

**CONVENIO ESPECÍFICO ENTRE LA ADMINISTRACION DE LAS OBRAS  
SANITARIAS DEL ESTADO Y LA UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA, CENTRO  
UNIVERSITARIO SALTO, CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL LITORAL NORTE.**

En la ciudad de Montevideo, el día 25 de mayo del año 2016, comparecen:-----

---**POR UNA PARTE:** La Administración de las Obras Sanitarias del Estado, en adelante O.S.E., representada por el Ingº Milton MACHADO y el Dr. Gerardo Andrés SIRI, en sus respectivas calidades de Presidente y Secretario General, constituyendo domicilio en la calle Carlos Roxlo Nº 1275, y -----

---**POR OTRA PARTE:** La Universidad de la República, Centro Universitario Salto, Centro Universitario Regional Litoral Norte, en adelante CENUR Litoral Norte-UDELAR, representada en este acto por el Señor Rector Dr. Roberto MARKARIAN, y por la Señora Directora del Centro Universitario Regional Litoral Norte Prof. Graciela Carreño, con domicilio en la calle Rivera Nº 1350 de la ciudad de Salto, deciden celebrar el siguiente Acuerdo:-----

---**PRIMERO: ANTECEDENTES.** 1) Con fecha 25/IV/94, O.S.E. y la Universidad de la República celebraron un Convenio Marco con el fin de ejecutar de común acuerdo proyectos y programas de complementación técnica y científica. 2) El día 10 de agosto de 2011 por Resolución de Directorio Nº 1133/11 se aprobó el proyecto de Convenio entre la O.S.E y la Sección Virología de la FC-UDELAR en conjunto con el Laboratorio de Virología Molecular del CENUR Litoral Norte, Salto, con el fin de detectar y monitorear la presencia de virus entéricos en el efluente de planta de tratamiento de aguas residuales. El mismo fue llevado a cabo con éxito y los resultados fueron presentados durante el Primer Encuentro de Técnico de Saneamiento realizado en 2014. 3) La Pauta Técnica propuesta por DINAMA para la aplicación de residuos sólidos como mejorador de suelos (enmarcada en el Decreto 182/13) requiere la detección de virus entéricos en dichos residuos. Con el fin de poder considerar esta alternativa como destino final de los lodos de PTAR, OSE tiene la necesidad de comenzar a implementar esta medición. 4) En el marco de este proceso y de la colaboración previa realizada entre las instituciones, el Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte - UDELAR y O.S.E, han resuelto colaborar con el fin de cumplir con el mencionado objetivo mediante el proyecto **“Detección, Cuantificación y Caracterización de Enterovirus en Lodos generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales”**.-----

*[Handwritten signatures and initials on the left margin]*

---**SEGUNDO: OBJETO.** Implementación de técnicas de concentración viral, detección, cuantificación y caracterización molecular de enterovirus a partir de muestras de lodos frescos generados durante el tratamiento de aguas residuales y en empujadas que han sufrido procesos de higienización. Estas técnicas serán de inmensa utilidad para monitorear agentes virales causales de diversas enfermedades así como para definir los destinos finales de los residuos generados en OSE-----

---**TERCERO: OBLIGACIONES.**-----

**I) Obligaciones del Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Noroeste:** Entregar informes semestrales acerca de los progresos técnicos del proyecto. Los informes serán presentados en forma escrita por el responsable del Proyecto, el Dr. Matías Victoria, y entregados a la contraparte designada por O.S.E. para su posterior aval.-----

**II) Obligaciones de O.S.E.:** La contraparte será la Gerencia de Gestión Ambiental de OSE con el fin de facilitar a los participantes del proyecto el acceso a las instalaciones de O.S.E. en la medida que corresponda a la consecución de los objetivos mencionados y que permitan realizar en tiempo y forma los trabajos. Proporcionar en caso de ser necesario otros parámetros (químicos y microbiológicos) vinculados a las muestras. La contraparte contará con un plazo de 30 días a partir de la entrega de los informes virológicos para expedirse.-----

---**CUARTO: PLANTAS DE TRATAMIENTO.** La selección de las plantas de tratamiento de O.S.E. de donde se tomarán las muestras de los lodos se realizará de común acuerdo entre las partes.-----

---**QUINTO: INICIO.** La fecha de inicio del Proyecto será fijada de común acuerdo entre las partes.-----

---**SEXTO: PLAZO.** El plazo del presente convenio es de 24 meses contados a partir de la efectiva disponibilidad de los materiales y reactivos necesarios para las actividades propuestas en el Proyecto y el mismo se llevará a cabo de acuerdo al "Cronograma de Ejecución" que consta en el Proyecto.-----

