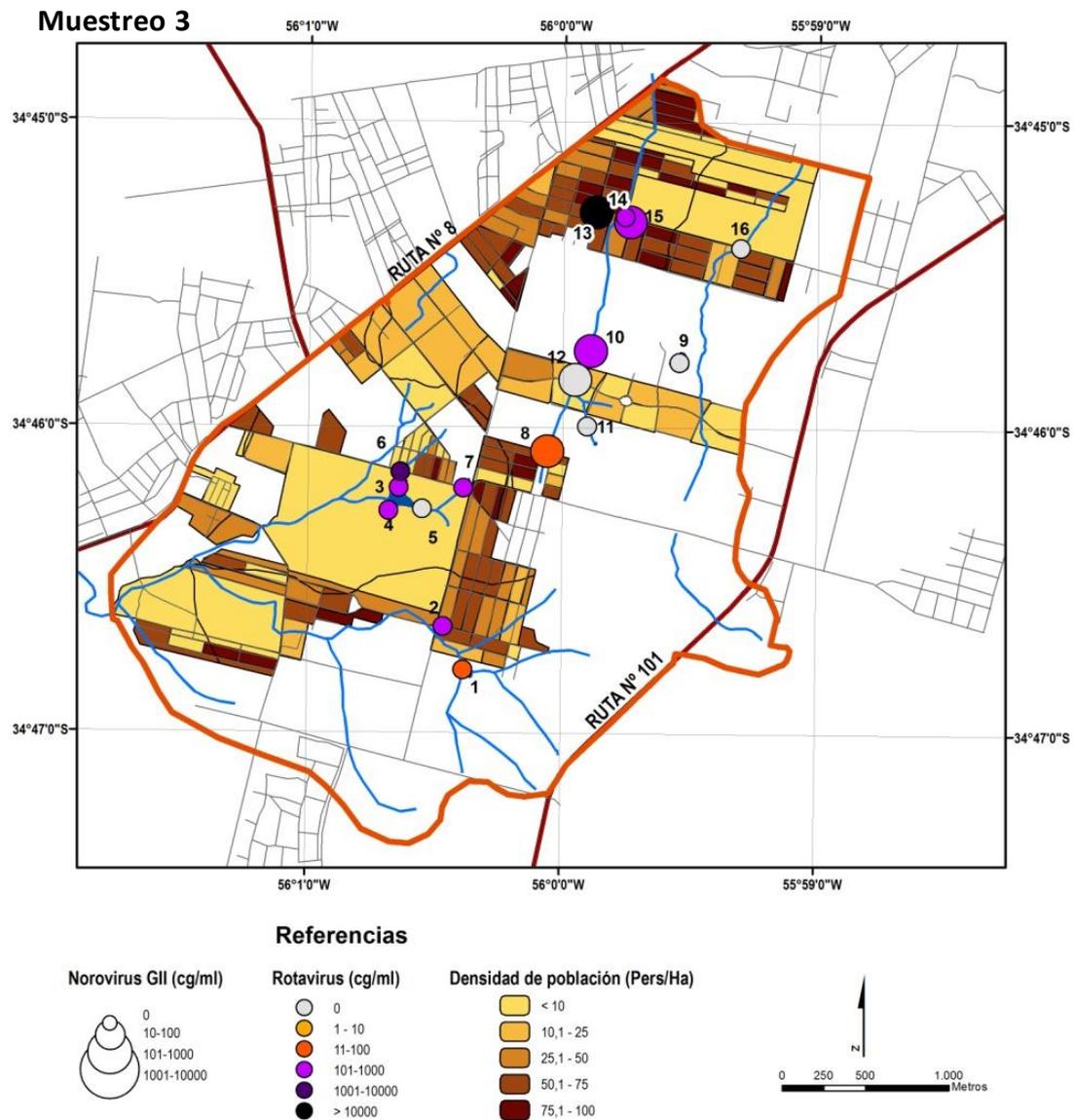


Figura 24: Virus en el territorio. Mapas de la zona de estudio que incluyen los datos de cuantificación viral por sitio de muestreo y de la densidad poblacional por microcuenca.

Por otro lado, la microcuenca Cañada C está constituida por los pozos de la ladrillera y la cañada del mismo nombre la cual recorre tres zonas pobladas con moderada y alta densidad poblacional interrumpidas por zonas despobladas. La cañada nace en una zona de alta densidad poblacional y el primer sitio muestreado (sitio 8) se encuentra aguas abajo inmediatamente después de donde termina dicha población, en este sitio se detectó NoV en el primer y tercer muestreo con niveles bajos, por su parte los RV se detectaron de forma levemente moderada en los tres muestreos. El sitio 12 se encuentra cañada abajo del sitio 8, en una zona con densidad poblacional que alcanza las 50 personas por hectárea. Mostró una mayor cuantificación de NoV en el muestreo 1, si se compara con los muestreos 2 y 3, donde la cuantificaciones fueron mas bajas.

Los RV no fueron detectados en el sitio 12. Continuando cañada abajo e inmerso en una zona despoblada se encuentra el sitio 10, el cual resultó positivo para NoV en cantidades decrecientes y para RV en el muestreo 1 y 3 con concentración incremental. En el extremo norte de la cuenca se encuentran los sitios 13, 14 y 15 inmersos en una zona de alta densidad poblacional que alcanzan en algunas cuadrículas las 100 personas por hectárea, mientras que el sitio 14 se encuentra sobre la cañada C, los sitios 13 y 15 se encuentran en distintas cunetas que drenan sus aguas en la misma. El sitio 14 mostró la presencia de NoV en el primer muestreo y la de RV en los tres muestreos de manera incremental, ambos virus en cantidades moderadas. Los sitios 13 y 15 mostraron la presencia de NoV en los tres muestreos en concentraciones moderadas que disminuyeron entre el muestreo 1 y 2 y la presencia de RV en los muestreos 1 y 3 con elevada carga viral principalmente en el sitio 13. El último sitio de esta microcuenca es el 11 que se encuentra en un pozo lejano a las zonas pobladas, el mismo fue positivo para NoV en el muestreo 1, con concentración moderada, mientras que RV fue negativo en todos los muestreos.

Por último, en la Figura 24 se observa que la microcuenca Cañada D cuenta con dos sitios (9 y 16). El sitio 9 se encuentra en un pozo donde no hay zonas pobladas a su alrededor, los análisis de qPCR revelaron que este sitio fue positivo para NoV en el primer muestreo y negativo para RV en todos los muestreos. Por su parte, el sitio 16 que se encuentra en una zona poblada de hasta 75 personas por hectáreas fue positivo para NoV en el muestreo 1 y para RV en el muestreo 2 con concentraciones bajas.

En general se desprende de los mapas y Tablas 18 y 19 que la detección y carga viral de NoV disminuyó a medida que transcurren los muestreos, mientras que para RV disminuyó en el segundo muestreo y aumentó en el tercero. Con el fin de evidenciar estos hechos que se observan en los mapas y tablas de manera global se realizaron gráficos de cajas que se presentan en el Figura 25. Los mismos muestran que para Norovirus hay una disminución en la concentración detectada entre el muestreo uno - dos y que se mantiene en el muestreo 3, ya sea en la mediana como en el valor máximo de copias genómicas. Por otro lado, para Rotavirus no se observa una tendencia tan clara, entre el primer y segundo muestreo hay una notoria disminución de la mediana, mientras que hay un aumento en la mediana en el tercer muestreo y en el máximo valor de copias genómicas detectadas. Para corroborar lo observado en la gráfica se llevaron a cabo test estadísticos.

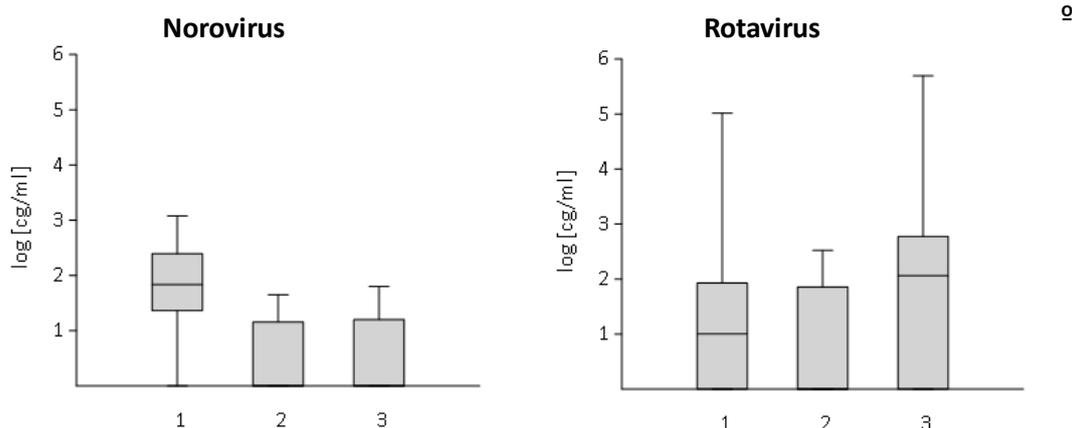


Figura 25: Gráficas mostrando los datos de cuantificación de copias genómicas de virus por muestreo. Gráfico de caja realizado con el programa Past donde se muestran el log de las copias genómicas por mililitro para cada muestreo. La barra indica los valores alcanzados en cada caso y la raya la mediana.

Para Norovirus, en primer lugar se llevó a cabo el test de Levene's para determinar la homocedasticidad de los datos de cuantificación que reveló que los datos son homogéneos, $p=0,9711$, por lo que se aplicó el test paramétrico de ANOVA que mostró que hay diferencia significativa entre los grupos, $p=9,285e^{-7}$. Por otro lado, el test de Tukey's mostró que las diferencias significativas son entre los muestreos 1 con 2 y 1 con 3 como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20: Resultados del test de Tukey's para NoV

Muestreo	1	2	3
1		0,0001559	0,0001307
2	6,999		0,7302
3	8,071	1,072	

En la tabla se muestran los resultados obtenidos con los datos de log cg/mL agrupados por muestreo. En rojo se encuentran los valores con diferencias significativa ($p < 0.05$).

Por su parte, el análisis estadístico para Rotavirus mostró mediante el test de Levene's que los valores son homogéneos ($p=0,3775$), por esta razón se realizó el test paramétrico de ANOVA que mostró que no hay diferencias significativas entre las categorías con $p=0,08547$.

Para determinar si los factores ambientales, Temperatura y Precipitaciones, marcaron alguna tendencia en las diferencias observadas entre los muestreos se gráfico la cuantificación de copias genómicas virales versus el promedio de precipitaciones y temperatura ocurridos en los dos días previos a la toma de muestra, Tabla 21.

Tabla 21. Condiciones meteorológicas en cada muestreo.

Muestreo	1	2	3
Precipitaciones (mL)	0	15,5	7,8
Temperatura (°C)	15,3	20,1	19,2

Promedio de temperatura y precipitaciones ocurridos en los dos días anteriores a la toma de muestra.

La Figura 26 muestra la tendencia de disminución en la cuantificación viral de Norovirus a medida que aumentan las precipitaciones, lo que es acompañado con una recta de pendiente negativa. Por otro lado, para Rotavirus se observa también una recta con pendiente negativa, al mismo tiempo que se muestra una dispersión mayor en los datos de cuantificación obtenidos sobre todo en el tercer muestreo (7,8mL).

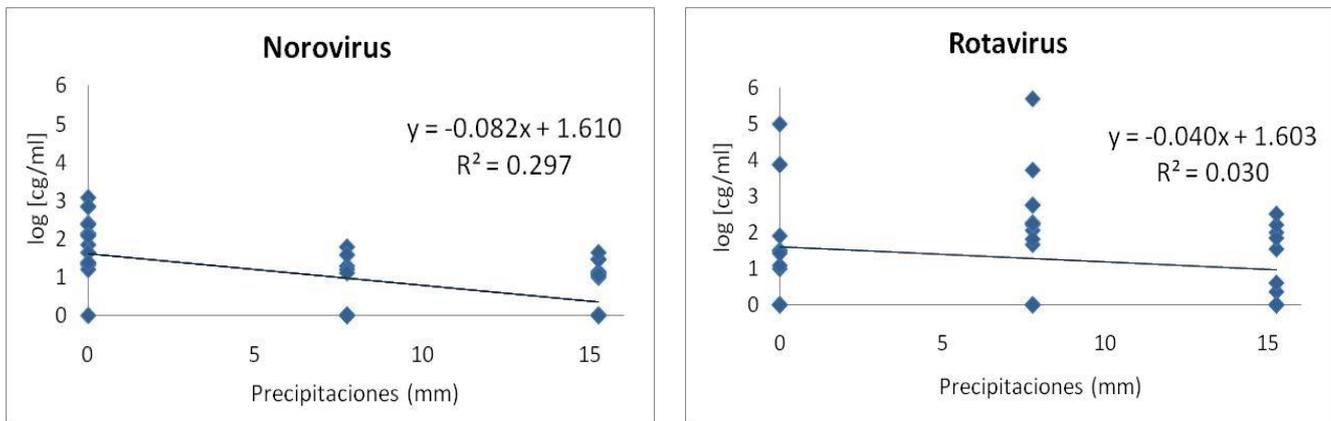


Figura 26: Cuantificación viral por muestreo en función de las precipitaciones. Gráficas del logaritmo de copias genómicas virales en función de la precipitación promedio en los dos días previos al día de muestreo para Norovirus y Rotavirus.

