



Tesina de graduación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Título del Proyecto: “Identificación e Investigación de virus gastroentéricos en la cuenca del Río Uruguay”

Estudiante: Mariana García Britos

Orientador: Dr. Rodney Colina

Co-orientador: MSc. Fernando López Tort

Laboratorio de Virología Molecular,

Regional Norte

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Agradecimientos:

A Rodney, Fernando y Matías Victoria, que estuvieron firmes acompañándome, enseñándome y guiándome activamente en mi camino de iniciación en la investigación.

A Andrés por su ayuda incondicional.

A Matías Castells, Leticia, María José y Luciana por su disposición para conmigo y su compañerismo que me hizo sentir tan parte del grupo.

A todo el equipo de funcionarios docentes y no docentes de la Regional Norte, que colaboraron positivamente con mi trabajo del día a día así como en mi inserción en la nueva institución.

A TODO el Hogar Universitario de Salto por el buen trato, la disposición, el compañerismo y la colaboración para que lograra cumplir mis metas.

A la ANII por la beca de iniciación a la investigación, que fue crucial para poder realizar mi tesis en un laboratorio que se encuentra en el interior del país.

A Facultad de Ciencias por brindar y sustentar tan maravillosa carrera.

Al equipo del laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Nucleares que siempre estuvo dispuesto a brindar una mano.

A Genética, Bioquímica y Físicoquímica Biológica de Facultad de Ciencias y al Institut Pasteur que con muy buena voluntad nos prestaron sus instalaciones para desarrollar parte de mis experimentos.

Al equipo de FioCruz que en las instancias de intercambio nos brindaron desinteresadamente todo su conocimiento.

A mi FAMILIA que siempre está y me apoya cualquiera sea el camino que yo haya decidido hacer.

A todos mis amigos, que me han dado palabras de aliento y apoyo para culminar esta tesis.

Resumen:

Los análisis virológicos de aguas superficiales son esenciales para evaluar el potencial riesgo de infección y eficiencia de procesos de desinfección y tratamiento de aguas residuales. La identificación y clasificación mediante técnicas de biología molecular de Rotavirus (RV), Norovirus (NV) y Enterovirus (EV), permiten determinar el grado de contaminación de las aguas y aportar datos epidemiológicos al país y la región. Los RV, NV, EV, causan diarreas y son vertidos directamente al río en altos títulos a través de las redes cloacales. La vía de transmisión de estos agentes es “fecal-oral” y persisten activos en el ambiente durante días e incluso meses bajo condiciones adversas; teniendo la capacidad de infectar a un nuevo huésped con solo 10 partículas virales. Los EV pertenecen a la familia *Picornaviridae*, poseen un genoma ARN simple hebra de sentido positivo y una elevada variabilidad genética y carecen de envoltura. Se transmiten por contacto persona-persona, ingestión de agua o alimentos contaminados. Los Rotavirus (RV) pertenecen a la familia *Reoviridae*, poseen un genoma constituido por 11 segmentos de ARN de doble hebra y una elevada variabilidad genética. Los RV del grupo A (RVA) son el principal agente etiológico causante de diarreas severas en los niños menores de cinco años de edad en todo el mundo. Los Norovirus (NV) pertenecen a la familia *Caliciviridae*, son virus desnudos, cuyo genoma está constituido de una única molécula de ARN de sentido positivo. Poseen un muy elevado grado de variabilidad genética producto de mutaciones y recombinación genética. Se clasifican en 5 genogrupos, y cada uno de ellos posee un número creciente de genotipos. Son el agente causal más importante de brotes de gastroenteritis afectando a todas las franjas etarias. Recientemente estudios desarrollados en países de la región y otros, han demostrado la circulación de RVA, NV y EV en aguas residuales que son vertidas a ríos. Sin embargo, en nuestro país no existen al día de hoy datos que determinen el grado de contaminación de nuestros principales cursos de agua, ni tampoco una correlación entre las estirpes que afectan las distintas poblaciones y las que se encuentran en el ambiente.

El objetivo general del presente estudio fue determinar por primera vez la presencia de RVA, NV y EV, en cuatro puntos de colecta sobre el río Uruguay, durante el período de un año, donde se eliminan aguas residuales: Fray Bentos (33° 7'8.95"S 58°20'3.38"O), Paysandú (32°19'38.38"S 58° 6'3.83"O), Salto (31°23'45.97"S 57°58'57.70"O) y Bella Unión (30°16'3.55"S 57°36'15.83"O). Los objetivos específicos fueron: 1) Desarrollo de metodologías para concentración de virus en aguas; 2) implementación de las técnicas de transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de RVA, NV y EV; 3) Luego documentar la prevalencia de RVA, NV y EV en distintos puntos altamente poblados del río Uruguay; 4) realizar estudios filogenéticos para RVA y NV, a fin de conocer las estirpes que circulan durante cada período estacional, establecer su genotipo o la existencia de nuevas variantes genéticas.

Se realizó un muestreo durante el período de un año, de manera quincenal; desde marzo de 2011 a febrero de 2012. Fue optimizada la metodología de ultracentrifugación para realizar la concentración viral a partir de muestras de aguas residuales.

La utilización del fago PP7 como control interno fue adecuada para validar: la concentración viral por la técnica de ultracentrifugación, la extracción de ARN y la respectiva RT-PCR.

Fueron estandarizadas las metodologías de detección y cuantificación de RVA, NV.

Fueron estandarizadas las metodologías cuantificación de EV. Fue observada, por primera vez en el Río Uruguay, una amplia circulación de virus entéricos: RVA, NV y EV, estando presentes en la mayoría de las colectas, principalmente en Paysandú.

RVA fue el más prevalente, con 48,5 %, seguido de EV con un 41,6%; de NVGII con un 39,4% y finalmente NV GI con solo 21%.

El presente estudio es el primer reporte que demuestra el alto grado de contaminación de aguas residuales por los RVA, NV y EV vertidas directamente sobre el río Uruguay evidenciando el riesgo de infección de las personas que entran en contacto directo con las aguas de este río ya sea para recreación o consumo.