---**SÉPTIMO: COSTOS.** El Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Noroeste Salto - UDELAR se hará cargo de los costos de la estandarización de técnicas de concentración, detección de partículas viables de enterovirus, cuantificación y su caracterización en las muestras de lodo y O.S.E se hará cargo de los costos de toma de muestras, encalado del lodo, envío de muestras al Laboratorio y de realizar algún parámetro de control cuando se considere necesario.-----

---**OCTAVO: PUBLICACIONES** Se podrán realizar comunicaciones o publicaciones científicas. El autor principal y los co-autores serán los responsables de las mismas y deberán dejar constancia del patrocinio de O.S.E. en dicho trabajo. La iniciativa deberá contar con el aval de la Gerencia General de O.S.E. (la documentación será entregada a la contraparte para su visto bueno y posterior comunicación a la Gerencia General) quien tendrá 30 días para expedirse.-----

---**NOVENO:** Las partes acuerdan que el presente Convenio pueda renovarse mediando propuesta y aceptación por escrito.-----

---**DÉCIMO:** Las partes establecen como domicilios especiales los indicados como suyos en la comparecencia.-----

---**DÉCIMO PRIMERO:** Se pacta la validez del Telegrama Colacionado como medio auténtico de notificación.-----

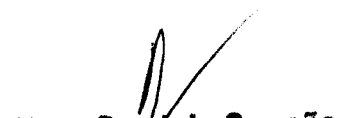
---**DÉCIMO SEGUNDO:** El presente Convenio fue aprobado por Resolución de Directorio de OSE Número 326/16 de fecha 29 de marzo de 2016-----

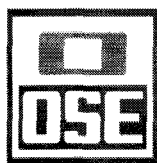
EN SEÑAL DE CONFORMIDAD, se firman dos ejemplares del mismo tenor en lugar y fecha antes indicados.-----

  
**Dr. GERARDO SIRI**  
**SECRETARIO GENERAL**

  
**Ing. MILTON MACHADO**  
**PRESIDENTE**

  
**Dr. ROBERTO MARKARIAN**  
**RECTOR**

  
**Mag. Graciela Carreño**  
**DIRECTORA**  
**CENUR - Litoral Norte - UDELAR**



Obras Sanitarias del Estado



Regional Norte

## Proyecto

# Detección, Cuantificación y Caracterización de Enterovirus en Lodos generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales

Proyecto a ser ejecutado en colaboración entre la Administración de Obras Sanitarias del Estado y el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Universitario Salto del CENUR Litoral Norte de la Universidad de la República.

*Introducción*

### ***Generación de Lodos en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales***

Durante el tratamiento del agua residual doméstica en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) se genera lodo como producto de desecho, que potencialmente puede llegar a ser utilizado como compuesto mejorador de suelos en la búsqueda de mayores rendimientos por parte de los cultivos (Gilsanz et al. 2013). Sin embargo, dichos lodos generalmente presentan una alta carga de patógenos como bacterias, virus, protozoos y parásitos, y al ser aplicados en suelos continúan su ciclo de dispersión ambiental, aumentando las posibilidades de alcanzar un individuo susceptible (humanos, ganado, mascotas) y causar enfermedad (USEPA, 2003; Guzmán et al. 2007a). Por lo tanto, no solo es necesario tratar los lodos para reducir los contaminantes microbiológicos, sino que también es imprescindible regular su posterior utilización, especialmente cuando la misma es con fines agrícolas (Viau et al. 2011).

La generación de lodos a partir del proceso de tratamiento de aguas residuales es una característica intrínseca del proceso en sí, siendo el uso agrícola una alternativa con ventajas ambientales cuando se compara con otras prácticas de deposición final.

### ***Patógenos en lodos***

Generalmente, el agua residual doméstica contiene los principales tipos de patógenos causantes de enfermedades en humanos (bacterias, virus, protozoos y helmintos), los cuales se encuentran principalmente asociados con sólidos insolubles. Durante el proceso de tratamiento del agua residual, dichos sólidos son concentrados en un lodo y gracias a ello la carga microbiológica del agua residual disminuirá en tanto que la del lodo aumentará considerablemente. La lista de enfermedades causadas por patógenos detectados en agua residual y lodos derivados de su tratamiento es amplia e incluye la salmonelosis, disentería, gastroenteritis aguda, cólera, hepatitis, meningitis, neumonía, encefalitis, infecciones respiratorias, giardiasis, toxoplasmosis, entre muchas más (USEPA, 2003).

Si los lodos son depositados en el suelo sin recibir un tratamiento previo, el contacto directo o indirecto con este compuesto puede significar un potencial riesgo para la salud de las personas

Dicho riesgo puede estar mediado por:

- Contacto con el lodo
- Manipular el suelo acondicionado

- Consumir productos cosechados en esos suelos
- Consumir leche producida por vacas alimentadas con pastos que crecen en suelos acondicionados
- Ingestión de agua contaminada por la escorrentía del suelo acondicionado

### ***Enterovirus como parámetro de calidad de lodos***

Los enterovirus han sido considerados buenos representantes del resto de los virus entéricos y las normativas de calidad de lodos se han centrado en ensayos que determinen el conteo de partículas viables en cultivo de células (CETESB, 1991; USEPA, 2003).