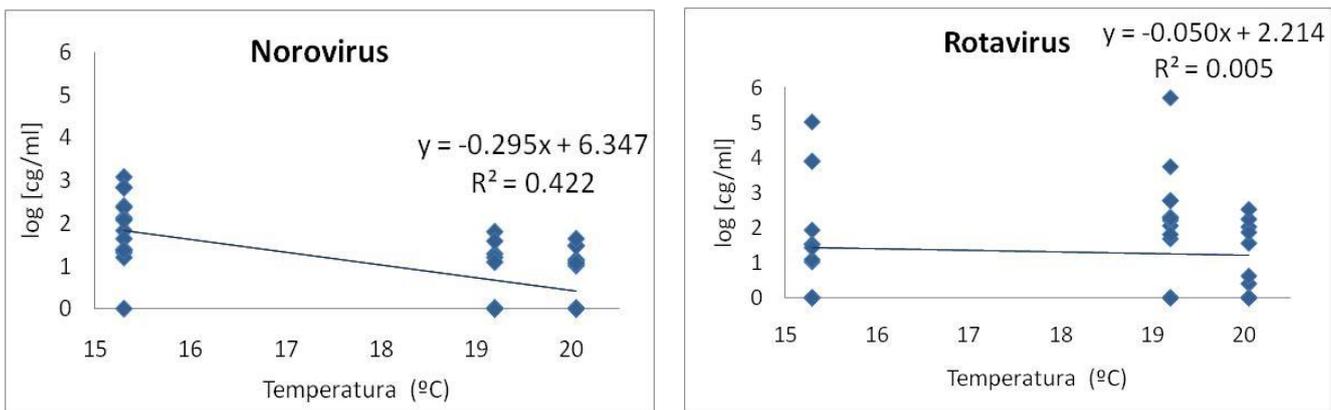


Figura 27: Cuantificación viral por muestreo en función de temperatura. Gráficas del logaritmo de copias genómicas virales en función de la temperatura promedio en los dos días previos al día de muestreo para Norovirus y Rotavirus.

Por su parte en la Figura 27, se observa la tendencia de la cuantificación viral con respecto a la temperatura. En la gráfica para Norovirus se observa una tendencia

marcada a la disminución de copias genómicas virales a medida que aumenta la temperatura acompañada de una recta con pendiente negativa. Mientras que para Rotavirus, no se observa una tendencia clara y la recta, si bien posee una pendiente negativa, la misma es muy leve.

Por otro lado, se realizaron análisis estadísticos para comparar los datos de cuantificación viral obtenidos en esta tesis con los de cuantificación de indicadores

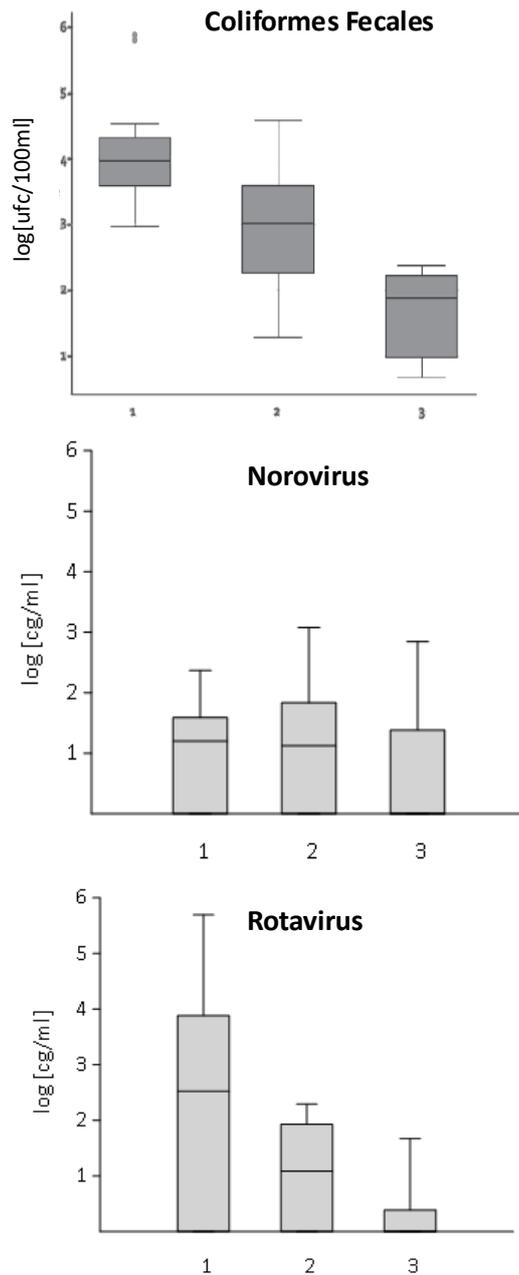


Figura 28: Gráficas mostrando los datos de cuantificación de copias genómicas por virus por categoría. Datos bacteriológicos: imagen extraída y modificada de CEUTA, 2013 [98].

bacterianos presentes en estas aguas y las categorías del grado de contaminación para cada sitio previamente definidas, presentadas en esta tesis en la sección 4.1, Tabla 5 y Figura 13. Para esto los datos de cuantificación fueron agrupados en las tres categorías pre definidas. En la Figura 28, se observan los gráficos de caja para los datos bacteriológicos presentados en el libro “Diagnóstico socioambiental orientado al estudio de la parasitosis intestinales y zoonosis” [98] y para los datos de cuantificación de copias genómicas de Norovirus Genogrupo II y Rotavirus de esta tesis. En la Figura 28 se muestra el claro descenso en la concentración de Coliformes Fecales (CF) - indicador microbiológico de contaminación fecal - en total concordancia con las categorías de nivel de contaminación fecal pre establecidas. Mientras que en la gráfica de Norovirus se observa una distribución similar en las tres categorías (valores de medianas, mínimos y máximos similares), sin mostrar una tendencia clara. Por su parte el gráfico para RV muestra una tendencia clara, la mediana y los valores máximos disminuyen paulatinamente de la categoría 1 a la 3.

A fin de corroborar si las tendencias observadas son estadísticamente significativas se realizaron análisis estadísticos. En primer lugar para el conjunto de datos de Norovirus el test de Levene’s reveló que los datos son homogéneos ($p=0,6904$) y el análisis de ANOVA mostró que no hay diferencia significativa entre los categorías, $p=0,4476$. En segundo lugar, el análisis estadístico para los datos de Rotavirus mostró mediante el test de Levene’s que los valores no son homogéneos ($p=0,0002281$) por esta razón se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que mostró que hay diferencias significativas entre las categorías con $p=0,004841$. Así mismo, para establecer la relación entre las tres categorías se realizó el test de Mann-Whitney que reveló que hay diferencias significativas entre cada una de las categorías (Tabla 22).

Tabla 22. Resultados del test de Mann-Whitney para RV.

Categorías	1	2	3
1		0,01955	0,01184
2	0,01955		0,02854
3	0,01184	0,02854	

En la tabla se muestran los resultados de comparación entre categorías. En rojo se muestran los valores con diferencia significativa (p menor a 0,05).

Dado que tanto para los Rotavirus como para los Coliformes Fecales se observa la misma tendencia con respecto al agrupamiento de las cuantificaciones por categoría, se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson para establecer la relación entre los datos de cuantificación de estos microorganismos. El mismo indicó que la correlación entre ambas variables es positiva (Coeficiente de Pearson=0,3982) con apoyo estadísticamente significativo ($p=0,0051$). Así mismo, se realizó el gráfico de Correlación Binaria entre los dos parámetros, Figura 29, en el cual se observa que hay

una clara correlación positiva en la distribución de ambas variables donde los valores nulos de RV distorsionan esta correlación, lo cual puede explicar el valor de correlación obtenido, que si bien es positivo es modesto. En dicha Figura, se aprecia el gráfico de predicción lineal con los intervalos de confianza. Se observa la distribución lineal de los datos y el intervalo de confianza más acotado en el centro, donde se encuentran la mayoría de los resultados nulos para RV, con respecto a los extremos de la predicción lineal donde hay menos resultado nulos para el virus.

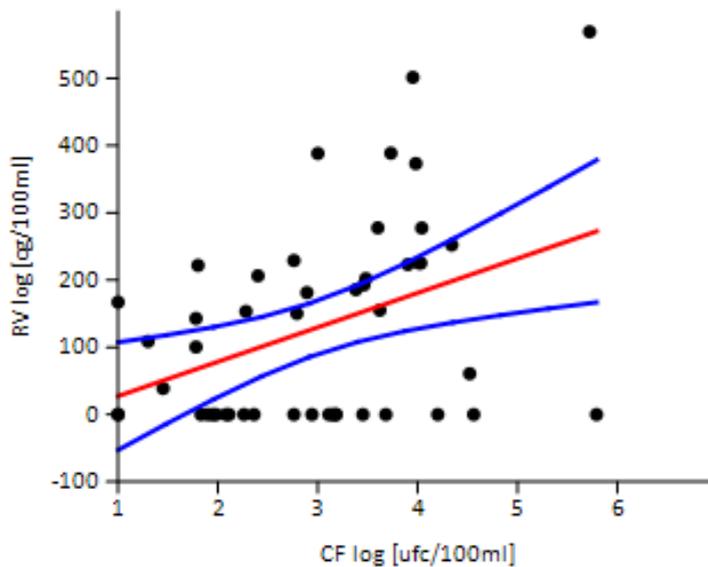


Figura 29: Correlación Binaria y predicción lineal con intervalos de confianza para RV versus CF. Gráfica de log cg/100ml de Rotavirus versus Log ufc/100ml de los Coliformes Fecales. En rojo se muestra la línea de tendencia para esta correlación. Entre las líneas azules se encuentra el área con probabilidad mayor o igual al 95% de que un sitio muestre los valores de la intersección de Rotavirus log [cg/100ml] vs Log [ufc/100ml] de los Coliformes Fecales.

6. Discusión

La ciudad de Barros Blancos, con una población de 31.650 habitantes, constituye un espacio fragmentado, semiurbano y semirural, donde conviven pequeñas quintas, con cooperativas de viviendas, villas y asentamientos precarios en los que muchos pobladores crían animales de granja, además de poseer una estrecha convivencia con animales domésticos. Se ha puesto en evidencia que los pobladores de esta ciudad perciben como problemas la carencia de lugares de esparcimiento y la contaminación ambiental que, en algunos casos, deriva del crecimiento poblacional en territorios no preparados para ello y de la producción industrial. Por otro lado, la falta de saneamiento que genera un manejo inadecuado de las excretas, la percepción en la población local de la prevalencia de las enfermedades infecciosas, junto a la observación del alto índice de parasitosis en niños que habitan la zona, ha llevado a organizaciones sociales y a la Universidad a plantear preocupación acerca de los factores subyacentes que están contribuyendo a las condiciones sanitario-ambientales que presenta Barros Blancos [98], [118]–[120], [138].

Así mismo, estudios previos han demostrado la transmisión de enfermedades gastrointestinales a través de la utilización de agua de mala calidad, incluyendo la ingesta de agua durante el baño. También evidencian que la fuente de contaminación puede provenir de aguas servidas o por individuos que se bañan en las aguas recreacionales estudiadas [139], [140]. El hecho de que el 90% de las muestras analizadas en esta tesis fueron positivas para al menos un virus causante de gastroenteritis indica que estos virus circulaban con relativamente alta frecuencia en la población de Barros Blancos. Así mismo, el alto porcentaje de positividad para los genogrupos de NoV estudiados que son estrictamente humanos, es reflejo de que la actividad humana está contaminando las aguas de esta localidad. Esto nos permite sugerir que el uso de estas aguas puede ser una fuente de patógenos para la población.