Palabras-clave: Río Uruguay, Epidemiología, Virus Gastroentéricos, Virología Ambiental

Índice

Abreviaturas.....	7
1 Introducción.....	8
1.1 Antecedentes.....	8
1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	11
1.2.1 Enterovirus.....	11
1.2.2 Norovirus.....	12
1.2.3 Rotavirus.....	13
1.3 Justificación.....	14
1.4 Características generales de rotavirus.....	17
1.4.1 El virus: historia y estructura.....	17
1.4.2 Patología e inmunidad.....	19
1.4.3 Transmisión.....	20
1.4.4 Clasificación.....	21
1.4.5 Evolución molecular.....	22
1.4.6 Epidemiología.....	23
1.4.7 Virología Ambiental.....	26
1.5 Características generales de Norovirus.....	26
1.5.1 Historia: el virus y estructura.....	26
1.5.2 Patología e inmunidad.....	28
1.5.3 Transmisión.....	29
1.5.4 Clasificación.....	29
1.5.5 Evolución Molecular.....	30
1.5.6 Epidemiología.....	32
1.5.7 Virología Ambiental.....	35
1.6 Enterovirus.....	36
1.6.1 El virus: historia y estructura.....	36
1.6.2 Clasificación.....	37
1.6.3 Patología e inmunidad.....	39
1.6.4 Transmisión.....	41
1.6.5 Evolución molecular.....	42
1.6.6 Epidemiología.....	43
1.6.7 Virología ambiental.....	48
2 Objetivos.....	50
2.1 Objetivo General.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3. Materiales y métodos.....	51
3.1 Obtención de muestras.....	51
3.2 Concentración Viral.....	51
3.3 Control Interno.....	51
3.4 Extracción del ARN viral.....	51
3.5 Síntesis del ADN copia (ADNc), Transcripción Reversa.....	51
3.6 Detección mediante PCR cualitativa.....	51
3.6.1 Detección del PP7 por PCR cualitativa.....	51

3.6.2 Detección de RVA por RT-PCR cualitativa.....	52
3.6.3 Detección de NV GI y GII por PCR cualitativa.....	53
3.7 Productos de PCR enviados a secuenciación.....	54
3.8 Electroforesis en geles de agarosa.....	54
3.9 Purificación y secuenciación.....	55
3.10 Cuantificación viral mediante PCR en Tiempo Real.....	55
3.10.1 Cuantificación de RVA.....	55
3.10.2 Cuantificación de EV.....	55
3.10.3 Cuantificación de NV GI y GII.....	56
3.11 Estandarización de las PCR cuantitativas.....	56
3.12 Análisis Filogenético.....	57
4.Resultados.....	58
4.1 Desarrollo de metodologías para concentración de virus en aguas.....	58
4.2 Implementación de RT-PCR para detección de RV y NV y puesta a punto de cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) para RV, EV y NV.....	58
4.3 Análisis de presencia viral en muestras del Río Uruguay en 4 puntos de colecta entre marzo de 2011 y febrero de 2012.....	64
4.3.1 Análisis de positividad viral en el año.....	67
4.3.2 Análisis de positividad de cada virus en cada punto de colecta.....	67
4.3.3 Análisis de estacionalidad según el virus durante el muestreo completo.....	68
4.3.4 Análisis de estacionalidad de los virus en el Río Uruguay en el año.....	71
4.3.5 Análisis de estacionalidad de RVA, NVGI, NVGII y EV según el punto de colecta.....	72
4.3.6 Análisis de frecuencia de cocirculaciones de los tres virus de estudio en las muestras de todo el año.....	75
4.3.7 Análisis de diversidad genética de RVA hallada en el Río Uruguay.....	76
4.4 Análisis filogenético de la diversidad genética de RVA, NVGI y NVGII hallada en el Río Uruguay.....	76
4.4.1 Análisis filogenético del gen VP7 de RVA.....	78
4.4.2 Análisis filogenético del gen VP4 de RVA.....	80
4.4.3 Análisis filogenético de la cápside de NVGI.....	82
4.4.4 Análisis filogenético de la cápside de NVGII.....	84
5Discusión.....	86
6-Conclusiones y Perspectivas.....	94
7-Bibliografía.....	95

Abreviaturas

aa Aminoácidos
ADN Acido Desoxirribonucleico
ADNc Acido Desoxirribonucleico copia
AdV Adenovirus
AIC Criterio informativo de Akaike
AsV Astrovirus
ARN Acido Ribonucleico
ARNm Acido Ribonucleico mensajero
DEPC Dietilpirocarbonato
DINAMA Dirección Nacional de Medio Ambiente
dNTPs Desoxinucleotidos trifosfato
EV Enterovirus
HAV Virus de la Hepatitis A
ICC-PCR Cultivo celular integrado a PCR (Integrated Cell Culture- PCR)
Kb Kilobases
KDa Kilodalton
M Molar
mM Milimolar
min Minutos
NCR Region no codificante
nm Nanometro
NV Norovirus
NSP Non Structural Protein
ORF Marco Abierto de Lectura (Open Reading Frame)
OSE Obras Sanitarias del Estado
qPCR PCR en tiempo real
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
PVC Parvovirus Canino
PV Poliovirus
RT Transcripción Reversa
RVA Rotavirus tipo A
VPs Viral Proteins

1- INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

El agua es una sustancia esencial para la existencia de la vida en la Tierra. Debido a sus características físico-químicas permite la difusión de sustancias, organismos y microorganismos., las/los cuales pueden generar un riesgo para la salud humana, animal y vegetal. A nivel mundial, las enfermedades infecciosas en humanos asociadas con el agua son una causa importante de morbilidad y mortalidad (figura 1) (Lewin *et al.*, 2007; Fenwick A *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 1997). Algunos estudios han estimado a nivel global que el 4 % de las muertes y el 5,7% de la tasa mundial de morbilidad eran atribuibles a un pequeño subconjunto de enfermedades causadas por agentes infecciosos relacionados con el agua, saneamiento e higiene tales como: diarreas, esquistosomiasis, tracoma, ascariasis, tricuriasis y anquilostomiasis (Lewin *et al.*, 2007; Kosek *et al.*, 2003; Pruss *et al.*, 2002). Existen aproximadamente 1400 especies de organismos infecciosos patógenos que afectan la salud de nuestra especie, de los cuales 348 son vehiculizados por vía hídrica causando 115 enfermedades diferentes. Su distribución a nivel global permanece ampliamente inexplorada (Taylor *et al.*, 2001)