El género *Enterovirus* pertenece a la familia *Picornaviridae*, familia que engloba virus de 20 a 30 nm de diámetro y genoma de ARN de simple hebra, con una simetría de cápside icosaédrica y sin envoltura (Racaniello, 2013).

El género *Enterovirus* comprende 4 especies de Enterovirus Humanos (Enterovirus A-E), una especie de Enterovirus Bovino, una Porcina (B), 3 especies de Rhinovirus Humanos (A-C) y una especie de Enterovirus Simio (A).

Los enterovirus han sido denominados de esta manera debido a que los mismos replican en el intestino delgado y se excretan en las heces, sin embargo, la lista de enfermedades causadas por los integrantes de dicho género trasciende el sistema digestivo, reconociéndose patologías asociadas a infecciones con diversos tropismos celulares (Pallansch et al. 2013).

Las 4 especies de Enterovirus humanos comprenden unos 100 tipos de los virus Coxsachievirus, Echovirus, Poliovirus y los propiamente dichos Enterovirus, los cuales representan en su conjunto un serio problema para la salud pública al causar millones de infecciones cada año, incluyendo brotes, algunos de los cuales de enfermedades graves que afectan especialmente a niños y jóvenes como ser meningoencefalitis, miocarditis, pancreatitis, entre otras dolencias.

Debido a la importancia del virus Polio como causante de una enfermedad tan compleja (Poliomielitis) en sus múltiples dimensiones como problema de salud pública, generalmente se realiza una diferenciación entre Poliovirus y "Enterovirus No Polio" para hacer referencia al resto de los Enterovirus humanos. Entre ellos encontramos a los Coxsachievirus (grupos A y B), los cuales en general ocasionan síntomas leves similares a la gripe, tratándose de infecciones que se auto-resuelven, aunque en algunos casos pueden ocasionar herpangina, enfermedad mano-pie-boca, y conjuntivitis hemorrágica aguda (los del grupo A), o pleurodinia,

99  
 W  
 M  
 A

miocarditis/pericarditis, y meningoencefalitis (los del grupo B). Algunas variantes de ambos grupos son capaces de producir meningitis, hepatitis y enfermedades respiratorias.

Por otro lado, los Echovirus son altamente infecciosos entre niños y presentan un amplio rango de presentaciones clínicas (parálisis, exantema, síndrome Guillain-Barré, enfermedad respiratoria, diarrea, pericarditis y miocarditis, enfermedad hepática), siendo la causa más frecuente de meningitis aséptica.

La mayoría de las infecciones por Poliovirus son asintomáticas y limitadas al tracto gastrointestinal, pudiendo diseminarse al Sistema Nervioso Central (principalmente en niños menores de 5 años), afectando a las motoneuronas y causando la parálisis característica de la Poliomiélitis (entre el 0,1 y 2% de las infecciones).

Por último, los Enterovirus numerados están asociados a cuadros como neumonía y bronquiolitis, conjuntivitis hemorrágica aguda, parálisis, meningoencefalitis, enfermedad de manos-pies y boca. Especialmente, algunos Enterovirus numerados, como el EV-68, el EV-70 y el EV-71 han cobrado relevancia en los últimos años al ser asociados a importantes brotes, alguno de ellos, como el caso del EV-71 relacionado a enfermedades graves como la parálisis causada por los virus Polio, por lo que se ha hablado del mismo como la pseudo-poliomiélitis del siglo XXI (Hernández, 2014)

Si bien las infecciones por Enterovirus ocurren en todo el mundo durante todo el año, se ha visto un incremento durante los meses de verano y otoño en países de climas templados, con una prevalencia mayor dentro de los niveles socio-económicos bajos cuyas condiciones de higiene y saneamiento son en general precarias (Pallansch et al. 2013).

Como muchos virus entéricos, los Enterovirus son transmitidos por la ruta fecal-oral y por la ruta respiratoria, pudiendo transmitirse fácilmente dentro de instituciones donde existen condiciones de hacinamiento, carencia de higiene o agua contaminada, dando lugar a brotes epidémicos (Pallansch et al. 2013).