Por su parte, el hecho de que se haya amplificado en un 100 % de las muestras el control interno (fago PP7) indica que el proceso se llevó a cabo correctamente para todas las muestras. También se detectó que el 90% de las muestras contenían al menos un virus: 67% Rotavirus, 51% Norovirus y 9% Picobirnavirus. Otros estudios en aguas recreacionales han mostrado la presencia de estos virus en diferentes proporciones, a saber, para Rotavirus con porcentajes de positividad menores a los presentados en esta tesis como un 19% en río Xanaes en Argentina [95] y un 22% en Santa Catalina en Brasil [96]. Mientras que otros estudios muestran porcentajes equivalentes con 67% de las muestras positivas en Santa Catarina y Río de Janeiro en

Brasil [97], [141] y en mayor medida en Córdoba Argentina con el 100% en el río Suquia [95]. Para Norovirus, estudios en la región han indicado una menor prevalencia en Manaus y Río de Janeiro con 5,8% y 33%, respectivamente [60], [61]; y en Buenos Aires y Córdoba con un 45% y 50% de las muestras de río analizadas [63], [50]. Fuera de la región existen numerosos ejemplos en los que la detección de este virus fue mayor que la apreciada en este trabajo, como en México con un 70% de positividad o en España con un 83% [58], [141]. Para PBV, un estudio de aguas recreacionales en Inglaterra ha demostrado un 21% de muestras positivas, a diferencia del realizado en este trabajo, utilizó como método de detección PCR en tiempo real [114]. Estos resultados, tomados en su conjunto, indican que la metodología de concentración utilizada en esta tesis a pesar de ser diseñada para aguas residuales [123], [124], puede ser aplicada para aguas recreacionales, al menos en casos como el de esta localidad que posee aguas altamente impactadas por aguas residuales.

Además, la caracterización molecular de los virus analizados mostró que para Norovirus no se pudo amplificar ningún fragmento de la región D estudiada, a pesar que sí pudo ser detectado y amplificado por PCR cuantitativa el genoma viral. Es de destacar que las regiones genómicas que son blancos de amplificación de ambas técnicas son diferentes, como se muestran en los apartados 4.2.5.1.1 y 4.2.6.1, además de que la técnica de PCR en tiempo real posee una sensibilidad ampliamente superior que la PCR a tiempo final [21].

Así mismo, la caracterización molecular de Rotavirus se llevó a cabo de forma satisfactoria y fue posible identificar genotipos circulantes en todas las microcuencas del territorio con alternancia de los distintos P-tipos identificados. En la Tabla 15 se puede observar que en la mayoría de los sitios que se pudo identificar los P tipos en más de un muestreo hubo alternancia de los mismos. Además, en algunos sitios se pudo determinar ambos genotipos observándose las siguientes combinaciones: G10P[9], G10P[5], G6P[5]. Es de destacar que en publicaciones anteriores se ha mostrado que la incidencia de los genotipos de RV dentro de la misma región en el mismo país puede variar dentro del mismo año y que múltiples G y P-tipos pueden cocircular dentro de la misma área [75].

Los genotipos detectados en este trabajo no son los de circulación más abundante en la población humana. A nivel mundial, de estos genotipos, sólo el P[9] ha circulado en humanos en América Latina con una frecuencia de 1,1% y en el norte de Uruguay con una de 1,5% [75], [81]. En nuestro país, en muestras ambientales se determinó previamente la presencia de los genotipos G10, P[9] y P[11] [87]. Este es el primer trabajo en el que se detecta, a nivel ambiental, la circulación en Uruguay de los

genotipos P[5] y G6, los cuales habían sido previamente detectados por nuestro grupo a partir de muestras de diarrea provenientes del rodeo uruguayo [82].

Por su parte, el genotipo P[5] es el detectado más frecuentemente en bovinos a nivel mundial con un 25,9% [76]. Como muestra la Tabla 15 el mismo está distribuido en todas las microcuencas, incluso en las zonas con mayor densidad poblacional, y en todos los muestreos, lo que podría indicar que toda la zona estudiada posee una fuerte contaminación de origen bovino. El genotipo P[5] en cepas bovinas se asocia comúnmente a G6 y en menor medida a G10 [142]. Si bien la asociación de este genotipo a bovinos es fuerte, se ha reportado en la literatura una cepa de origen humano G1P[5] en los Estados Unidos [143]. Esto indica que los saltos interespecie de este genotipo no son comunes pero son posibles por lo que en Barros Blancos puede haber tenido lugar este tipo de salto y por esto la distribución es tan amplia, para corroborar esta hipótesis sería necesario contar con muestras humanas para su análisis. Sumado a ello el hecho de que una muestra Argentina conforme un subgrupo (Figura 17) con alto apoyo estadístico con las muestras uruguayas indica que los genotipos P[5] que se encuentran circulando en la región son similares. Esta secuencia aislada de un animal de rodeo de La Pampa en 1999, ha sido clasificada dentro del linaje que se compone por secuencias procedentes de bovino de entre los años 1997 a 2007 circulantes en distintas provincias argentinas en ganado de carne [142]. Esto indica que este genotipo ha circulado en la región por un periodo de tiempo prolongado.

El genotipo P[9] es detectado frecuentemente en gatos, aun así ha sido detectado en humanos mayoritariamente en conjunto con G1 y G3. En Brasil en 1997 fue aislado este genotipo en niños hospitalizados por un brote de diarrea causado por una cepa P[9]G10 [75], [144]. En la Tabla 15 se observa que este genotipo se identificó en muestras de aguas donde se detectó también el genotipo G10. El árbol filogenético de la Figura 17 muestra que las secuencias P[9] de este trabajo agrupan con alto apoyo estadístico con una secuencia proveniente de aguas residuales de Ecilda Paullier del 2012. Así mismo este genotipo ha circulado en la población infantil al norte del Río Negro en los años 2011-2012 con una prevalencia de 1,5%, detectándose un genotipo emergente G12P[9] [81]. Se puede inferir que el genotipo P9 circula habitualmente en Uruguay, o al menos entre los años 2011-2012, acentuando el riesgo para los niños que utilizan estas aguas para recreación.

El genotipo P[11] es el segundo genotipo encontrado a nivel mundial en vacunos con un 21,5% de prevalencia [76], así mismo este genotipo se ha detectado con menor frecuencia en caballos, cerdos y corderos [75]. Por otro lado, en humanos también ha sido detectado en India asociado a G10 donde fue responsable de diarreas en

neonatos y de casos zoonóticos [75], ambos genotipos detectados en este trabajo en la misma microcuenca en distintos muestreos pero no en la misma muestra de agua. La secuencia perteneciente al genotipo P[11] presentada en esta tesis conforma un mismo clado filogenético (Figura 17) con muestras uruguayas detectadas en aguas residuales de Canelones en 2011 y 2012, por lo que este genotipo estuvo circulando en la población de Canelones en este período. Así mismo, se observa que las mismas agrupan con una muestra aislada de bovinos de rodeo en Córdoba, Argentina, durante 2004 [142]. Lo que indica que este genotipo circula en la región y que las secuencias detectadas en estas aguas podrían tener un origen bovino dado que en el área de estudio se encuentran estos animales.

El G6 es el G-tipo más común en Rotavirus bovino en todo el mundo siendo responsable del 56,7% del total de los casos de RV en estos animales [76]. También ha sido detectado con menor frecuencia en ovejas, cabras y humanos en todo el mundo [75]. La secuencia obtenida de este genotipo mostró un porcentaje de identidad elevado con una cepa argentina circulante en ganado de rodeo. Lo que indica que el mismo se encuentra circulando en la región y que la contaminación de este sitio pudo provenir de materia fecal proveniente de vacunos.

El G10 es el segundo G-tipo vacuno detectado en un 20,6% de las muestras a nivel mundial [76] encontrado con menor frecuencia en caballos, cerdos y corderos. Este genotipo ha sido aislado de muestras humanas en Gran Bretaña e India [75]. Reportes en este último país muestran la presencia del genotipo G10P[11] en infantes y niños jóvenes con diarrea. Así mismo, en la región se ha aislado en humanos en Paraguay con P[8] y en Brasil con P[9] [75]. En esa tesis, este genotipo se ha hallado en numerosas muestras, tanto en combinación con P[5] como con P[9]. La Figura 18 muestra que las secuencias presentadas conforman un grupo con apoyo estadístico moderado con una secuencia de una muestra de agua residual extraída en 2012 en la ciudad de Canelones, lo que indica que este genotipo circulaba en el departamento de Canelones entre 2011 y 2012. En este clado se encuentran muestras bovinas y humanas de Argentina y Brasil, que circularon entre 2001 y 2004, lo que indica que este genotipo está circulando en la región al menos desde el 2001. El hecho de que se haya aislado tanto en humanos como en vacunos indica que las cepas de RV que circulaban en el ambiente en Barros Blancos podrían tener como origen cualquiera de los dos hospederos.

A su vez, la detección de Picobirnavirus en 5 muestras ambientales refleja que el mismo está circulando dentro de la población de Barros Blancos. Es de destacar que se detectó en mayor número muestras PBVGII que PBVGI lo que resulta sorprendente ya que el genogrupo I es de circulación más común [102] aunque en nuestro país ya se

había observado en aguas residuales mayor proporción de GII [52]. La relación filogenética (Figura 20) muestra que la secuencia del genogrupo I presentada en este trabajo agrupa con secuencias de primates y aguas residuales, por lo que podría inferirse que probablemente la cepa proceda de PBV humano, sobre todo si se tiene en cuenta que la muestra fue tomada en una zona de alta densidad poblacional. Así mismo, la secuencia de GI obtenida no presenta identidad con secuencias del mismo genogrupo que circularon en animales de Uruguay en 2009 y 2010 ni con las circulantes en humanos entre 2000 y 2001.

Las secuencias del genogrupo II de Picobirnavirus presentadas en esta tesis muestran divergencias entre sí, a pesar de haber sido tomadas en la misma microcuenca (Tajamar Caputo) y en el mismo muestreo. Dada la escasa información que hay con respecto a las polimerasas de este genogrupo de PBV no es posible concluir si estas diferencias poseen alguna relevancia en la actividad enzimática y viral.

En cuanto a la carga viral de manera general se puede apreciar que los Rotavirus fueron detectados en un 49% de las muestras y Norovirus en un 51% de las mismas. Con respecto a ello, trabajos uruguayos han mostrado porcentajes de positividad mayores para NoV en aguas residuales [88], [116] y a nivel mundial en aguas recreacionales [59], [145]. Estos resultados no coinciden con los datos obtenidos mediante la técnica de PCR a tiempo final, publicados previamente, en el que ambos virus fueron detectados en 33% de las muestras [98], por lo que la PCR en tiempo real ha mostrado una sensibilidad mayor.

Los datos muestran la máxima concentración viral en las muestras para GI debajo del orden de lo detectado previamente en aguas residuales de Montevideo y GII en el mismo orden [79], mientras que para ambos genogrupos el orden es menor que lo detectado en aguas residuales del interior del país [52]. Por otro lado, para RV la máxima concentración alcanzada es un orden superior del máximo detectado en muestras de plantas de tratamientos aguas residuales del interior del país [52]. El sitio 13, donde se obtuvo este valor máximo, es una cuneta que se encuentra en una zona densamente poblada, por lo que los niveles de contaminación fecal observados pueden provenir de aportes de aguas servidas de la zona.

En lo que respecta a Norovirus, tanto las detecciones como los promedios de cuantificaciones del GI fueron menores que los del GII (Figura 23), como ya había sido observado en otras publicaciones en aguas residuales de Uruguay [40], [45], [52]. La mayor presencia del Genogrupo II en el ambiente puede ser explicada por dos hechos, en primer lugar los NoVGII son mas frecuentes en brotes a nivel mundial que NoVGI (89% vs 11% de los brotes reportados) y en segundo lugar los NoVGII son liberados en mayores cantidades que NoVGI por individuos infectados [21]. Durante el primer

muestreo el porcentaje de NoVGI detectado fue superior al de NoVGII. Se ha demostrado previamente que existe diferencia entre los genogrupos en cuanto a la resistencia a la desinfección [24], por lo cual esta reducción de NoVGI podría ser explicada por algún factor ambiental como la temperatura o la radiación solar que impactaría en mayor medida en este genogrupo.

Así mismo, es posible integrar y analizar los datos obtenidos por microcuenca. En primer lugar se analizará la microcuenca Tajamar El Coronel la cual está constituida por una zona poco poblada que cuenta con dos sitios de toma de muestra. En esta microcuenca se detectó Norovirus en ambos sitios (Tabla 18), lo que implica que estos están recibiendo aportes de contaminación de origen humano, aunque en niveles bajos comparados con otras microcuencas. Con respecto a los niveles, algo similar fue observado para Rotavirus donde la mitad de las muestras de esta microcuenca fueron positivas para el mismo (Figura 23). Además, la caracterización molecular de RV reveló que el origen de contaminación también podría ser bovino. Vale mencionar que la contaminación de esta microcuenca puede estar influenciada por los mismos bañistas. Desde el punto de vista del origen de contaminación los resultados observados para estos sitios son acordes con los explicados a partir del cociente Coliformes Fecales/Enterococos Intestinales (CF/EI) para cada muestra que establece el origen humano o animal de la contaminación fecal [98].