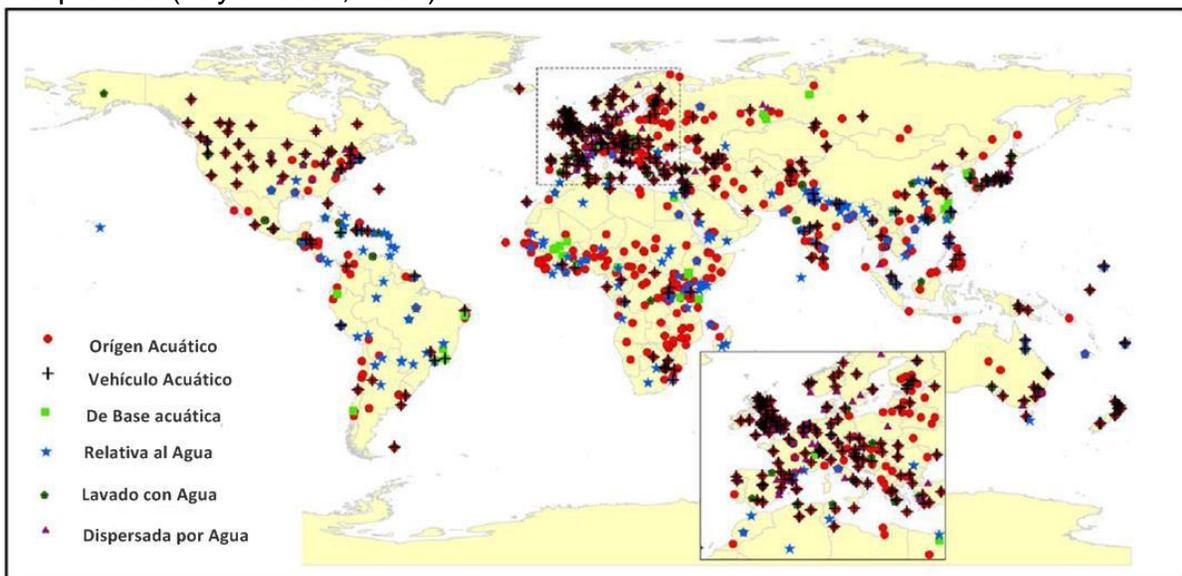


Figura 1- Distribución de brotes reportados de enfermedades de transmisión y dispersión hídrica desde 1991 a 2008(Adaptado: Yang *et al.*, 2012).

Paralelamente, se ha creado una concientización a nivel mundial sobre el impacto creciente en la salud humana, medido a través de su morbilidad y mortalidad, de enfermedades producidas por la baja calidad sanitaria del agua de consumo. Más de

2.2 millones de personas mueren anualmente debido a las mencionadas causas, principalmente en países en desarrollo (Miagostovich *et al.*, 2008).

El agua puede contaminarse con diversos patógenos provenientes de heces de origen humano y/o animales, las cuales son eliminadas a través de diversas fuentes: vertido de efluentes desde plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas, aguas residuales de centros de cría intensiva de ganado, escorrentía agrícola y urbana, infraestructuras de recolección de aguas residuales y sistemas sépticos defectuosos o en mal estado (EPA, 2005). Luego de producida la contaminación del agua, el ser humano se puede infectar a través de diferentes vías: consumo directo de agua, actividades recreativas, consumo de alimentos sin procesar tales como mariscos, frutas y vegetales contaminados a través del riego (Reynolds *et al.*, 2008; Sair *et al.*, 2002).

La diarrea causa 1.3 millones de muertes en niños menores de 5 años de edad cada año (Black *et al.*, 2010). Países en el sur de Asia y de África-subsaariana tienen altas tasas de mortalidad causadas por esta enfermedad. La Organización de las Naciones Unidas (ONU) pretende reducir la tasa de mortalidad infantil en dos tercios hacia 2015. En los países en desarrollo la transmisión de los patógenos se produce principalmente a través de la ingesta de alimentos o agua de consumo contaminadas, siendo los responsables directos de la mayoría de las enfermedades las bacterias y virus (Podewils *et al.*, 2004). Los niños menores de 5 años de edad en estos países tienen una media de tres episodios de diarrea al año (Kosek *et al.*, 2003; Santosham *et al.*, 2011).

Los virus entéricos humanos infectan y se replican en toda la extensión del tracto gastrointestinal. Los virus entéricos de gran importancia para la salud humana son: Adenovirus (AdV), Astrovirus (AsV), Norovirus (NV), Virus de Hepatitis E (HEV), Parvovirus Canino (PVC) (Phan *et al.*, 2012), Enterovirus ((EV) Coxsackie virus, Echovirus y Poliovirus), Virus de la Hepatitis A (HAV) y Rotavirus A (RVA) (Carter 2005; Bosch *et al.*, 1998). Los pacientes que sufren de gastroenteritis o hepatitis viral pueden excretar de 10^5 a 10^{11} partículas virales por gramo de heces. Por lo tanto, las concentraciones de virus entéricos en aguas no tratadas contaminadas con materia fecal frecuentemente son muy elevadas y teniendo en cuenta que la dosis infectante de estos virus es muy baja, la probabilidad que tienen de dispersarse e infectar un individuo susceptible es realmente alta (Li *et al.*, 1998; Okoh *et al.*, 2010).

Algunos de los virus mencionados logran estar presentes incluso luego del procesamiento de las aguas residuales en una planta de tratamiento. Los procesos de tratamiento de aguas residuales tales como: lodos activados, lagunas de oxidación, tratamiento con carbón activado, filtración, coagulación con cal y cloración, eliminan entre 50% y 90% de los virus presentes en las aguas residuales (Cloete *et al.*, 1998), permitiendo así que una carga viral significativa sea liberada en los efluentes (Okoh *et al.*, 2010).