### ***La presencia de Enterovirus en el ambiente***

Los enterovirus han sido detectados, cuantificados y su capacidad infectiva ensayada a partir del estudio de distintas matrices ambientales, principalmente matrices acuáticas. En tal sentido, hay estudios de enterovirus en agua superficial dulce y marina (Connel et al. 2012; Sassoubre et al. 2012; Allmann et al. 2013; Prevost et al. 2015), así como en agua de grifo (Kluge et al. 2014). Sin embargo, en función de que la vigilancia ambiental de la circulación de Poliovirus (salvajes y derivados vacunales)

se realiza por recomendación y directriz de la Organización Mundial de la Salud a partir de agua residual, varios estudios se han centrado también en la circulación de Enterovirus No Polio en dicha matriz (Vecchia et al. 2012; Battistone et al. 2014; Adeniji y Faleye, 2014; Ndiaye et al. 2014; Harvala et al. 2014; Nakamura et al. 2015). En cuanto al lodo, los enterovirus pueden ser de mucha utilidad al momento de evaluar la eficiencia de los distintos procesos de higienización de lodos ya que son más resistentes a algunos tratamientos que las bacterias convencionales. Pocos estudios han abordado el aislamiento y caracterización de Enterovirus a partir de su ocurrencia natural en muestras de lodo (Straub et al. 1994; Pourcher et al. 2005; Guzmán et al. 2007a), a pesar de ser capaces de persistir durante meses bajo condiciones ambientales favorables, como ser pH neutro, humedad, temperaturas bajas, especialmente en la presencia de materia orgánica, la cual los protege de la inactivación (USEPA, 2003).

#### ***Antecedentes del estudio de Enterovirus en Uruguay***

En Uruguay, existen estudios que asocian las neurovirosis pediátricas originados por enterovirus a genotipos pertenecientes a los enterovirus de la especie B hallándose Coxsachie virus de tipo A y B (CVA9, CVB2, CVB4, CVB1, CVB3, CVB5) así como varios Echovirus (E3, E4, E5, E6, E11, E13 y E18) (Recarey, 2011; Hernández, 2014). Sin embargo, se desconoce totalmente la presencia de otros grupos, los cuales podrían causar enfermedades distintas a la encefalitis y meningitis de origen viral (las cuales son de notificación obligatoria).

En cuanto a la circulación de Poliovirus, en 1978 fue el último caso de poliomielitis con aislamiento del virus salvaje en nuestro país, y la enfermedad se considera erradicada en nuestro territorio desde el año 1994. En el año 1989 hubo 3 casos de polio paralítica asociada a la vacuna (Cátedra de Enfermedades Infecciosas, 2014).

#### ***Situación en Uruguay con respecto a la utilización de lodos***

En nuestro país, la empresa estatal Obras Sanitarias del Estado (OSE) cuenta con numerosos sistemas de tratamiento de aguas residuales en distintas ciudades del territorio uruguayo, en donde se generan grandes cantidades de lodo como resultado de dicho proceso de tratamiento.

En cumplimiento del Decreto del Poder Ejecutivo N° 182/13 sobre la gestión ambientalmente adecuada de los residuos sólidos industriales y asimilados, OSE realizó un Plan de Gestión de Residuos Sólidos que fue entregado a DINAMA el 28 de



marzo de 2014 donde se definen las medidas de adecuación de la gestión de los residuos sólidos para un período de 5 años. Los criterios rectores del Decreto implican que la gestión de los residuos deberá priorizar la minimización de la generación en origen frente a cualquier otra alternativa, a su vez se deberán promover los procesos de reutilización, reciclado y otras formas de valorización de residuos, priorizándolos en este orden. La deposición final en vertedero deberá considerarse como opción en última instancia. En este marco OSE pretende adecuar la gestión de lodos de PTAR a prácticas de valorización, principalmente la aplicación como mejorador de suelo.

En cuanto a las características del residuo el mismo es clasificado como Categoría II (Decreto 182/13) debido a que los valores obtenidos para el test de lixiviación no superan los límites establecidos para ningún parámetro. Esta categorización permite evaluar la aplicación del lodo al suelo como alternativa de destino final. Si bien la Pauta Técnica que reglamentará la aplicación de residuos como mejoradores de suelo no se ha aprobado aún, los requisitos establecidos son utilizados como referencia. Dicha Pauta exige determinados valores límite de presencia de patógenos (coliformes fecales, *Salmonella sp.*, huevos de helmintos y virus entéricos) para que la aplicación del residuo sea posible (Tabla 1). OSE cuenta con medidas de los primeros tres parámetros de lodo fresco deshidratado de casi todas sus PTARs. Actualmente se está evaluando la presencia de los mismos en enmiendas generadas con lodos mediante procesos de higienización, así como en aplicación de lodos frescos en campo. Los procesos de higienización del lodo pueden darse mediante diversos mecanismos como encalado, desecación, compostaje, etc.

Hasta la fecha, no se ha realizado detección de virus entéricos en lodos de OSE, esto se debe a que en el país no existe el desarrollo y aplicación de las técnicas de identificación de virus para la matriz lodos, por lo que la caracterización de los lodos que OSE genera no ha podido ser completada y ello dificulta la utilización con fines agrícolas del lodo generado.