La microcuenca Tajamar Caputo mostró la presencia de los tres virus estudiados, con el promedio de concentraciones más alto para NoVGII con respecto a las otras microcuencas y el mayor porcentaje de detección de RV (Figura 23). Se esperaba que hubiera una correlación en las concentraciones virales entre las muestras de las cunetas que drenan el tajamar y las muestras tomadas al ingreso del propio tajamar, dicha correlación no se observó, como muestran los mapas de la Figura 24. Esto puede deberse a que la corriente que impulsa el agua de la cuneta al tajamar es diferente a la velocidad de toma de las muestras, o a que existen otros dos efectos distorsivos como el aporte de otras aguas servidas al sitio en el tajamar y el efecto dilución dado que el tajamar posee un volumen de agua grande. Los genotipos de RV detectados en esta microcuenca sugieren que la contaminación fecal que ingresa al tajamar a través del sitio 5 está relacionada con la cuneta B. Además, las diferencias en los niveles de detección viral entre los tres sitios del tajamar son notorias, lo que indica que el agua en el mismo no está contaminada de manera homogénea. Esto se refleja tanto en los valores de cuantificación viral como en los análisis filogenéticos de RV (Figura 17) y PBV (Figura 21). Una posible explicación a estos resultados, puede estar dada por un flujo de corrientes más importante entre el sitio 3 y 4 que entre el sitio 3 y 5. Otro aspecto a notar es que basados en los valores de CF, se atribuye a este tajamar una capacidad depuradora, dado que el valor de los mismos en el sitio 4

siempre es menor que en los sitios de entrada [98]. Sin embargo, esta capacidad depuradora no se observa tan claramente para los virus estudiados que muestran situaciones dispares. Por otro lado, se observa concordancia en lo referente al probable origen de la contaminación fecal de cada muestra estimada con la relación CF/EI [98] con los resultados obtenidos para los virus estudiados en los casos que corresponde.

La tercer microcuenca, Cañada C, también mostró la presencia de los tres virus estudiados. Los datos de carga viral para NoV revelan el mayor porcentaje de muestras positivas de todas las microcuencas y para los RV el mayor promedio de carga viral comparado con las otras microcuencas (Figura 23). Al igual que en la microcuenca anterior no parece haber una relación entre las copias genómicas presentes y la densidad poblacional o la posición de cada sitio cañada abajo. En el sitio 8 probablemente haya algún disturbio a nivel local muy importante que no se transmite a través de la cañada hasta llegar al sitio 12. Además este mismo sitio mostró un aumento en la concentración de partículas virales de NoV entre el segundo y tercer muestreo. En la zona más poblada de la microcuenca los niveles de detección de RV fueron realmente extraordinarios (sitios 13, 14 y 15), mientras que los de NoV fueron moderados y no decayeron entre el segundo y tercer muestreo como sucedió en la mayoría de los sitios. A su vez, la genotipificación de RV mostró en estos tres sitios un presunto origen de contaminación bovina. Otro sitio destacado en esta microcuenca es el 11, ya que no recibe aportes de aguas servidas de manera superficial y mostró concentraciones de NoV importantes, se puede inferir que la contaminación fue generada por los bañistas ya que los niños lo utilizan para baño cuando regresan de la escuela. El origen de la contaminación fecal deducida según la relación CF/EI [98] en las muestras de esta microcuenca no concuerda con lo relevado para los virus en alguno de los sitios. Mientras que las aguas procedentes de los 8, 11, 13, 14 y 15, poseen contaminación de origen animal según los CF/EI, los datos virales muestran que la mayoría de estas fueron positivas para NoV que es exclusivamente humano y/o se amplificó secuencias de RV con elevada identidad con secuencias de origen humano.

Por último, la microcuenca Cañada D es la que presentó el porcentaje de positividad más bajo para RV y NoV (Figura 23). El sitio 9 mostró altas concentraciones de partículas virales de Norovirus, el mismo es un pozo sin ninguna contaminación de agua servida de manera superficial. Por lo que se puede inferir que los aportes de materia fecal podrían estar causados por los bañistas, dado que este sitio es una cantera que se utiliza todo el año, tanto por niños como por adultos, o que el mismo pueda estar siendo contaminado por aguas subterráneas portadoras de patógenos. De igual manera que en otros casos en el sitio 16 se logró identificar RV en el último

muestreo con un porcentaje elevado de identidad con cepas de origen bovino (Tabla 15). Este sitio se encuentra en una zona densamente poblada y es visitado frecuentemente por niños para bañarse. Además, este origen resulta contradictorio con el origen humano de la contaminación deducida según la relación CF/EI [98].

Tomando en cuenta que cepas de Rotavirus características de animales han sido recuperadas de humanos [75], que RV es un virus donde es frecuente el reordenamiento entre cepas animales y humanas [73], y que en esta tesis se detectaron altas concentraciones de este virus. Se puede concluir la existencia de un riesgo potencial para la salud de esta población y especialmente la de los niños que utilizan estas aguas para baño. Para poseer una idea más acabada del riesgo al que los bañistas se exponen es necesario realizar una evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico.

En cuanto a la influencia de los factores ambientales sobre la presencia viral se debe considerar la heterogeneidad presente. En el segundo muestreo se observa una disminución general en las concentraciones de NoV y ningún cambio para RV, en contraste a lo observado para CF que en general hubo un aumento de las UFC detectadas [98]. Dado el efecto de arrastre que tienen las precipitaciones sobre la materia fecal depositada en el suelo y la resuspensión de sedimento de las fuentes de agua [4], se esperaba un aumento en la concentración viral durante este muestreo. Sobre todo tomando en cuenta el periodo prolongado de ausencia de lluvia previo que podría haber favorecido el depósito de materia fecal en el suelo, la cual sería arrastrada hacia las fuentes de agua estudiadas por escorrentía. Además, el hecho de que al momento de toma de muestra se observaron en el suelo señales de que la escorrentía ocurrió, refuerza la idea de que las concentraciones de partículas virales deberían haber aumentado.

Entre el primer y el tercer muestreo las condiciones de humedad aumentaron considerablemente. En general se ha observado que los patógenos microbianos son detectados más frecuentemente en condiciones húmedas cuando se compara con condiciones secas como la del primer muestreo. Además considerando que el aumento de la temperatura no fue de notoria importancia (aproximadamente 4°C). Estudios anteriores muestran diferencias en la presencia de NoV entre estaciones húmedas y secas, con un patrón claramente estacional de circulación durante las estaciones húmedas [44], [60]. En este sentido se esperaría que la detección de NoV fuera mayor luego de un periodo de lluvias prolongado que en la condición de sequía previa. Lo interesante es que esto no ocurrió y la detección de NoV decayó fuertemente. Esto puede deberse a que el periodo de muestreo de esta tesis abarcó solo dos estaciones que son en general secas, primavera-verano, por lo que el efecto de la lluvia no pudo

observarse en su máxima expresión. Otros trabajos han mostrado que el comportamiento de los virus frente a la lluvia genera resultados contradictorios. Se ha observado que la lluvia ha sido asociada al incremento de la concentración viral en uno o dos órdenes de magnitud en aguas de Brasil [62]. Así mismo otros trabajos en Estados Unidos no han observado diferencias en los niveles de contaminación viral [146], mientras que también en Brasil sí se ha visto un descenso en el nivel de patógenos durante eventos hidrológicos [84]. Por lo que es necesario profundizar los estudios del comportamiento viral frente a eventos hidrológicos para poder realizar teorías que se ajusten mejor a lo que ocurre en cada microcuenca.

Por su parte, la relación de NoV con la temperatura fue notoriamente negativa (Figura 27), temperaturas más altas reflejaron menor carga viral, este fenómeno ya fue explicitado anteriormente en un estudio en aguas residuales de Montevideo [40]. Este hecho puede ser explicado por la naturaleza de este virus, por un lado su falta de envoltura que los hace más resistente a las condiciones de un entorno acuoso y por otro su naturaleza de genoma ARN simple hebra que es lábil a la radiación solar. Por otro lado se denota que los RV no tuvieron tanta variación con la temperatura lo que puede estar determinado por la naturaleza de su genoma ARN doble hebra y sus tres cubiertas proteicas que conforman la cápside viral. Este hecho no concuerda con lo mostrado previamente en otros trabajos en que las epidemias causadas por los Rotavirus poseen un patrón estacional con claros picos en invierno que involucran una variedad de factores como la sobrevivencia de los virus en el ambiente [72]. Para una interpretación más profunda y acertada de las tendencias observadas sería necesario contar con mayor cantidad de muestreos que abarquen al menos un año para tener en cuenta las diferentes estaciones y condiciones climáticas que existen en nuestro país.

Existen numerosos estudios comparando la presencia de indicadores bacterianos y virus, en una revisión del tema realizada por Bofill-mas y cols. en 2013, se muestra la ausencia de asociación entre ambos microorganismos [7]. Esta premisa se cumple en el caso de los NoV, lo que puede deberse a que la fuente de contaminación de ambos patógenos es diferente. Mientras que los coliformes termoestables pueden provenir de una variedad de animales e incluso crecer en el agua bajo ciertas condiciones, los NoV detectados en este trabajo solo provienen de humanos. Pero contrariamente a lo esperado los RV desplegaron la misma tendencia que los CF en el gráfico de caja (Figura 28). Si se observa con mayor detenimiento este hecho se aprecia que RV tiende a tener un comportamiento aleatorio en la primer categoría ya que el mismo sitio en algún muestreo mostró resultados nulos y en otros alta carga viral.

La categoría 3 cumplió con los valores estándares de calidad microbiológica establecidos por la regulación [98], aun así estos sitios mostraron la presencia de

partículas virales de NoV y RV. Dada la baja dosis infectiva de estos virus y las cargas virales detectadas, se debe prestar especial atención a estos sitios ya que podrían llegar a constituir una fuente importante de infección que no pudo ser predicha por los indicadores microbiológicos.

La tendencia observada en la Figura 28 para Rotavirus y discutida en los párrafos anteriores, fue puesta a prueba con la estimación del Coeficiente de Correlación de Pearson que reveló que existe una correlación positiva con alto apoyo estadístico entre la carga viral de RV y la concentración de Coliformes Termotolerantes. Esto indica la tendencia de aumento de copias genómicas de este virus cuando aumentan los indicadores bacterianos a pesar de los valores de RV nulos obtenidos en las categorías 1 y 2. Así mismo el gráfico de correlación binaria y predicción lineal con intervalos de confianza de la Figura 29 muestra un intervalo de confianza con importante bondad de ajuste como se ha observado para Adenovirus con respecto a *E.coli* en aguas recreacionales Europeas [147], así mismo otros trabajos previos han mostrado la relación inversa entre indicadores bacterianos y la presencia viral [146].

Por último, las principales fuentes de enfermedades humanas en aguas de playa incluyen aguas residuales, escorrentía agrícola, especialmente de heces de ganado, y contagio bañista-bañista. Además, modelos estimativos sugieren que a nivel mundial NoV y RV son los responsables del 75% de las enfermedades de los bañistas y se ha demostrado que hay una vinculación dosis-respuesta, cuanto más contaminada el agua o cuanto más se ingiera de la misma resulta en mayores tasas de gastroenteritis [139]. Todo esto pone en manifiesto la relevancia de los datos obtenidos en esta tesis con respecto a la salud pública de los pobladores de Barros Blancos que utilizan estas aguas para recreación. Así mismo, los estudios ambientales han demostrado ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos demostrando a través del ambiente la diversidad de virus circulantes en una determinada población. La presencia de los tres virus estudiados en las aguas de Barros Blancos provee una evidencia que los mismos están circulando en la población de la zona. Vale destacar que la presencia de genoma de los virus entéricos estudiados en esta tesis indica la ocurrencia de contaminación fecal, humana y animal, pero no es suficiente para inferir la infectividad viral. Factores como la temperatura, pH y radiación UV son conocidos por causar cambios conformacionales en la cápside viral que pueden generar partículas inviables [148]–[152]. Por lo que análisis de viabilidad en cultivo celular serían necesarios para obtener datos concluyentes en este sentido. Otro aspecto a tener en cuenta es que en Barros Blancos el rápido y desordenado crecimiento en la población que generó la creación de nuevas zonas pobladas -entre las que se encuentran asentamientos irregulares- puede llevar a problemas en los ecosistemas acuáticos. Otros estudios han demostrado que el desarrollo urbano a lo largo de arroyos lleva a una pérdida de biodiversidad y a la

disminución de la calidad de agua de estos ecosistemas dada una serie de efectos adversos en estos cuerpos de agua, incluidos las descargas de aguas residuales no tratadas dentro de los mismos [60]. Las directrices en lo que tiene que ver con la cantidad de virus en aguas recreacionales que existe en otros países, se centran en prevenir el riesgo implementando prácticas de manejo que deben ser adoptadas para asegurar que las aguas recreacionales estén protegidas de la contaminación directa de material fecal, particularmente de origen humano y de animales domésticos [153].