En la región existen importantes antecedentes de detección de RVA, NV y EV en aguas residuales. En la ciudad de San Pablo, Brasil, en el año 1993 (Mehnert *et al.*, 1993), se realizó el primer estudio de la región donde detectaron RVA en 20% y 34% de las muestras de desagües de hogares y arroyos, respectivamente. Posteriormente, en la ciudad de Manaus, Brasil, (Miagostovich *et al.*, 2008) se estudió la contaminación por virus entéricos en riachuelos utilizados para recreación por los habitantes de la zona. El 44% de las muestras fueron positivas para RVA, seguido de porcentajes menores por AdV y NV. Interesantemente, en la mayoría de estas aguas contaminadas por virus entéricos no fue evidenciada la contaminación fecal por medio de los indicadores bacterianos. En un estudio realizado en 2009 se evaluó la presencia de NV en afluentes y efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales en la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil. Estos virus fueron detectados en 53% de las muestras analizadas, tanto en la entrada como en la salida de la planta, comprobando así la baja remoción viral realizada por los métodos de tratamiento de aguas residuales (Victoria *et al.*, 2010). Con respecto a los EV, en 1998, en la ciudad de Tucumán, Argentina, se analizaron muestras de barro residual de una planta de tratamiento de aguas residuales detectando EV en cultivo celular en 5 de 12 muestras analizadas (42%), (Caillou *et al.*, 1998).

En la ciudad de Córdoba, Argentina, se realizó un estudio que permitió determinar la circulación de Poliovirus (PV) en el ambiente mediante la recolección semanal de muestras de agua residual en poblaciones con vacuna oral (OPV) y vacuna inactivada (IPV) por el período de un año (Mueller *et al.*, 2009). Previamente, en 1991 en Colombia, fue detectado el PV tipo 1 salvaje en el 21% de las muestras de aguas residuales de la ciudad de Cartagena (Tambini *et al.*, 1993). Luego en 2006, también en Colombia, en la ciudad de Armenia, se realizó un amplio estudio en muestras de agua residual de un acueducto asociado a una población de 350000 habitantes (González *et al.*, 2006). Detectaron Poliovirus tipo 1 y 3 vacunal en 83% de las muestras analizadas. En cuanto a los trabajos realizados en Brasil, existe poca información sobre la detección ambiental de EV. En 2010, en la ciudad de Florianópolis, se detectó PV en 92% de las muestras de lodo residual activo y en efluentes tratados en una planta de tratamiento de agua residual (Schlindwein *et al.*, 2010). En el mismo año, EV fue detectado en 64% de las muestras de agua del Arroyo Dilúvio en la ciudad de Porto Alegre (Vecchia *et al.*, 2012).

El monitoreo de la calidad del agua en la ciudad de Montevideo es realizado por la Intendencia Municipal de Montevideo, mientras que a nivel nacional es realizado por Obras Sanitarias del Estado (OSE) en colaboración con la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), en el cual participan una red privada y pública de laboratorios especializados. Son monitoreadas las playas costeras, la cuenca del Río Santa Lucía y particularmente la zona de Fray Bentos en torno a UPM (United Paper Mills). Los controles específicos realizados, incluyen diversos controles físicos así como detectar la presencia de productos químicos tales como cloros, nitratos y metanos. Sin embargo, los únicos agentes de orden microbiológico que se encuentran bajo control son los coliformes totales y termo tolerantes, quedando excluidos del monitoreo los

virus y los parásitos (OSE 2010). Esta situación determina que actualmente no exista ningún conocimiento acerca de la circulación de los virus entéricos en aguas ambientales en nuestro país, tales como aguas de consumo, de recreación y residuales., constituyendo así un riesgo importante para la salud de la población y la contaminación del medio ambiente.

1.2 Propiedades físico-químicas

En el marco de éstas tesis se han estudiado RVA, NV y EV, los cuales poseen características físico-químicas particulares, que los hacen muy resistentes a condiciones extremas de temperatura, PH, así como frente a sustancias químicas tales como el cloro, condiciones todas ellas que inactivan normalmente a la mayoría de microorganismos incluyendo una vasta y variada cantidad de virus. A continuación se pasan a describir para cada uno de los mencionados virus involucrados en nuestros estudios, las principales características físico-químicas estudiadas hasta el momento.

1.2.1 Enterovirus

Los EV se distinguen de otros Picornavirus teniendo en cuenta las propiedades físicas, tales como densidad de flotación en cloruro de cesio y su estabilidad en ácido débil. Muchos aspectos de la patología causada por EV, la transmisión y epidemiología están directamente relacionados con las propiedades biofísicas y su ciclo de replicación citolítico. El virus infeccioso es relativamente resistente a muchos desinfectantes comunes en el laboratorio, incluyendo etanol 70%, isopropanol, Lysol diluido, y compuestos de amonio cuaternario. El virus es insensible a los disolventes de lípidos, incluyendo éter y cloroformo y es estable en muchos detergentes a temperatura ambiente. El formaldehído, glutaraldehído, ácido fuerte, hipoclorito de sodio y el cloro libre de residuos logran inactivar a los EV. La concentración, el pH, materiales orgánicos extraños y tiempo de contacto, afectan el grado de inactivación por estos compuestos. Inactivaciones similares se logran cuando el virus está presente en fómites, aunque las condiciones no sean exactamente comparables (Abad *et al.*, 1997). Los EV son relativamente termoestables, pero menos que el virus de la hepatitis A. La mayoría de los EV se inactiva fácilmente a 42 °C, aunque algunos agentes los pueden estabilizar de manera que los virus son relativamente estables a 50 °C (Ackermann *et al.*, 1970; Dorval *et al.*, 1989). El proceso de inactivación térmica parece implicar varios pasos que culminan en la liberación irreversible de ARN a partir de los viriones alterados. La sensibilidad relativa a elevaciones modestas en la temperatura hace posible el uso de pasteurización para inactivar EV en muchas preparaciones biológicamente activas (Hilfenhaus *et al.*, 1994).

Como con otros agentes infecciosos, la luz ultravioleta puede ser utilizada para inactivar EV, particularmente en las superficies. Además, el proceso de secado en las superficies reduce significativamente los títulos de virus. El grado de pérdida por secado del virus está relacionado con la porosidad de las superficies y la presencia de material orgánico (Abad *et al.*, 1994).

Muchos estudios de la inactivación de EV se han realizado utilizando a PV como un EV modelo. Un informe que describe diferencias cepa-específicas para la inactivación por glutaraldehído entre aislamientos de EchV 25 implica, sin embargo, que el supuesto de que PV es representativo de todos los EV no puede ser válido (Chambon *et al.*, 1994). La inactivación de la infectividad no puede ser directamente relacionada con la destrucción del genoma viral, debido a que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar para amplificar ARN viral, incluso después de que la inactivación del virus se ha producido (Ma *et al.*, 1994). Esto sugeriría que la reactivación de la infectividad puede ser posible en algunas circunstancias. De hecho, algunos ejemplos de recuperación en la infectividad se han informado a través de la multiplicidad de infección en el cultivo (Young *et al.*, 1979), pero el significado práctico de estas observaciones no está claro.