**Tabla 1.** Valores límite para presencia de patógenos en propuesta de Pauta Técnica Para el Uso de Residuos como Mejoradores de Suelo

<b>Parámetro</b>	<b>Límite</b>
Coliformes fecales	Menos a 1000 NPM por gramo de residuo base seca
<i>Salmonella sp</i>	Ausencia en 25 gramos de residuo base seca

Huevos de helmintos	Menos de 1 huevo de helmintos en 4 gramos de residuo base seca
Virus entéricos	Menor a 1 unidad de formación de placas en 4 g de residuos base seca

### **Relevancia**

El rápido crecimiento poblacional de los últimos años y la consecuente expansión urbana han aumentado la demanda agrícola, así como la necesidad de gestionar adecuadamente los residuos, a tal punto que la utilización de los residuos orgánicos para el mejoramiento de suelos agro cultivables comprende un interés mundial. Sin embargo, la utilización de lodos generados durante el tratamiento de las aguas residuales domésticas para mejorar el suelo puede acarrear varios problemas como ser la contaminación del mismo con microorganismos patogénicos, como por ejemplo virus, en caso de que dicha utilización no sea bien controlada y el tratamiento que reciba el lodo no sea el adecuado (Gilsanz et al. 2013).

Los suelos uruguayos han sufrido problemas de degradación, principalmente asociados a sistemas de agricultura continua y a la consecuente reducción del contenido de materia orgánica de los mismos. Distintos estudios documentan pérdidas de importantes fracciones de materia orgánica en suelos sometidos a sistemas hortícolas y agrícola-cerealeros (Díaz, 1994; García de Souza et al. 2011).

La aplicación de los lodos generados en PTAR en la producción agropecuaria provee numerosos beneficios al suelo al mejorar su porosidad y la infiltración y aumenta la resistencia a la erosión, además de aportar macro y micronutrientes y materia orgánica, lo que colabora en la mejora de las propiedades químicas y biológicas del suelo (Jorge et al., 1991; Marciano, 1999; dos Santos y Bettiol, 2003; Leoni y Ghini, 2006).

Sin embargo, procurar enmiendas que cumplan con los estándares nacionales e internacionales en cuanto al control de patógenos es de fundamental importancia para no exponer a los seres vivos que entran en contacto directo o indirecto con dicha matriz.

En este proyecto, se estandarizarán técnicas para el abordaje virológico de muestras de lodos generados en PTAR. A partir de estas técnicas se podrá evaluar si los lodos generados por OSE cumplen con la normativa requerida para la utilización de los



misimos con fines agrícolas, así como también se podrá evaluar la eficiencia del proceso de higienización del lodo mediante encalado.

A nivel epidemiológico, se generarán datos por primera vez en nuestro país acerca de la circulación de las distintas estirpes de enterovirus en el ambiente, en particular a partir del estudio de la matriz "lodos", lo cual permitirá una mejor comprensión de la epidemiología molecular de dicho género, ya que hasta el momento los estudios realizados en nuestro país están acotados a los casos clínicos de encefalitis/meningitis de origen viral de notificación obligatoria. A su vez, mediante técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos se buscará conocer las variantes de enterovirus que estén circulando en la población uruguaya.

Mediante el desarrollo de este proyecto será posible la implementación de metodologías adecuadas para la detección y cuantificación de virus entéricos en lodos con el fin de realizar un monitoreo de dichos patógenos y dar cumplimiento a la normativa actual. El desarrollo de estas técnicas permitirá complementar los estudios pilotos de proceso de higienización de lodos y de aplicación agrícola que OSE se encuentra desarrollando.

## ***Objetivos***

### ***Objetivo general***

Contribuir al conocimiento de la presencia de los Enterovirus en el ambiente de Uruguay mediante el estudio analítico de lodos generados en PTAR y lodo higienizado por encalado.

### ***Objetivos específicos***

1). Estandarizar técnicas en Uruguay previamente validadas a nivel internacional para el estudio molecular de enterovirus a partir de muestras de lodos generados en PTAR, así como a partir de enmiendas higienizadas.

A. Estandarizar procedimientos para colecta, transporte y almacenamiento de muestras de lodo para estudios virológicos.

B. Estandarizar un método para la concentración de virus presentes en lodos.

C. Estandarizar métodos de detección y cuantificación de partículas viables del género de enterovirus en lodos.

- 2). Monitorear mensualmente la presencia/viabilidad de enterovirus en los lodos y enmiendas higienizadas (lodo encalado) en una PTAR de OSE durante el periodo de un año.
- 3). Caracterizar molecularmente mediante análisis filogenético las distintas variantes de enterovirus detectadas durante el monitoreo de lodos.