La virología ambiental es una disciplina que se ocupa de la epidemiología, diversidad, detección viral, entre otras, pero también tiene relevancia a nivel de políticas públicas, tanto de salud como de ingeniería de servicios y en este sentido es que se pretende aportar con esta tesis al área de estudio. Barros Blancos posee como ventaja la tradición en el terreno de las organizaciones sociales y la cercanía de Montevideo y dificultades como la falta de desarrollo, la dispersión geográfica de la población y la ausencia de identidad común. La falta de lugares de esparcimiento puede ser un motivo para intentar recuperar la calidad de los ecosistemas acuáticos. Si bien la falta de recursos es una dificultad, las Naciones Unidas han realizado un estudio de costo-beneficio de implementar medidas sanitarias a nivel global. Los resultados muestran que la implementación de todas las mejoras en la calidad de agua y saneamiento poseen una relación costo/beneficio alta, y que es aplicable a todas las regiones del mundo. En regiones en desarrollo el retorno de invertir 1 dólar es de alrededor de 5 a 28 dólares por lo que sería interesante que autoridades nacionales y departamentales evaluaran seriamente la realización de una red local de saneamiento, tanto sea de forma tradicional como algún tipo de saneamiento alternativo que sea amigable con el ambiente, esto redundaría de manera importante en la calidad del agua [122], [154].

7. Conclusiones

- La técnica de concentración utilizada permitió detectar y cuantificar satisfactoriamente los virus analizados en esta tesis. Los resultados muestran un 90% de muestras positivas para al menos un virus y que todos los sitios fueron positivos para algún virus en al menos un muestreo.
- Las secuencias de Rotavirus obtenidas mostraron alto grado de identidad con secuencias del virus circulantes en bovinos y humanos de la región y fuera de esta. Los P tipos presentes en el área de estudio fueron P[5] en un 61%, P[9] en un 17% y P[11] en un 11%, mientras que los G tipos fueron G10 con un 89% y G6 con un 11% de las muestras positivas. Este es el primer trabajo en el que se detecta la circulación en nuestro país de los genotipos P[5] y G6 en el ambiente.
- Se detectó en mayor medida el genotipo II de Picobirnavirus con respecto al genotipo I, siendo las secuencias analizadas para el GII divergentes.
- Mediante PCR cuantitativa se detectó Rotavirus en un 49% de las muestras y Norovirus en un 51% de las mismas con una distribución amplia en el territorio, sin vinculación clara con la densidad poblacional.
- La disminución en la concentración de Norovirus en las aguas estudiadas así como la concentración mantenida de Rotavirus a lo largo de los muestreos, no puede ser claramente explicada por variables ambientales.
- La disminución en la carga viral de Norovirus luego de un evento de lluvia intensa como fue en el segundo muestreo, no demuestra la presencia del efecto de escorrentía esperable en estos casos con un aumento de la carga viral.
- La carga viral de Rotavirus presente en los sitios mostró una clara correlación positiva con la concentración de los Coliformes Termotolerantes.
- Las microcuencas Cañada C y Tajamar Caputo fueron las que mostraron mayor contaminación fecal, siendo las mismas las que presentan matrices de agua con amplio uso en actividades de recreación.

- En su conjunto los datos obtenidos en esta tesis revelan que las aguas recreacionales de Barros Blancos, poseen contaminación fecal de origen bovino y humano lo que constituye un riesgo para la población de la zona y enfatizan la necesidad de la implementación de acciones que apunten a mitigar ésta contaminación y prevenir la transmisión de estos patógenos virales.

8. Perspectivas

- Para testear la viabilidad de los virus detectados se considera necesario realizar una técnica que involucre cultivo celular como la técnica de Cultivo Celular Integrado (ICC) a PCR o ICC-qPCR en este sentido se propone como perspectiva realizar ICC-qPCR para Rotavirus el cual es cultivable en células MA104.
- Para poseer una idea mas acabada del riesgo al que los bañistas se exponen cuando utilizan las aguas analizadas en esta tesis, es necesario realizar la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico con los datos de cuantificación de Rotavirus y Norovirus.
- Para analizar con mayor profundidad la dinámica de estos virus en el territorio de Barros Blancos se debe diseñar un estudio que abarque un período de tiempo más prolongado, incluyendo las cuatro estaciones, además de un relevamiento de muestras clínicas provenientes de materia fecal de pacientes con gastroenteritis, que permita correlacionar o no los virus presentes en el agua con los que circulan en la población.

9. Bibliografía

- [1] Naciones Unidas. Asamblea General, *El derecho humano al agua y el saneamiento.*, vol. 660. Paris, 2010, pp. 1–3.
- [2] Naciones Unidas. Departamento de asuntos económicos y Sociales, “Sustainable Development Knowledge Platform,” 2015. [Online]. Available: <https://sustainabledevelopment.un.org/topics>. [Accessed: 01-Oct-2015].
- [3] P. Roslev and A. S. Bukh, “State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water.,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1341–55, Mar. 2011.
- [4] Organización Mundial de la Salud, *Guidelines for safe recreational water*, vol. 1. Coastal. Malta: World Health Organization, 2003.
- [5] Organización Mundial de la Salud, “Water Sanitation Health,” 2015. [Online]. Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/burden/en/. [Accessed: 17-Dec-2015].
- [6] A. Pruss-Ustun and C. Corvalan, “Ambientes saludables y prevención de enfermedades : hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente: resumen de orientación,” 2006.
- [7] S. Bofill-mas, M. Rusiñol, X. Fernandez-cassi, A. Carratalà, A. Hundesa, and R. Girones, “Quantification of Human and Animal Viruses to Environmental Samples,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 11, 2013.
- [8] D. Knip and P. Howley, *Fields virology*, 5th ed. 2007.
- [9] A. Nocker, M. Burr, and A. Camper, “Pathogens in Water and Biofilms,” in *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, Second Edi., S. L. Percival, M. V. Yates, D. W. Williams, R. M. Chalmers, and N. F. Gray, Eds. London: Elsevier, 2014, pp. 3–32.
- [10] K. Gibson, “Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies,” *Curr. Opin. Virol.*, vol. 4, pp. 50–57, 2014.
- [11] R. G. Sinclair, E. L. Jones, and C. P. Gerba, “Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review.,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 107, no. 6, pp. 1769–80, Dec. 2009.
- [12] P. F. M. Teunis, C. L. Moe, P. Liu, S. E. Miller, L. Lindesmith, R. S. Baric, J. Le Pendu, and R. L. Calderon, “Norwalk virus: how infectious is it?,” *J. Med. Virol.*, vol. 80, no. 8, pp. 1468–76, Aug. 2008.
- [13] R. L. Ward, D. I. Bernstein, E. C. Young, J. R. Sherwood, D. R. Knowlton, and G. M. Schiff, “Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 154, no. 5, pp. 871–80, Nov. 1986.
- [14] J. Zahorsky, “Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease.,” *Arch. Paediatr.*, vol. 46, pp. 391–395, 1929.
- [15] A. Z. Kapikian, R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, and R. M. Chanock, “Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.,” *J. Virol.*, vol. 10,

- no. 5, pp. 1075–1081, 1972.
- [16] K. Y. Green, T. Ando, M. S. Balayan, T. Berke, I. N. Clarke, M. K. Estes, D. O. Matson, S. Nakata, J. D. Neill, M. J. Studdert, and H. J. Thiel, “Taxonomy of the caliciviruses,” *J. Infect. Dis.*, vol. 181 Suppl, no. figure 1, pp. S322–S330, 2000.
- [17] International Common Taxonomy of Viruses, “Virus Taxonomy,” http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27, 2015. [Online]. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. [Accessed: 09-Mar-2015].
- [18] K. Y. Green, “Caliciviridae: The Norovirus,” in *Fields Virology*, 6th ed., D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Philadelphia, 2013, pp. 582–608.
- [19] M. M. Patel, M.-A. Widdowson, R. I. Glass, K. Akazawa, J. Vinjé, and U. D. Parashar, “Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 1224–31, Aug. 2008.
- [20] D.-P. Zheng, T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass, and S. S. Monroe, “Norovirus classification and proposed strain nomenclature,” *Virology*, vol. 346, no. 2, pp. 312–23, Mar. 2006.
- [21] J. Vinjé, “Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 373–381, 2015.
- [22] A. Kroneman, E. Vega, H. Vennema, J. Vinje, P. A. White, G. Hansman, K. Green, V. Martella, K. Katayama, and M. Koopmans, “Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping,” *Arch. Virol.*, vol. 158, no. 10, pp. 2059–2068, 2013.
- [23] J. Gentry, J. Vinjé, D. Guadagnoli, and E. K. Lipp, “Norovirus distribution within an estuarine environment,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 17, pp. 5474–5480, 2009.
- [24] E. Tuladhar, W. C. Hazeleger, M. Koopmans, M. H. Zwietering, R. R. Beumer, and E. Duizer, “Residual viral and bacterial contamination of surfaces after cleaning and disinfection,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 21, pp. 7769–7775, 2012.
- [25] H. Maalouf, M. Zakhour, J. Le Pendu, J. C. Le Saux, R. L. Atmar, and F. S. Le Guyader, “Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 16, pp. 5621–5630, 2010.
- [26] L. G. Thorne and I. G. Goodfellow, “Norovirus gene expression and replication,” *J. Gen. Virol.*, vol. 95, no. Pt 2, pp. 278–91, Feb. 2014.
- [27] P. Simmonds, I. Karakasiliotis, D. Bailey, Y. Chaudhry, D. J. Evans, and I. G. Goodfellow, “Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 8, pp. 2530–2546, 2008.
- [28] M. J. Hardy, “Norovirus protein structure and function,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 253, no. 1, pp. 1–8, 2005.
- [29] B. V Prasad, M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes, “X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid,” *Science*, vol. 286, no. 5438, pp. 287–290, 1999.
- [30] S. Vongpunsawad, B. V Venkataram Prasad, and M. K. Estes, “Norwalk Virus

- Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 9, pp. 4818–25, 2013.
- [31] A. J. Hall, B. A. Lopman, D. C. Payne, M. M. Patel, P. A. Gastañaduy, J. Vinjé, and U. D. Parashar, "Norovirus disease in the United States.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 8, pp. 1198–205, Aug. 2013.
- [32] R. I. Glass, U. D. Parashar, and M. K. Estes, "Norovirus gastroenteritis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 18, pp. 1776–85, Oct. 2009.
- [33] S. M. Ahmed, A. J. Hall, A. E. Robinson, L. Verhoef, P. Premkumar, U. D. Parashar, M. Koopmans, and B. A. Lopman, "Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 725–730, 2014.
- [34] R. M. Lee, J. Lessler, R. A. Lee, K. E. Rudolph, N. G. Reich, T. M. Perl, and D. A. Cummings, "Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review," *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, p. 446, 2013.
- [35] E. Robilotti, S. Deresinski, and B. a. Pinsky, "Norovirus," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 1, pp. 134–164, 2015.
- [36] S. G. Morillo and M. D. C. S. T. Timenetsky, "Norovirus: an overview.," *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol. 57, no. 4, pp. 453–8, 2011.
- [37] E. Vega, L. Barclay, N. Gregoricus, S. H. Shirley, D. Lee, and J. Vinjé, "Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states, 2009 to 2013," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 147–155, 2014.
- [38] J. L. Cannon, E. Papafragkou, G. W. Park, J. Osborne, L.-A. Jaykus, and J. Vinjé, "Surrogates for the Study of Norovirus Stability and Inactivation in the Environment: A Comparison of Murine Norovirus and Feline Calicivirus," *J Food Prot.*, vol. 69, no. 11, pp. 2761–5, 2006.
- [39] S. M. Karst and R. S. Baric, "What is the Reservoir of Emergent Human Norovirus Strains?," *J. Virol.*, vol. 89, no. 11, p. JVI.03063-14, 2015.
- [40] Á. Alberti, "Detección molecular y diversidad genética de Norovirus en pacientes y en aguas residuales del Uruguay. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias.," 2012.
- [41] G. Varela, L. Batthyány, M. N. Bianco, W. Pérez, L. Pardo, G. Algorta, L. Robino, R. Suárez, A. Navarro, M. C. Pérez, and F. Schelotto, "Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in uruguay.," *Int. J. Microbiol.*, vol. 2015, p. 592953, 2015.
- [42] Á. Fajardo, F. López Tort, M. Victoria, T. M. Fumian, M. P. Miagostovich, J. P. G. Leite, J. Cristina, and R. Colina, "Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 28, pp. 328–332, 2014.
- [43] J. E. Kaplan, R. A. Goodman, L. B. Schonberger, E. C. Lippy, and G. W. Gary, "Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system.," *J. Infect. Dis.*, vol. 146, no. 2, pp. 190–7, Aug. 1982.
- [44] H. R. Poma, D. Gutiérrez Cacciabue, B. Garcé, E. E. Gonzo, and V. B. Rajal, "Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters," *Sci. Total Environ.*, vol. 433, pp. 98–109, 2012.
- [45] M. García Britos, "Identificación e Investigación de virus gastroentéricos en la cuenca del Río Uruguay. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias.," 2012.