En muestras ambientales es muy útil el uso de ICC-PCR (sigla que significa en inglés, *Integrated Cell Culture - PCR*), la cual consiste en realizar inicialmente un pasaje previo de la muestra ambiental, a partir de la cual se busca detectar el virus de interés, por cultivo celular y permitir que el virus infecte las células, para luego extraer de éstas el genoma viral y realizar su amplificación por PCR o qPCR. De esta forma, podemos afirmar que el genoma viral que está siendo detectado por PCR se encontraba dentro de partículas virales infecciosas (Rigotto *et al.*, 2010; Schlindwein *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2010). Se ha comprobado que la técnica de ICC-PCR aumenta la detección de EV en aguas residuales de 66% a 91 %. De manera interesante, PV ha mostrado alta positividad por ICC-PCR (91.7%) comparado con la reacción RT-PCR (66.7%), demostrando que la técnica puede mejorar la sensibilidad de detección (Schlindwein *et al.*, 2010).

1.2.2 Norovirus

Los Norwalk virus tienen una densidad flotante de 1,33 a 1,41 g/cm³ en cloruro de cesio (CsCl) (Kapikian *et al.*, 1973). Los NV se mantienen infectivos para los voluntarios después de (a) la exposición del filtrado de heces a pH 2,7 durante 3 horas a temperatura ambiente, (b) tratamiento con 20% de éter a 4 ° C durante 18 horas, o (c) la incubación a 60° C durante 30 minutos (Dolin *et al.*, 1972). NV es resistente al tratamiento de inactivación con 3,75 a 6,25 mg / l de cloro (cloro libre residual de 0,5 a 1,0 mg / l), una concentración de cloro similar a la que se encuentra en un sistema de distribución de agua potable (Kilgore *et al.*, 1996). NV, sin embargo, se inactiva después del tratamiento con 10 mg / l de cloro, una concentración que se utiliza para tratar los sistemas de suministro de agua después de que se ha detectado

la contaminación. NV es más resistente a la inactivación por cloro que el poliovirus tipo 1, RVA, RV de simio (SA11), o bacteriófago f2 (Keswick *et al.*, 1985).

Los Calicivirus Felinos (FCV) se han utilizado como un sustituto de los NV humanos en los estudios ambientales debido a que el título de la infectividad del FCV puede ser fácilmente analizado por cultivo de células, pero todavía no se sabe si las propiedades físico-químicas entre los dos grupos son suficientemente similares. FCV es generalmente lábil a pH bajo (pH 3,0) (Mochizuki *et al.*, 1992; Studdert *et al.*, 1970) y el virus se inactiva por tratamiento a 50 ° C durante 30 minutos.

En cuanto a la persistencia en el tiempo, se realizó recientemente un estudio en Atlanta, EEUU, donde se evaluó la presencia de NV en agua y se constató que su persistencia puede llegar a 3 años siendo detectable y 61 días siendo infectivo.

1.2.3 Rotavirus

Los rotavirus son virus de doble cadena de ARN y existen evidencias que indican que son de los virus que circulan en las aguas más resistentes a la desinfección por UV. Un estudio reciente realizado con la técnica de ICC-PCR con RV de simio (SA11) generó evidencia a favor de esta idea. Con una concentración inicial de 2×10^4 PFU / ml de RV de simio (SA11), se obtuvo una relación lineal de primer orden, en el rango de dosis de UV de 0-120 mJ cm⁻². Se detectó una tasa de inactivación constante de 0,0343 cm² mJ⁻¹ y se detectaron fenómenos de resistencia de las sub-poblaciones de SA11 a dosis de UV muy altas. Este estudio aportó datos con respecto a las técnicas clásicas, demostrando que los RVA son aún más resistentes a la radiación UV que lo que indicaban los estudios previos con cultivo de placa (Li *et al.*, 2009).

Con respecto a la resistencia a la clorinación, otro estudio reciente (Li *et al.*, 2011) con RV de simio, mediante la técnica de ICC-RT-q PCR aportó datos significativos con respecto a la resistencia de los RV al cloro. La técnica de ICC-RT-qPCR fue capaz de detectar la supervivencia de los rotavirus a la desinfección con cloro, en dosis de hasta 20 mg / L (60 min de contacto), lo que sugiere una dosis de cloro requerida de 5 veces (de 1 a 5 mg / L) mayor que los resultados obtenidos por el ensayo de placas. La calidad del agua también afectó la eficiencia de inactivación, los rotavirus tienen una resistencia relativamente mayor en los efluentes secundarios que en el agua de red con los mismos tratamientos de desinfección de cloro. Este estudio indicó que los rotavirus tienen una infectividad superior a la indicada previamente por ensayo de placa como única prueba.

Estudiando la infectividad del virus en el tiempo, se realizó un estudio que comparo la persistencia de RV de mono Rhesus (RRV) en aguas procedentes de pozos subterráneos y de aguas superficiales (Espinosa *et al.*, 2008). En el agua subterránea la infectividad del virus se reduce sólo ligeramente después de 60 días de incubación, aunque se redujo en aproximadamente 100 veces a los 90 días y se redujo en aproximadamente 1000 veces a los 150 días, permaneciendo en el mismo nivel hasta 7 meses. En contraste, la infectividad del RRV en agua superficial ya se había reducido en aproximadamente 40 veces al día 30, más de 1500 veces a los 150 días, y alrededor de 10000 veces al día 180.

También en el mismo estudio se evaluó la integridad física de los genomas virales en ambos tipos de agua. Se constató que fue afectada en gran medida por la incubación en agua superficial. La estabilidad resultó mucho mayor en las aguas subterráneas, el material genómico viral se redujo alrededor de 7 veces para rotavirus después de 5 meses de incubación en el agua subterránea.

Por último, se estableció en este estudio, una correlación entre la estabilidad de la infectividad del virus y la detección del genoma viral. Para rotavirus la inactivación de la infectividad en general, fue paralela a una reducción en el número de genomas, alcanzando una disminución en la escala logarítmica de 4 veces en ambos parámetros al día 180.