## **Metodología**

### **Concentración viral a partir de lodos**

Será estandarizada la metodología de concentración de virus a partir de muestras de lodo según lo recomendado por USEPA con modificaciones (USEPA, 2003). Inicialmente la elución viral será realizada con una solución de extracto de carne al 10% para posteriormente filtrarlos con redes de 3, 0.45 y 0.2 micras. Finalmente, los virus serán concentrados mediante una floculación orgánica siguiendo el método descrito por Katzenelson et al. (1976).

### **Extracción del ARN viral y síntesis del DNAc**

El RNA viral será extraído a partir de 140  $\mu$ L de la muestra concentrada mediante la utilización del kit comercial "QIAamp® Viral RNA Mini Kit" (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La síntesis del ADN copia (ADNc) se realizará a partir de 10  $\mu$ L del ARN obtenido a partir de la extracción. La síntesis del ADNc será realizada utilizando cebadores hexaméricos randómicos (SBS Genetech Co., Ltd.) y la enzima Transcriptasa Reversa "RevertAid™" (Fermentas®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Detección y cuantificación de enterovirus por PCR en tiempo real**

La detección y cuantificación de enterovirus se realizará utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real con tecnología TaqMan®. Para la realización de las PCR cuantitativas se utilizará el kit "SensiMix™ II Probe Kit" (BIOLINE®) siguiendo las indicaciones del fabricante, y el termociclador "Rotor Gene Q" (Qiagen®). Se utilizará como molde 5  $\mu$ L del producto de la transcripción reversa con cebadores randómicos (detallada

anteriormente) conteniendo el ADNc. Estos serán añadidos al mix de PCR el cual contendrá 12,5  $\mu$ L de 2X "SensiMix™ II Probe Kit" en una concentración final de 1X, 10  $\mu$ M de cebadores EV-rtF y EV-rtR (a una concentración final de 800 nM), 10  $\mu$ M de sonda (a una concentración final de 400 nM). Para cada reacción se agregará el volumen de agua estéril libre de nucleasas (AMRESCO®) necesario para llevar la reacción a un volumen final de 25  $\mu$ L (Oberste et al. 2010).

### **Caracterización molecular**

Para realizar la caracterización molecular, inicialmente se realizará una semi-nested PCR con iniciadores direccionados a la proteína VP1 de la cápside de los enterovirus (Nix et al. 2006) para aquellas muestras que resulten positivas por PCR en tiempo real. Posteriormente se procederá a purificar el amplicon con el kit "AxyPrep™ DNA Gel Extraction kit" (AXYGEN®) directamente del gel de agarosa siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos de PCR purificados serán enviados al Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo para obtención de su secuencia de ADN.

Posteriormente será utilizado el programa SeqMan™ (DNASTar Incorporated) para ensamblar y editar las secuencias obtenidas. El alineamiento de las mismas y la reconstrucción filogenética se realizará utilizando el programa MEGA versión 5 (Tamura, et al., 2011) y la distancia genética se calculará mediante el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2 Parámetros, utilizando el método de "Neighbor-Joining" con "*bootstrap*" de 1000 réplicas.

Las secuencias de las cepas prototipo de los diferentes genotipos de enterovirus serán obtenidas de la base de datos Genbank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

### **Cuantificación de enterovirus por cultivo celular**

La cuantificación de enterovirus por cultivo celular será realizada siguiendo el protocolo descrito por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004). Para esta cuantificación se inocularán 200  $\mu$ L de la muestra previamente concentrada en células RD derivadas de un rhabdomyosarcoma humano en botellas de cultivo celular de 25 mL. Se incubarán estas botellas en estufas a 36 °C durante una semana con observaciones en microscopio cada 24 horas. El efecto citopático de enterovirus es observado en microscopio cuando las células se presentan en suspensión arredondeadas y refráctiles.

### **Resultados esperados**

**Objetivo específico 1:** Al cumplir este objetivo habremos estandarizado en nuestro laboratorio las técnicas y procedimientos necesarios para poder evaluar la calidad virológica de lodos generados en PTAR así como de lodos encalados de acorde a los estándares de la normativa actual. Se habrá acordado con OSE un protocolo de colecta y transporte de muestras, y se habrá estandarizado un método para concentración de enterovirus presentes en lodos. Ello permitirá posteriormente, estandarizar métodos de detección y cuantificación de enterovirus viables en dicha matriz, los cuales serán imprescindibles para cumplir con los objetivos específicos siguientes.

**Objetivo específico 2:** Este objetivo posibilitará conocer la diferencia entre los lodos y sus enmiendas higienizadas en cuanto a la presencia de partículas viables de enterovirus en dichas muestras. Se podrá comparar la efectividad del proceso de higienización mediante encalado en la reducción de enterovirus. Podremos evaluar si dicha enmienda cumple con los valores virales exigidos por la normativa.