- [46] M. K. Jones, M. Watanabe, S. Zhu, C. L. Graves, L. R. Keyes, K. R. Grau, M. B. Gonzalez-Hernandez, N. M. Iovine, C. E. Wobus, J. Vinje, S. a. Tibbetts, S. M. Wallet, and S. M. Karst, "Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells," *Science (80-.)*, vol. 6210, no. 346, pp. 755–9, 2014.
- [47] K. E. Gibson, M. C. Opryszko, J. T. Schissler, Y. Guo, and K. J. Schwab, "Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 84, no. 1, pp. 20–29, 2011.
- [48] M. Victoria, C. Rigotto, V. Moresco, A. de Abreu Corrêa, C. Kolesnikovas, J. P. G. Leite, M. P. Miagostovich, and C. R. M. Barardi, "Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 109, no. 1, pp. 231–8, 2010.
- [49] P. G. Cantalupo, B. Calgua, G. Zhao, A. Hundesa, A. D. Wier, J. P. Katz, M. Grabe, R. W. Hendrix, R. Girones, D. Wang, and J. M. Pipas, "Raw sewage harbors diverse viral populations," *MBio*, vol. 2, no. 5, pp. 1–11, 2011.
- [50] M. D. Blanco Fernández, C. Torres, L. C. Martínez, M. O. Giordano, G. Masachessi, P. a. Barril, M. B. Isa, R. H. Campos, S. V. Nates, and V. a. Mbayed, "Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 11, no. 7, pp. 1631–1637, 2011.
- [51] M. Victoria, F. R. Guimarães, T. M. Fumian, F. F. M. Ferreira, C. B. Vieira, J. P. G. Leite, M. P. Miagostovich, and T. Shubo, "One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil," *J. Water Health*, vol. 8, no. 1, pp. 158–165, 2010.
- [52] M. Berois and R. Colina, "Informe final proyecto I+D 'Detección de virus entéricos en aguas residuales y tratadas del Uruguay'. CSIC. UdelaR," 2013.
- [53] J. Mans, R. Netshikweta, M. Magwalivha, W. B. Van Zyl, and M. B. Taylor, "Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa.," *Epidemiol. Infect.*, vol. 141, no. 2, pp. 303–13, Feb. 2013.
- [54] T. G. Aw and K. Y. H. Gin, "Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 110, no. 4, pp. 903–914, 2011.
- [55] E. Haramoto, H. Katayama, K. Oguma, and S. Ohgaki, "Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 5, pp. 2403–2411, 2005.
- [56] A. P. Wyn-Jones, A. Carducci, N. Cook, M. D'Agostino, M. Divizia, J. Fleischer, C. Gantzer, A. Gawler, R. Girones, C. Höller, A. M. de Roda Husman, D. Kay, I. Kozyra, J. López-Pila, M. Muscillo, M. S. J. Nascimento, G. Papageorgiou, S. Rutjes, J. Sellwood, R. Szewzyk, and M. Wyer, "Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters.," *Water Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 1025–38, Jan. 2011.
- [57] I. A. Hamza, L. Jurzik, A. Stang, K. Sure, K. Überla, and M. Wilhelm, "Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses," *Water Res.*, vol. 43, no. 10, pp. 2657–2668, 2009.

- [58] J. Hernandez-Morga, J. Leon-Felix, F. Peraza-Garay, B. G. Gil-Salas, and C. Chaidez, "Detection and characterization of hepatitis a virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration - RT-PCR integrated methods," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 5, pp. 1579–1590, 2009.
- [59] S. R. Corsi, M. a Borhardt, S. K. Spencer, P. E. Hughes, and a K. Baldwin, "Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: hydrologically relevant representation and relations with environmental variables.," *Sci. Total Environ.*, vol. 490, pp. 849–60, Aug. 2014.
- [60] M. P. Miagostovich, F. F. M. Ferreira, F. R. Guimarães, T. M. Fumian, L. Diniz-Mendes, S. L. B. Luz, L. a. Silva, and J. P. G. Leite, "Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 2, pp. 375–382, 2008.
- [61] B. Calgua, T. Fumian, M. Rusiñol, J. Rodriguez-Manzano, V. a Mbayed, S. Bofill-Mas, M. Miagostovich, and R. Girones, "Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas.," *Water Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 2797–810, May 2013.
- [62] M. Victoria, T. M. Fumian, M. S. Rocha, F. Dalmao, J. P. G. Leite, R. Girones, and M. P. Miagostovich, "Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 117, no. 4, pp. 1210–8, 2014.
- [63] M. D. Blanco Fernández, C. Torres, H. R. Poma, G. Riviello-López, L. C. Martínez, D. M. Cisterna, V. B. Rajal, S. V. Nates, and V. a. Mbayed, "Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes," *Sci. Total Environ.*, vol. 437, pp. 262–269, 2012.
- [64] R. F. Bishop, G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck, "Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.," *Lancet*, vol. 2, no. 7841, pp. 1281–1283, 1973.
- [65] T. H. Flewett, A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick, "Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves.," *Lancet*, vol. 2, no. 7872, pp. 61–63, 1974.
- [66] J. Matthijssens, P. H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. van Ranst, and R. Johne, "VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation," *Arch. Virol.*, vol. 157, no. 6, pp. 1177–1182, 2012.
- [67] M. K. Estes and H. B. Greenberg, "Rotaviruses," in *Fields Virology*, 6th ed., D. Knipe and P. Howley, Eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 2582.
- [68] U. Desselberger, "Rotaviruses," *Virus Res.*, vol. 190, pp. 75–96, 2014.
- [69] H. Jayaram, M. K. Estes, and B. V. V Prasad, "Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication," *Virus Res.*, vol. 101, no. 1, pp. 67–81, 2004.
- [70] P. H. Dennehy, "Rotavirus Infection. A Disease of the Past?," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 4, no. 29, pp. 617–35, 2015.
- [71] A. Chandran, S. Fitzwater, A. Zhen, and M. Santosham, "Prevention of rotavirus

- gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines.," *Biologics*, vol. 4, pp. 213–29, Jan. 2010.
- [72] M. D. Esona and R. Gautam, "Rotavirus," *Clin. Lab. Med.*, vol. 35, no. 2, pp. 363–391, 2015.
- [73] F. Bucardo and J. Nordgren, "Impact of vaccination on the molecular epidemiology and evolution of group A rotaviruses in Latin America and factors affecting vaccine efficacy.," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 34, pp. 106–13, 2015.
- [74] V. Martella, K. Bányai, J. Matthijssens, C. Buonavoglia, and M. Ciarlet, "Zoonotic aspects of rotaviruses.," *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 246–55, Jan. 2010.
- [75] N. Santos and Y. Hoshino, "Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine," *Rev. Med. Virol.*, vol. 15, no. 1, pp. 29–56, 2005.
- [76] H. Papp, B. Laszlo, F. Jakab, B. Ganesh, S. De Grazia, J. Matthijssens, M. Ciarlet, V. Martella, and K. Banyai, "Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle," *Vet. Microbiol.*, vol. 165, no. 3–4, pp. 190–199, 2013.
- [77] M. E. Torres, M. C. Pérez, F. Schelotto, G. Varela, V. Parodi, F. Allende, E. Falconi, L. Dell'Acqua, P. Gaione, M. V Méndez, A. M. Ferrari, A. Montano, E. Zanetta, A. M. Acuña, H. Chiparelli, and E. Ingold, "Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 6, pp. 2134–9, Jun. 2001.
- [78] M. Berois, S. Libersou, J. Russi, J. Arbiza, and J. Cohen, "Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999.," *J. Med. Virol.*, vol. 71, no. 3, pp. 456–62, Nov. 2003.
- [79] Á. Alberti, "Estudio epidemiológico de la proteína VP7 de Rotavirus Humano circulantes en Uruguay. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias.," 2008.
- [80] V. Bengochea, "Genotipificación de Rotavirus mediante múltiplex RT-PCR en Uruguay. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias.," 2010.
- [81] L. F. López Tort, M. Victoria, A. Lizasoain, M. Castells, L. Maya, M. M. González, E. Arreseigor, P. López, J. Cristina, J. Paulo, G. Leite, and R. Colina, "Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Among Children Admitted to Hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: First Detection of the Emerging Genotype G12," *J. Med. Virol.*, vol. 87, no. 5, pp. 754–763, 2015.
- [82] V. Bengochea, A. Alberti, R. Escobar, E. Reolon, J. Arbiza, and M. Berois, "Epidemiología molecular de diarreas bovinas de etiología viral en Uruguay." X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina, 2011.
- [83] N. M. Kiulia, N. Hofstra, L. C. Vermeulen, M. a Obara, G. Medema, and J. B. Rose, "Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters.," *Pathog. (Basel, Switzerland)*, vol. 4, no. 2, pp. 229–55, 2015.
- [84] L. K. de Oliveira, J. D. Fleck, J. Comerlato, M. Kluge, B. Bergamaschi, R. B. Fabres, R. B. da Luz, J. V. D. S. da Silva, M. T. Rodrigues, J. L. Genro, R. Staggemeier, N. Baldasso, and F. R. Spilki, "Enteric viruses in water samples from Brazilian dairy farms," *Agric. Water Manag.*, vol. 111, no. October 2015, pp. 34–39, 2012.
- [85] M. V Yates, "Rotavirus," in *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, Second Edi., S. Percival, M. V. Yates, D.

- Williams, R. C. Gray, and N. Gray, Eds. London: Elsevier, 2014, pp. 523–527.
- [86] M. Kluge, J. D. Fleck, M. C. Soliman, R. B. Luz, R. B. Fabres, J. Comerlato, J. V. S. Silva, R. Staggemeier, A. D. Vecchia, R. Capalonga, A. B. Oliveira, A. Henzel, C. Rigotto, and F. R. Spilki, “Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil.,” *J. Water Health*, vol. 12, no. 3, pp. 526–32, Sep. 2014.
- [87] G. Betancour, “Detección y análisis molecular de Rotavirus a partir de aguas provenientes de plantas de saneamiento de OSE. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias.,” 2013.
- [88] A. Lizasoain, “Análisis de virus entéricos en plantas de tratamiento de aguas residuales en el interior de Uruguay. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias.,” Universidad de la República, 2012.
- [89] L. F. Lopez Tort, M. Victoria, A. Lizasoain, M. García, M. Berois, J. Cristina, J. P. G. Leite, M. M. Gómez, M. P. Miagostovich, and R. Colina, “Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay,” *Food Environ. Virol.*, vol. 7, no. 4, pp. 342–353, Dec. 2015.
- [90] V. Chigor and A. Okoh, “Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dams in the Eastern Cape Province of South Africa,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 9, no. 12, pp. 4017–4032, 2012.
- [91] V. N. Chigor, T. Sibanda, and A. I. Okoh, “Assessment of the Risks for Human Health of Adenoviruses, Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Three Source Water Dams in the Eastern Cape,” *Food Environ. Virol.*, vol. 6, no. 2, pp. 87–98, 2014.
- [92] S. Rezaeinejad, G. G. R. V. Vergara, C. H. Woo, T. T. Lim, M. D. Sobsey, and K. Y. H. Gin, “Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment,” *Water Res.*, vol. 58, pp. 122–131, 2014.
- [93] L. Kittigul, A. Panjangampatthana, K. Rupprom, and K. Pombubpa, “Genetic diversity of rotavirus strains circulating in environmental water and bivalve shellfish in Thailand.,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 2, pp. 1299–311, Feb. 2014.
- [94] F. M. Schets, J. H. van Wijnen, J. F. Schijven, H. Schoon, and a. M. de Roda Husman, “Monitoring of Waterborne Pathogens in Surface Waters in Amsterdam, The Netherlands, and the Potential Health Risk Associated with Exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in These Waters,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2069–2078, 2008.
- [95] V. E. Prez, P. I. Gil, C. F. Temprana, P. R. Cuadrado, L. C. Martínez, M. O. Giordano, G. Masachessi, M. B. Isa, V. E. Ré, J. V. Paván, S. V. Nates, and P. a. Barril, “Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina,” *Sci. Total Environ.*, vol. 538, pp. 220–229, 2015.
- [96] C. Rigotto, M. Victoria, V. Moresco, C. K. Kolesnikovas, A. A. Corre, and M. P. Miagostovich, “Assessment of adenovirus , hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis , South,” pp. 1979–1987,