La infectividad de RRV es tolerante a concentraciones de cloro residual superiores a las recomendadas por la OMS para el tratamiento de agua usada para el consumo humano. Sumado a lo anterior, el hecho de que la partícula infecciosa de RRV sea capaz de persistir durante meses en las aguas subterráneas, indica que la protección de fuentes de agua de contaminación, los procedimientos adecuados de desinfección, el uso de indicadores virales específicos y el monitoreo microbiológico de calidad de agua son cuestiones importantes a tener en cuenta.

1.3 Justificación

El monitoreo de virus entéricos en aguas residuales y la determinación de la eficiencia de remoción de éstos en las plantas de tratamiento, es uno de los enfoques más apropiados para comprender la incidencia real de los virus entéricos humanos en la salud y mitigar la contaminación de los cuerpos de agua, especialmente teniendo en cuenta que las aguas residuales contienen virus excretados por pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos, los cuales pueden eventualmente provocar enfermedad en otro individuo susceptible (Gibson *et al.*, 2010). RVA, EV y NV han sido identificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como potenciales patógenos de referencia (representando al grupo de los virus entéricos) contemplando las características, comportamiento y susceptibilidades de cada grupo a diversos procesos de tratamiento (WHO 2011).

Aunque la detección convencional de indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y enterococos intestinales es sencilla, los mismos no necesariamente se correlacionan con la presencia de patógenos virales. Los virus son más estables que las bacterias en el medio ambiente y a diferencia de éstas, proporcionan información sobre el origen de la contaminación (Calgua *et al.*, 2008).

En Brasil, Argentina, Estados Unidos (EEUU) y Europa, se han realizado durante los últimos años varios estudios que han demostrado la circulación de RVA y NV en aguas residuales (Victoria *et al.*, 2010; Miagostovich *et al.*, 2008).

Sin embargo en nuestro país, no existen datos que determinen el grado de contaminación con virus gastroentéricos de nuestros principales cursos de agua, ni una correlación entre las estirpes virales que afectan las distintas poblaciones y las que se encuentran en el ambiente. Por otro lado, existen publicaciones en periódicos locales en la zona del litoral que anualmente describen la existencia de grandes brotes de gastroenteritis, los cuales no han sido estudiados en profundidad (El telégrafo, 2011; El Argentino, 2012; Diario El País, 2012).

El Río Uruguay, constituye un importante modelo hídrico a estudiar ya que recorre una distancia aproximada de 1.770 km de extensión, de los cuales 1262 km corresponden al tramo entre sus nacientes y la confluencia con el Río Quaraí. Los 508 km restantes transcurren enteramente entre nuestro país y la República Argentina. Posee 3 represas hidroeléctricas, y hay una cuarta en planificación. Sobre sus costas hay un elevado número de personas que viven en ciudades y pequeños poblados. Históricamente, estas poblaciones han convivido con el río y han explotado sus riquezas en diversos aspectos como por ejemplo: recursos pesqueros, navegación, obtención de energía y obtención de agua para consumo doméstico y riego. Es importante destacar a su vez, que durante su curso el Río Uruguay pasa por tres países distintos, con características climáticas, poblacionales, ecológicas y epidemiológicas que son diferentes.



Figura 2- Mapa del Río Uruguay en el cual se muestra el recorrido del mismo frente a las costas del Uruguay. Se señalan la ubicación de los 4 puntos de colecta de muestras en rojo: Bella unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos (ver materiales y métodos).

Con respecto a nuestro país, las ciudades de Salto, Paysandú y Fray Bentos carecen de un sistema de tratamiento de aguas residuales, siendo éstas volcadas directamente al Río Uruguay formando grandes focos de contaminación para las poblaciones locales. En el norte del país, en la ciudad de Bella Unión, hay dos lagunas facultativas, que permiten la decantación y eliminación de una parte de microorganismos, pero, de todas maneras no hay un sistema de descontaminación total, por lo cual también las aguas residuales son finalmente vertidas al Río Uruguay (Figura 2).

Las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos, junto con pequeños centros poblados que se encuentran en los cuatro departamentos, contabilizan un total

aproximado de 290000 habitantes según el censo realizado en 2011 por el Instituto Nacional de Estadística (INE 2011).

Debido a lo descrito y explicado anteriormente entendemos que es de suma importancia realizar investigaciones que permitan ampliar y profundizar nuestros conocimientos sobre el estado actual del Rio Uruguay, respecto a la presencia de virus gastroentéricos. A su vez es de destacar que en el marco del presente proyecto se han desarrollado tecnologías y metodologías de última generación que nos permitieron generar conocimiento de gran interés científico y sanitario.

A continuación se describen las principales características de RVA, NV y EV, los cuales han sido extensivamente estudiados en el presente proyecto.

1.4 Características generales de Rotavirus

1.4.1 El virus: historia y estructura

En 1973 Bishop y colaboradores descubrieron el agente infeccioso denominado Rotavirus Humano, causante de diarreas severas en recién nacidos y niños de corta edad, mediante la técnica de microscopía electrónica de un corte de mucosa de duodeno de niños, trabajo publicado en Lancet (Bishop *et al.*, 1973). Poco tiempo después Bishop, Flewett y otros lo identificaron en heces (Bishop *et al.*, 1974; Flewett *et al.*, 1974) también mediante el uso de microscopía electrónica.

Casi inmediatamente, se determinó que Rotavirus (RV) era el agente etiológico principal en los casos de diarrea en bebés y niños pequeños causando entre el 35% y el 50% de las hospitalizaciones por gastroenteritis (GA) durante los primeros 2 años de vida. En poco tiempo, investigadores de todas partes del mundo reportaron la presencia de Rotavirus del grupo A (RVA) en heces de pacientes con diarrea resultando ser el agente causal preponderante a la hora de provocar diarreas en niños sin importar el grado de desarrollo del país en cuestión (Chandran *et al.*, 2010).

Previamente a Bishop, diferentes investigadores habían reportado partículas virales similares en ratones, monos y terneros, denominadas de diferente manera sin relación aparente entre ellas. Más tarde, gracias al desarrollo de los cultivos celulares, se pudo observar que morfológicamente eran similares entre sí y fueron clasificadas dentro de la familia *Reoviridae* (Flewett *et al.*, 1974; Kapikian *et al.*, 1976).