**Objetivo específico 3:** Por medio de la caracterización molecular de los virus tendremos definidos los genotipos de las estirpes virales presentes en las muestras obtenidas en el monitoreo y podremos conocer de manera indirecta las estirpes virales que circulan en la población de la ciudad donde la PTAR está localizada.

### **Antecedentes del equipo de trabajo**

El Laboratorio de Virología Molecular (LVM) del CENUR Litoral Norte de la Universidad de la República (UdelaR) instalado en el 2010 ha desarrollado la línea de investigación en Virología Ambiental mediante el aporte de distintos proyectos y colaboraciones, lo cual ha permitido la estandarización, evaluación y perfeccionamiento de diversas metodologías para el abordaje de virus en matrices ambientales acuáticas. También ha generado información sobre la presencia de los principales virus entéricos en el ambiente uruguayo, ha formado recursos humanos a nivel de grado y posgrado (maestría y doctorado) en temas de virología ambiental los cuales hoy participan de manera activa en la ejecución de nuestros proyectos.

El LVM realizó un estudio donde fue determinado el grado de contaminación de las aguas residuales no tratadas y tratadas, con virus de origen humano que son vertidas al Río Uruguay. En este estudio se colectaron y analizaron muestras de aguas residuales provenientes de cuatro ciudades del litoral uruguayo: Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos donde fue evidenciada una alta contaminación por Rotavirus, Norovirus y Astrovirus (Victoria et al. 2014).

También se realizó un estudio de detección, cuantificación y caracterización molecular de virus entéricos en aguas residuales no tratadas y tratadas en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales localizadas en las ciudades de Melo, Treinta y Tres, Canelones y Ecilda Paullier. Este estudio fue realizado en colaboración con la Sección Virología de la Facultad de Ciencias (UdelaR) y con el Laboratorio Central de la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE) y constó con el apoyo financiero de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC). Fue evidenciada una elevada frecuencia de Rotavirus, Norovirus y Picobirnavirus principalmente en los afluentes de las plantas de tratamiento observándose una disminución tanto en la frecuencia como en la concentración viral a lo largo del proceso del tratamiento. Estos resultados resaltan la importancia del tratamiento del agua residual para la descarga de efluentes con menor contenido de virus entéricos a diferentes cuerpos de aguas ambientales. El proyecto fue evaluado como exitoso por parte de las autoridades de OSE así como por la contraparte universitaria, y sus resultados fueron compartidos y discutidos durante el Primer Encuentro Nacional de Técnicos de Saneamiento organizado por OSE en 2014.

### ***Cronograma de ejecución***

Actividad	2do sem. 2016	1er sem. 2017	2do sem. 2017	1er sem. 2018
Estandarizar metodologías para el análisis de los enterovirus en lodos	X			
Colectas mensuales		X	X	
Detección y cuantificación viral		X	X	
Caracterización molecular			X	
Informe semestral	X	X	X	X
Redacción y publicación de trabajo científico				X

Presentación de resultados finales a OSE				X
--	--	--	--	---

### **Bibliografía**

- Adeniji, J.A., Faleye, T.O. (2014) Isolation and identification of enteroviruses from sewage and sewage-contaminated water in Lagos, Nigeria. *Food and Environmental Virology*, 6(2), p.75-86.
- Allmann, E., Pan, L., Li, L., Li, D., Wang, S., Lu, Y. (2013) Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. *Journal of Virological Methods*, 193(2), p.327-331.
- Battistone, A., Buttinelli, G., Fiore, S., Amato, C., Bonomo, P., Patti, A.M., Vulcano, A., Barbi, M., Binda, S., Pellegrinelli, L., Tanzi, M.L., Affanni, P., Castiglia, P., Germinario, C., Mercurio, P., Cicala, A., Triassi, M., Pennino, F., Fiore, L. (2014) Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), p.4491-4501.
- Cátedra de Enfermedades Infecciosas (2014) Poliovirus. Epidemiología y Presentación ([infectologia.edu.uy](http://infectologia.edu.uy)). Facultad de Medicina. Universidad de la República. Presentación de las Dras. Noelia Sorondo y Victoria Frantchez.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (1991) NORMA TÉCNICA: Identificação de enterovirus: método de ensaio.
- Connell, C., Tong, H.I., Wang, Z., Allmann, E., Lu, Y. (2012) New approaches for enhanced detection of enteroviruses from Hawaiian environmental waters. *PLoS One*, 7(5).
- Díaz, R. (1994). Cambios en el largo plazo en el carbono y nitrógeno del suelo bajo rotación de cultivos con pasturas de leguminosas. En: Morón, A., Walter, E., Baethgen, R.M., Díaz Rossello [Eds.]. *Materia orgánica en la rotación cultivo-pastura*. Montevideo: INIA. (Serie Técnica 41).
- Dos Santos, I., Bettiol, W. (2003) Effect of sewage sludge on the rot and seedling damping-off of bean plants caused by *Sclerotium rolfsii*. *Crop protection*, (22), p.1093-1097.