- 2010.
- [97] G. Fongaro, J. Padilha, C. D. Schissi, M. a. Nascimento, G. B. Bampi, a. Viancelli, and C. R. M. Barardi, "Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2015.
 - [98] CEUTA, UdelaR, and IMM, *Diagnóstico socioambiental orientado al estudio de las parasitosis intestinales y zoonosis: una experiencia de investigación participativa en un contexto de alta vulnerabilidad social en Ciudad Barros Blancos, Canelones, Uruguay.*, CEUTA. Montevideo, 2013.
 - [99] H. G. Pereira, A. Fialho, T. Flewett, J. Teixeira, and Z. Andrade, "Novel viruses un human faeces," *Lancet*, vol. 9, no. 92, pp. 103–104, 1988.
 - [100] H. G. Pereira, T. H. Flewett, J. A. N. Candeias, and O. M. Barth, "A Virus with a Bisegmented Double-stranded RNA Genome in Rat (*Oryzomys nigripes*) Intestines," *j. gen. virol.*, vol. 69, no. 1988, pp. 2749–2754, 1988.
 - [101] B. I. Rosen, Z. Y. Fang, R. I. Glass, and S. S. Monroe, "Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay.," *Virology*, vol. 277, no. 2, pp. 316–29, Nov. 2000.
 - [102] Y. S. Malik, N. Kumar, K. Sharma, K. Dhama, M. Z. Shabbir, B. Ganesh, N. Kobayashi, and K. Banyai, "Epidemiology , Phylogeny , and Evolution of Emerging Enteric Picobirnaviruses of Animal Origin and Their Relationship to Human Strains," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 13, 2014.
 - [103] B. Ganesh, G. Masachessi, and Z. Mladenova, "Animal Picobirnavirus," *VirusDisease*, vol. 25, no. 2, pp. 223–238, 2014.
 - [104] S. L. Smits, C. M. E. Schapendonk, J. Van Beek, H. Vennema, A. C. Schürch, D. Schipper, R. Bodewes, B. L. Haagmans, A. D. M. E. Osterhaus, and M. P. Koopmans, "New Viruses in Idiopathic Human Diarrhea Cases, the Netherlands," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 7, pp. 1218–22, 2014.
 - [105] S. Nates, M. Gatti, and J. Ludert, "The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential," *Future Virol.*, vol. 6, no. 2, pp. 223–235, 2011.
 - [106] S. Duquerroy, B. Da Costa, C. Henry, A. Vigouroux, S. Libersou, J. Lepault, J. Navaza, B. Delmas, and F. a Rey, "The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry.," *EMBO J.*, vol. 28, no. 11, pp. 1655–65, Jun. 2009.
 - [107] B. Ganesh, K. Bányai, V. Martella, F. Jakab, G. Masachessi, and N. Kobayashi, "Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential.," *Rev. Med. Virol.*, vol. 22, no. 4, pp. 245–56, Jul. 2012.
 - [108] S. L. Smits, L. L. M. Poon, M. van Leeuwen, P.-N. Lau, H. K. K. Perera, J. S. M. Peiris, J. H. Simon, and A. D. M. E. Osterhaus, "Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 12, pp. 2328–30, Dec. 2011.
 - [109] S. L. Smits, M. van Leeuwen, C. M. E. Schapendonk, A. C. Schürch, R. Bodewes, B. L. Haagmans, and A. D. M. E. Osterhaus, "Picobirnaviruses in the human respiratory tract.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 9, pp. 1539–40, Sep. 2012.
 - [110] V. Ramas, "Detección de Picobirnavirus (PBV) en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en Uguauay, utilizando el método

- de Boom modificado para la extracción de ARN.," Facultad de Ciencias, UdelaR, 2007.
- [111] A. M. Sánchez, "Detección por PAGE y caracterización molecular de Picobirnavirus en pacientes con infección VIH en Uruguay. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias," 2007.
- [112] L. Gillman, A. M. Sánchez, and J. Arbiza, "Picobirnavirus in captive animals from Uruguay: identification of new hosts.," *Intervirology*, vol. 56, no. 1, pp. 46–9, Jan. 2013.
- [113] E. M. Symonds and M. Breitbart, "Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States ," *Society*, vol. 75, no. 5, pp. 1402–1409, 2009.
- [114] I. A. Hamza, L. Jurzik, K. Uberla, and M. Wilhelm, "Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water.," *Water Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 1358–68, Jan. 2011.
- [115] S. Zhang, R. Bai, R. Feng, H. Zhang, and L. Liu, "Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater," *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 474–482, 2015.
- [116] M. Victoria, L. F. Lopez Tort, M. García, A. Lizasoain, L. Maya, J. P. G. Leite, M. P. Miagostovich, J. Cristina, and R. Colina, "Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay.," *Food Environ. Virol.*, Apr. 2014.
- [117] C. Canaria, "Municipio de Barros Blancos," 2015. [Online]. Available: <https://www.imcanelones.gub.uy/?q=node/4535>. [Accessed: 26-Dec-2015].
- [118] P. I. Metropolitano, "Caracterización socio-económica de Barros Blancos," no. 1, pp. 1–5, 2014.
- [119] Instituto Nacional de Estadística, "Censos," 2011. [Online]. Available: <http://www.ine.gub.uy/censos2011/resultadosfinales/canelones.html>. [Accessed: 03-Jul-2014].
- [120] J. Braidá, S. Centurión, C. Desiderio, S. Gianoni, and M. L. Lagreca, "Extensión universitaria. Inserción del departamento de medicina familiar y comunitaria en la ciudad de Barros Blancos centro cívico Salvador Allende. 2008-2010," in *Atención Primaria de la Salud en Uruguay: experiencias y lecciones aprendidas*, E. Levcovitz, G. Antonioli, D. Sánchez, and M. Fernández Galeano, Eds. Montevideo, 2011, pp. 45–55.
- [121] A. Castiglia, "Informe Mercado de Trabajo Barros Blancos." Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. Dirección Nacional de Empleo, Montevideo, pp. 1–27, 2013.
- [122] D. Veiga, A. M. Rivoir, P. Marianovich, and L. Bidegain, "La conformación social en sus diversas dimensiones," in *Libro Blanco del Área Metropolitana*, Montevideo: Agenda Metropolitana, OPP, Presidencia de la República, DINOT, PNUD, AECI, 2007, pp. 299–352.
- [123] S. Pina, M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R. Girones, "Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 9, pp. 3376–82, Sep. 1998.

- [124] M. Puig, J. Jofre, F. Lucena, a Allard, G. Wadell, and R. Girones, "Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 8, pp. 2963–70, Aug. 1994.
- [125] TSRI, "VIPERdb," 2016. [Online]. Available: http://vipperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=1dwn. [Accessed: 13-Jan-2016].
- [126] V. B. Rajal, B. S. Mcswain, D. E. Thompson, M. Leutenegger, B. J. Kildare, and S. Wuertz, "Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples," *Water Res.*, vol. 41, no. 7, pp. 1411–1422, 2007.
- [127] J. Vinjé, R. a. Hamidjaja, and M. D. Sobsey, "Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses," *J. Virol. Methods*, vol. 116, no. 2, pp. 109–117, Mar. 2004.
- [128] V. Gouvea, C. Ramirez, B. Li, V. Gouvea, C. Ramirez, B. Li, N. Santos, L. Saif, H. F. Clark, and Y. Hoshino, "Restriction endonuclease analysis of the vp7 genes of human and animal rotaviruses . Restriction Endonuclease Analysis of the vp7 Genes of Human and Animal Rotaviruses," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 917–923, 1993.
- [129] V. Gouvea, R. I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester, and Z. Fang, "Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 276–282, 1990.
- [130] J. R. Gentsch, R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and A. M. K. Bhan4, "Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 6, pp. 1365–1373, 1992.
- [131] M. Abbaszadegan, P. Stewart, and M. LeChevallier, "A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 444–449, 1999.
- [132] K. Bányai, F. Jakab, G. Reuter, J. Bene, M. Uj, B. Melegh, and G. Szücs, "Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak.," *Arch. Virol.*, vol. 148, no. 12, pp. 2281–91, Dec. 2003.
- [133] J. Matthijssens, M. Ciarlet, S. M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J. R. Brister, J. Buesa, M. D. Esona, M. K. Estes, J. R. Gentsch, M. Iturriza-Gómara, R. Johne, C. D. Kirkwood, V. Martella, P. P. C. Mertens, O. Nakagomi, V. Parreño, M. Rahman, F. M. Ruggeri, L. J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, J. T. Patton, U. Desselberger, and M. Van Ranst, "Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG).," *Arch. Virol.*, vol. 156, no. 8, pp. 1397–413, Aug. 2011.
- [134] M. C. D. Fregolente and M. S. V. Gatti, "Nomenclature proposal for picobirnavirus," *Arch. Virol.*, vol. 154, no. 12, pp. 1953–1954, 2009.
- [135] X. L. Pang, J. K. Preiksaitis, and B. Lee, "Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis.," *J. Clin. Virol.*, vol. 33, no. 2, pp. 168–71, Jun. 2005.

- [136] T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama, "Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR," *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 4, pp. 1548–1557, 2003.
- [137] S. Q. Zeng, A. Halkosalo, M. Salminen, E. D. Szakal, L. Puustinen, and T. Vesikari, "One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis.," *J. Virol. Methods*, vol. 153, no. 2, pp. 238–40, Nov. 2008.
- [138] D. Veiga, "Desigualdades sociales y fragmentación territorial en el área metropolitana de Montevideo. (Spanish)," *Soc. Inequal. Territ. Fragm. Metrop. Area Montevideo.*, vol. 15, pp. 127–153, 2009.
- [139] M. Sanborn and T. Takaro, "Recreational water-related illness: office management and prevention.," *Can. Fam. Physician*, vol. 59, no. 5, pp. 491–5, May 2013.
- [140] C. J. P. A. Hoebe, H. Vennema, A. M. de Roda Husman, and Y. T. H. P. van Duynhoven, "Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain.," *J. Infect. Dis.*, vol. 189, no. 4, pp. 699–705, Feb. 2004.
- [141] B. Calgua, J. Rodriguez-Manzano, A. Hundesa, E. Suñen, M. Calvo, S. Bofill-Mas, and R. Girones, "New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR.," *J. Virol. Methods*, vol. 187, no. 2, pp. 215–21, Feb. 2013.
- [142] A. Badaracco, L. Garaicoechea, J. Matthijnsens, E. Louge Uriarte, A. Odeón, G. Bilbao, F. Fernandez, G. I. Parra, and V. Parreño, "Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 18, pp. 18–30, 2013.
- [143] O. Nakagomi, Y. Isegawa, R. L. Ward, D. R. Knowlton, E. Kaga, T. Nakagomi, and S. Ueda, "Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient," *Arch. Paediatr.*, vol. 137, pp. 381–388, 1994.
- [144] E. M. Volotão, C. C. Soares, A. G. Maranhão, L. N. Rocha, Y. Hoshino, and N. Santos, "Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities.," *J. Med. Virol.*, vol. 78, no. 2, pp. 263–72, Feb. 2006.
- [145] J. O'Toole, M. Sinclair, M. Malawaraarachchi, A. Hamilton, S. F. Barker, and K. Leder, "Microbial quality assessment of household greywater.," *Water Res.*, vol. 46, no. 13, pp. 4301–13, Sep. 2012.
- [146] S. Choi and S. C. Jiang, "Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 11, pp. 7426–33, Nov. 2005.
- [147] M. D. Wyer, A. P. Wyn-jones, D. Kay, H. C. Au-yeung, A. Maria, D. R. Husman, S. Rutjes, J. Lo, and O. Schneider, "Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters," *Water Res.*, vol. 13, no. 46, pp. 4130–41, 2012.
- [148] A. Knight, J. Haines, A. Stals, D. Li, M. Uyttendaele, A. Knight, and L.-A. Jaykus, "A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of

- human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 216, pp. 40–49, 2016.
- [149] C. Liu, X. Li, and H. Chen, “Application of water-assisted ultraviolet light processing on the inactivation of murine norovirus on blueberries,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 214, pp. 18–23, 2015.
- [150] Z. M. Hirani, Z. Bukhari, J. Oppenheimer, P. Jjemba, M. W. LeChevallier, and J. G. Jacangelo, “Impact of MBR cleaning and breaching on passage of selected microorganisms and subsequent inactivation by free chlorine,” *Water Res.*, vol. 57, pp. 313–324, 2014.
- [151] M. A. Page, J. L. Shisler, and B. J. Mariñas, “Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 9, pp. 2946–2954, 2010.
- [152] L. Liu, S. Oza, D. Hogan, J. Perin, I. Rudan, J. E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers, and R. E. Black, “Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis,” *Lancet*, vol. 385, no. 9966, pp. 430–440, 2015.
- [153] National Health and Medical Research Council, *Guidelines for Managing Risks in Recreational Water*. 2008.
- [154] G. Hutton and L. Haller, “Evaluation of the Costs and Benefits of Water and Sanitation Improvements at the Global Level,” 2004.