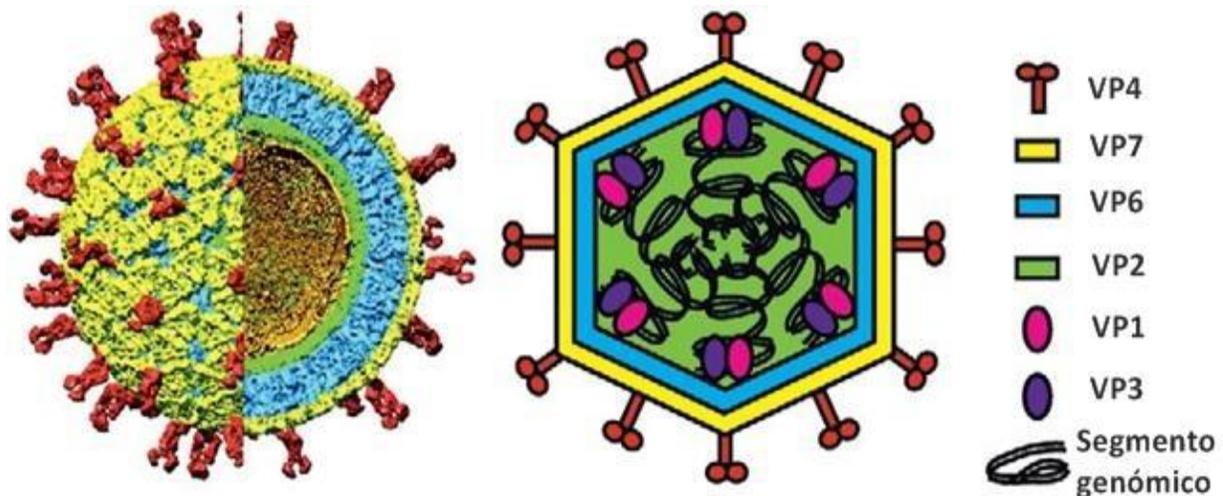


Figura 3- Arquitectura y composición proteica del virión de RV. A la izquierda, imagen reconstruida de microfotografía electrónica de RV maduro. Se observa una partícula viral de triple capa y en el corte las capas internas. Al centro, la superficie lisa externa (en amarillo) está compuesta por la glicoproteína VP7 la cual contiene integradas las espículas de VP4 (en rojo), la capa intermedia de VP6 mostrada en azul, la delgada VP2 en verde. Los espirales son porciones ordenadas de ARN dc que delimitan la cubierta del core de VP2. A la derecha se observa un dibujo esquemático de las proteínas y ARN dc. Adaptado de Mc Donald *et al.*, 2011)

Los RV están comprendidos dentro del género *Rotavirus* dentro de la familia *Reoviridae* y se caracterizan por causar diarrea en los estadios juveniles de varias especies de mamíferos y aves.

En cuanto a su estructura (fig. 3) las partículas virales son de 100nm de diámetro aproximadamente, no envueltos y tienen una cápside proteica icosaédrica compuesta por tres capas concéntricas, de adentro hacia afuera: el core, la cápside interna y la cápside externa. Cuentan con 60 espículas proteicas (VP4) que están situadas en la cápside externa y la integridad de dicha cápside requiere la presencia de calcio. Las partículas virales contienen en su cápside la maquinaria enzimática para la producción de ARNm, tienen una ARN polimerasa ARN dependiente y otras enzimas capaces de generar transcritos con cap. El genoma consta de 11 segmentos de ARN doble cadena (ARNdc). La mayoría de los segmentos codifica un solo polipéptido, permitiendo que el virus exprese seis proteínas estructurales (VPS) y cinco proteínas no estructurales (NSP). Sin embargo, en algunas cepas de RVA, un segundo marco abierto de lectura (ORF) se detecta en el segmento 11 del genoma, que conduce a la expresión de otro producto proteico (NSP6) (González *et al.*, 1998). La cápside externa contiene dos de estas proteínas estructurales: VP4 (una proteína sensible a proteasas celulares) y VP7 (la única glicoproteína viral). Estas dos proteínas definen el serotipo del virus y se consideran esenciales para el desarrollo de vacunas debido a que son epítopes para anticuerpos neutralizantes que se cree son importantes para la protección. Debido a que los dos segmentos que contienen los genes que codifican a estas proteínas pueden segregarse independientemente, ha sido desarrollado un sistema de clasificación binaria para los RVA que consiste en tipificar tanto en P tipos (a partir de VP4, de sensible a Proteasa), como en G tipos (a partir de VP7, de Glicoproteína) (Gentsch *et al.*, 2005; MMWR Feb. 2009). El cultivo *in vitro* es

facilitado mediante el tratamiento con proteasas, potenciando la infectividad de los polipéptidos de las espículas de la capa mas externa.

1.4.2 Patología e inmunidad

En la etapa anterior a la vacuna, los RVA infectaban prácticamente a todos los niños a la edad de 5 años. La gastroenteritis aguda severa causada por RVA se produce principalmente en niños de 4-23 meses de edad (Glass *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 1993). Los RVA muestran una morfogénesis peculiar, las partículas virales se forman por brotamiento del retículo endoplasmático y las partículas envueltas se forman de manera transitoria y luego se pierde esta envoltura. Las partículas maduras desnudas son liberadas por las células infectadas a través de lisis celular, o por un tipo de transporte no clásico y vesicular, en el caso de las células epiteliales polarizadas. El transporte de las espículas de VP4 hacia la superficie celular se da de manera no clásica con secreción de NSP4 (*Non Structural Protein 4*).