- García de Souza, M., Alliaume, F., Mancassola, V., Dogliotti, S. (2011) Carbono orgánico y propiedades físicas del suelo en predios hortícolas del sur de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), p.70-81.
- Gilsanz, J. C., Leoni, C., Schelotto, F., Acuña, A. (2013) Uso potencial de los lodos urbanos en la producción agrícola. *Agrociencia Uruguay*, 17(2), p.1-10.
- Guzmán, C. Jofre, J. Montemayor, M. Lucena, F. (2007a) Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), p.2420-2429.
- Harvala, H., Calvert, J., Van Nguyen, D., Clasper, L., Gadsby, N., Molyneaux, P., Templeton, K., McWilliams Leitch, C., Simmonds, P. (2014) Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. *European Surveillance*, 19(15).
- Hernández, E. (2014) Tipificación de Enterovirus No Polio Comunitarios Causantes de Neurovirosis en Niños Uruguayos". Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias UdelaR.
- Jorge, J.A., Camargo, O.A., Valladares, J.M.A.S. (1991) Condição físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro quatro anos após aplicação de lodo de esgoto e calcário. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 15, p.237-240.
- Katzenelson, E., Fattal, B., Hostovesky, T. (1976) Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(4), p.638-639.
- Kluge, M., Fleck, J.D., Soliman, M.C., Luz, R.B., Fabres, R.B., Comerlato, J., Silva, J.V., Staggemeier, R., Vecchia, A.D., Capalonga, R., Oliveira, A.B., Henzel, A., Rigotto, C., Spilki, F.R. (2014) Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *Journal of Water and Health*, 12(3), p.526-532.
- Leoni, C., Ghini, R. (2006) Sewage sludge effect on management of *Phytophthora nicotianae* in citrus. *Crop Protection*, (25), p.10-22.
- Marciano, C.R. (1999) Incorporação de resíduos urbanos e as propriedades físico-hídricas de um Latossolo Vermelho-Amarelo [Tesis doctorado]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz». Universidade de Sao Paulo.
- Nakamura, T., Hamasaki, M., Yoshitomi, H., Ishibashi, T., Yoshiyama, C., Maeda, E., Sera, N., Yoshida, H. (2015) Environmental surveillance of poliovirus in sewage

water around the introduction period for inactivated polio vaccine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), p.1859-1864.

Ndiaye, A.K., Diop, P.A., Diop, O.M. (2014) Environmental surveillance of poliovirus and non polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). *Pan African Medical Journal*, 19(243).

Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(8):2698-704.

Oberste MS, Peñaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol*. 2010; 49(1):73-4.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2004). *Polio laboratory manual*, 4<sup>th</sup> edition.

Pallansch, M.A., Oberste, S.M., WHITTON, J.L. (2013) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. En *Fields virology*, Capítulo 17. Editado por Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia.

Pourcher, A.M., Morand, P., Picard-Bonnaud, F., Billaudel, S., Monpoeho, S., Federighi, M., Ferré, V., Moguedet, G. (2005) Decrease of enteric microorganisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), p.528-539.

Prevost, B., Lucas, F.S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., Wurtzer, S. (2015) Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International*, (79), p.42-50.

Racaniello, V. R. (2013) Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. En *Fields virology*, Capítulo 16. Editado por Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia.

Recarey, R. (2011) Variabilidad genética de Enterovirus asociados a Encefalitis Pediátricas. Tesis de Maestría en Biología. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). Universidad de la República.

Sassoubre, L.M., Love, D.C., Silverman, A.I., Nelson, K.L., Boehm, A.B. (2012) Comparison of enterovirus and adenovirus concentration and enumeration methods in seawater from Southern California, USA and Baja Malibu, Mexico. *Journal of Water and Health*, 10(3), p.419-430.

Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (1994) Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested

Handwritten marks on the left margin, including a large 'S' and several arrows pointing to the right.

sludge using the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(10), p.884-888.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011 Oct;28(10):2731-9.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 2003 Environmental Regulations and Technology Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge.

Vecchia, A.D., Fleck, J.D., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Da Silva, J.V., Da Luz, R.B., Teixeira, T.F., Garbinatto, G.N., Oliveira, D.V., Zanin, J.G., Van der Sand, S., Frazzon, A.P., Franco, A.C., Roehe, P.M., Spilki, F.R. (2012) First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 72(2), p.323-329.

Viau, E., Bibby, K., Paez-Rubio, T., Peccia, J. (2011) Toward a consensus view on the infectious risks associated with land application of sewage sludge. *Environmental Science and Technology*, 45(13), p.5459-5469.

Victoria, M., Tort, L.F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R. (2014) Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6(2), p.116-124.