10. Anexo

Tabla A 1. Información sobre los puntos de toma de muestra.

Sitios de muestreo	Microcuenca	Nombre sitio de muestreo	Descripción	Uso como agua recreativa	Área (ha)	Coordenadas (Latitud, Longitud)	
1	Tajamar "El Coronel" ■	Parte oeste del tajamar "El Coronel"	El tajamar se ubica al extremo sur de la zona de estudio. La microcuenca asociada es grande pero poco poblada con excepción de una estrecha franja al norte. El sector oeste del tajamar es drenado por una cañada del sector sur de la microcuenca	Lugar de baño de los habitantes de Bella Vista de Carrasco.	0,6	-34,7799 -56,0065	
2		Cuneta en avenida José María García a unos metros del punto donde se vierte en la cañada emisora del tajamar "El Coronel".	Es una de las cunetas más grandes del sector. Colecta las aguas servidas de gran parte de las viviendas de avenida José María García.	----	----	-34,7775 -56,0078	
3	Tajamar Caputo ▲	En el tajamar Caputo cerca de la confluencia con las cañadas provenientes de Paso Escobar y de Bella Vista	La microcuenca asociada al tajamar es de relativamente pequeña dimensión pero tiene alta densidad poblacional, integrando a una gran parte del asentamiento de Paso Escobar y de Bella Vista. Dada la gran extensión y particularidades del tajamar se han tomado tres puntos de muestreo.	Baños y pesca deportiva por los moradores de Paso Escobar y Bella Vista	1,8	-34,7700 -56,0108	
4		En el tajamar Caputo a unos metros del caño de salida de agua				-34,7712 -56,0114	
5		En el tajamar Caputo cerca de la confluencia con las cañadas provenientes de Paso Escobar y de Bella Vista				-34,7711 -56,0092	
6		Cañada A				----	-34,7691 -56,0107
7		Cañada B				Para entender mejor la relación entre la contaminación fecal del tajamar y la de las 2 cañadas que lo alimentan, se tomaron muestras de éstas.	Se han observado niños bañándose en cunetas que desembocan en la cañada

8	Cañada C ●	Puente de la calle Tala	Na ce en Bella Vista , cruza Villa Universita ria y luego Villa Camen. La microcuenca asociada es pequeña pero densamente poblada e incluye parte de Bella Vista Chico por lo que las cunetas provenientes de este vierten en la cañada a la altura del puente y aguas arriba , contaminando al lugar de baños.	Cua ndo llueve el nivel de agua suben y los niños pequeños aprovechan para meterse en el agua		-34,7680 -56,0011
9	Cañada D ◆	Cantera de los Militares	Es una antigua cantera ahora inundada que se ubica al lado de un cuartel militar, a unos 200 m al este de la Escuela N° 187 en Villa Universita ria. La microcuenca asociada es de pequeño tamaño, no incluye a ninguna vivienda (los efluentes de la Escuela N° 187 y del cuartel no afectan directamente a la cantera)	Luga r de baños y pesca deportiva más frecuentado de la zona, induso en invierno	0,7	-34,7631 -55,9924
10	Cañada C ●	Pozo de los Bomberos	Es donde los bomberos se abastecían antiguamente de agua. La microcuenca asociada a la cañada, cuando atraviesa al pozo, integra a buena parte de Villa Universita ria y Bella Vista Chico así como a un sector poblado colindante del camino Ventura .	Frecuentado ocasionalmente por niños de Villa Universita ria	0,07	-34,7625 -55,9982
11		Último pozo de la Ladrillera	El es un conjunto de 3 pequeños pozos pocos profundos. Parecen haber servido de pozo de extracción de arcilla para una ladrillera cercana y que ahora sirven como reservorio para riego. La microcuenca asociada es de pequeño tamaño y no incluye a ninguna vivienda. Se tomaron las muestras en el último de los 3 pozos, ubicado aguas debajo de los 2 primeros .	Luga r de baño	0,05	-34,7666 -55,9984
12		Puente de la calle 19 de Junio	En este punto el agua es demasiado poco profunda para que los niños se bañen, pero si lo hacen aguas arriba del puente en lugares de	Baño en un tramo aguas arriba		-34,7640 -55,9992

			difícil acceso por lo que se muestreó el agua en el mismo puente			
13		Cuneta de la calle Maldonado	Es una cuneta secundaria, ubicada en Villa Carmen, cuyas aguas vierte en las cunetas principales del camino República.	----		-34,7549 -55,9979
14		Puente del camino República	La microcuenca asociada es grande, con varios sectores densamente poblados del barrio Villa Carmen. Hay cunetas que se vierten en la cañada aguas arriba del puente.	Baño en un tramo de la cañada ubicado aguas arriba		-34,7552 -55,9960
15		Cuneta de la calle Cabildo	Es una cuneta secundaria, ubicada en Villa Carmen, que se vierten en las cunetas principales del camino República.	----		-34,7555 -55,9957
16	Cañada D ◆	cañada D	Las cunetas que drenan las aguas servidas de los sectores poblados de ambas márgenes de la cañada, se vierten en ésta aguas arriba del área de baños, afectando directamente la calidad del agua. La microcuenca asociada a la cañada es grande y poco poblada excepto en su tramo final.	Los niños se bañan en un tramo de agua empozada ubicado aguas abajo del puente.		-34,7568 -55,9885

Se detalla la microcuenca a la que cada punto pertenece, la localización y su utilización por los vecinos. Cuadrado: Tajamar "El coronel". Triángulo: Tajamar Caputo. Círculo: Cañada C. Rombo: Cañada D. Información extraída de CEUTA, 2013 [98].

Tabla A 2: cuantificación de Norovirus genogrpo I y II.

Sitios	Muestreo 1		Muestro 2		Muestreo 3		Muestreo 4	
	NoV cg/mL	GI cg/mL	NoV cg/mL	GII cg/mL	NoV cg/mL	GI cg/mL	NoV cg/mL	GII cg/mL
1			2.1E+01					
2			1.6E+01					
3	1.2E+01		1.2E+03					
4	1.3E+01		6.8E+01		1.3E+01			
5	1.7E+01		1.4E+02		1.0E+01			
6			2.4E+01	2.5E+01	3.0E+01	3.1E+01		
7					1.2E+01			
8	1.6E+01		4.4E+01				1.9E+01	
9			2.4E+01					
10	1.0E+01		2.5E+02		1.2E+01		6.3E+01	
11	1.3E+01		7.0E+02					
12	1.3E+01		7.1E+02		1.4E+01		1.6E+01	
13	1.3E+01		2.3E+02		3.0E+01		3.9E+01	
14	2.3E+01		1.3E+02					
15	4.5E+01		1.2E+02	2.7E+01	4.5E+01	2.3E+01	1.3E+01	
16			2.3E+01					

GI: Genogrupo I, GII: Genogrupo II. cg/mL: copias genómicas/mililitro. Los sitios acentuados en negrita indican aquellos que fueron inducidos en el muestreo 4.

Tabla A 3: Cuantificación de Rota virus.

Sitios	Muestreo 1	Muestreo2	Muestreo 3	Muestreo 4
	RV cg/mL	RV cg/mL	RV cg/mL	RV cg/mL
1		2.4E+00	4.7E+01	
2			1.8E+02	
3	1.0E+01	4.0E+00	1.2E+02	
4	1.2E+01		1.7E+02	
5	3.4E+01			
6	7.7E+03	1.7E+02	5.4E+03	
7		3.3E+02	6.0E+02	
8	8.5E+01	3.6E+01	6.5E+01	
9				
10	3.2E+01		2.0E+02	
11				
12				
13	1.0E+05		4.9E+05	
14	2.7E+01	1.1E+02	1.8E+02	
15	7.6E+03		6.0E+02	
16		7.2E+01		

cg/mL: copias genómicas/mililitro. Los sitios acentuados en negrita indican aquellos que fueron inducidos en el muestreo 4.

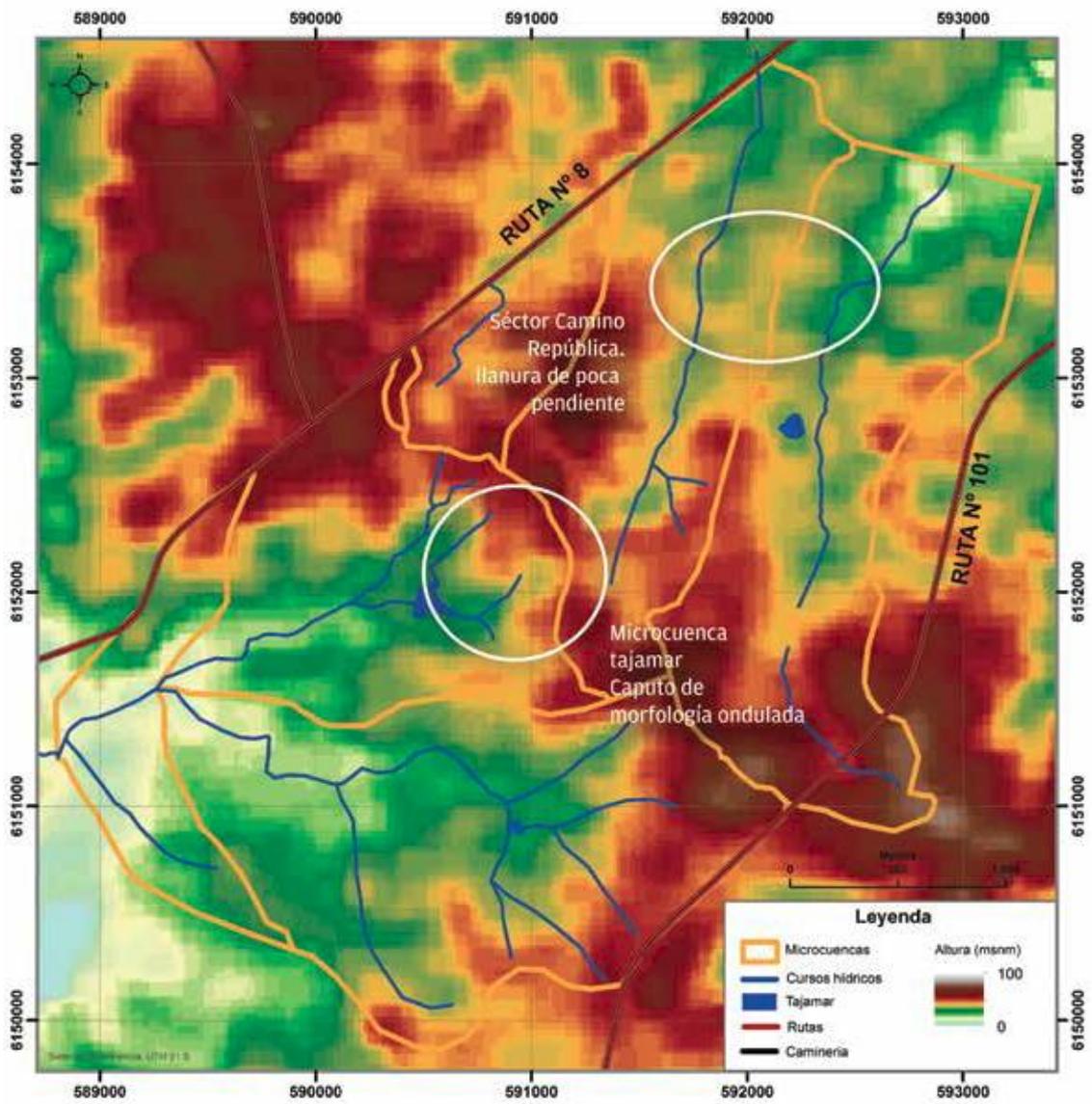


Figura A 1: Mapa Relieve del territorio de estudio mostrando la diferencia de pendientes entre el sector camino República y la microcuena Caputo. Extraído de CEUTA, 2013 [98].