Los RVA infectan los enterocitos maduros del intestino delgado proximal, a nivel de la mucosa gastrointestinal, donde al replicarse, alteran el metabolismo normal de dichas células causando mala absorción intestinal y con esto una diarrea osmótica, viéndose intensificada por la lisis celular provocada por el egreso de la progenie viral (Glass *et al.*, 2006). La entrada en las células epiteliales parece ser un proceso de múltiples etapas, e implica la interacción con tres receptores de la superficie que están asociados con microdominios enriquecidos en colesterol y glicolípidos ('balsas') (Lazarow *et al.*, 2011). Recientemente, fue descubierta en los RVA la primer *enterotoxina viral*, NSP4, la cual es capaz de generar diarrea de tipo secretora, o la denominada "diarrea acuosa", cuando es administrada en ratones neonatos. También se sospecha que es capaz de interactuar con el sistema nervioso entérico a nivel del intestino aumentando la motilidad intestinal (Ball *et al.*, 2005, Ousingsawat *et al.*, 2011). El período de incubación estimado de la enfermedad diarreica causada por rotavirus es de menos de 48 horas (Davidson *et al.*, 1975). En condiciones experimentales, los adultos que se enfermaron presentaron síntomas 1 a 4 días después de recibir el rotavirus por vía oral (Kapikian *et al.*, 1983). El espectro clínico de la enfermedad por RVA en niños varía, desde una diarrea leve acuosa y de duración limitada, a una diarrea severa con vómitos y fiebre que puede dar lugar a deshidratación grave que lleva a la hospitalización y si el paciente no es tratado a tiempo puede entrar en shock y fallecer (Carlson *et al.*, 1978). La enfermedad generalmente comienza con la aparición aguda de fiebre y vómitos, seguido de deposiciones frecuentes y acuosas 24 - 48 horas más tarde (Glass *et al.*, 2006). Hasta un tercio de los niños con la enfermedad por RVA tiene una temperatura mayor a 39° C (Rodríguez *et al.*, 1977; Ruuska *et al.*, 1990). El vómito por lo general dura menos de 24 horas, mientras que otros síntomas gastrointestinales generalmente desaparecen en 3-7 días. Se han detectado proteínas de rotavirus y su ácido ribonucleico (ARN) en la sangre, órganos, e incluso en líquido cefalorraquídeo, pero estos hallazgos son muy puntuales y escasos y sus implicaciones clínicas no son claras (Glass *et al.*, 2006, Blutt *et al.*, 2007; MMWR 2009).

Aunque los niños pueden infectarse con RVA varias veces durante su vida, la infección inicial después de 3 meses de edad tiene más probabilidades de causar gastroenteritis aguda y deshidratación (Velázquez *et al.*, 1993; Cravioto *et al.*, 1990; Reyes *et al.*, 1989; Velázquez *et al.*, 1996). Después de una infección natural única con RVA, el 38% de los niños están protegidos contra la infección por RVA, el 77% están protegidos contra una posterior gastroenteritis por RVA y el 87% están protegidos contra la gastroenteritis grave por RVA., las segundas y terceras infecciones confieren protección progresivamente mayor frente a la gastroenteritis por RVA (Velázquez *et al.*, 1996). La infección en los recién nacidos sanos, a menudo es asintomática o resulta en sólo una enfermedad leve, debido a la protección de los anticuerpos maternos transferidos en forma pasiva (Glass *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 1983).

Las correlaciones inmunológicas entre la protección contra la infección por RVA y la enfermedad no se entienden completamente. Ambos anticuerpos, en suero y mucosa probablemente están relacionados con la protección y en algunos estudios, los anticuerpos séricos contra VP7 y VP4 se han correlacionado con la protección (Franco *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2002). Sin embargo, en otros estudios, incluyendo estudios de la vacuna, la correlación entre los anticuerpos en el suero y la protección observada ha sido escasa (Ward *et al.*, 1995). Las primeras infecciones con RVA por lo general provocan una respuesta predominantemente homotípica, con respuesta de anticuerpos neutralizantes en el suero y las infecciones posteriores suelen provocar una respuesta más amplia, la respuesta heterotípica. La influencia de la inmunidad mediada por células es menos clara, pero probablemente está relacionada tanto con la recuperación de la infección como con la protección posterior contra la enfermedad (Offit *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1996; MMWR 2009).

1.4.3 Transmisión

La vía de transmisión de RVA es la fecal-oral, a través del contacto persona-persona, fomites contaminadas y el contacto con el medio ambiente contaminado, como por ejemplo: diferentes cuerpos de agua superficiales o subterráneas (destinadas a consumo, irrigación, pesca y recreación) y alimentos contaminados. Haciendo hincapié en la transmisión a través de los cuerpos de agua contaminados, los RVA tienen una resistencia característica en aguas residuales, resistiendo incluso tratamientos con diversos procesos de desinfección de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR). Los RVA son altamente infecciosos, se estima que solamente 10 partículas virales son capaces de infectar y generar enfermedad en un individuo susceptible (dosis infectante) y teniendo en cuenta que una persona infectada elimina aproximadamente un trillón de partículas infecciosas por gramo de materia fecal, la transmisibilidad de este virus es muy elevada (Fields: 5 ed, 2007).

Sin embargo, la prevalencia de RVA en países de altos ingresos, a pesar de mejoras en sus servicios de saneamiento sugiere que las rutas no fecales desempeñan un papel en la transmisión. Por ejemplo, RVA ha sido identificado en la orofaringe de niños con síntomas de enfermedad respiratoria de las vías altas, en niños con y sin enfermedad gastrointestinal aparente (Zheng *et al.*, 1991; Santosham *et al.*, 1983).

También hay trabajos que han propuesto una posible transmisión por vías respiratorias, aunque no se ha comprobado eficientemente.

Los tratamientos paliativos para las infecciones contra RVA radican en una buena rehidratación oral, ya que no se cuenta con medicamentos antivirales, la única medida que se ha comenzado a tomar en diferentes regiones del mundo y en una gran cantidad de países, ha sido la vacunación masiva de los recién nacidos.

1.4.4 Clasificación

Las cepas de RVA han sido clasificadas basándose en (i) las propiedades antigénicas de VP6, VP7 y VP4 (subgrupos (I, II, I+II, nol/noll), serotipos G y P, respectivamente, (ii) el patrón de migración de los segmentos genómicos de ARN doble hebra al ser sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (electroferotipos largos, cortos, súper cortos o atípicos), (iii) patrones de hibridación del genoma completo (genogrupos: *Wa-like*, *DS-1-like*, *AU-1-like*) y (iv) análisis de la secuencia de nucleótidos (genotipos) (Matthijnsens *et al.*, 2009). Debido a la naturaleza segmentada del genoma de RV, pueden ocurrir eventos de reordenamiento después de la coinfección con cepas de RV que pertenecen al mismo grupo/especie tanto *in vitro* como *in vivo* (Garbarg-Chenon *et al.*, 1986; Gombold *et al.*, 1986; Maunula *et al.*, 2002). Sin embargo, no hay evidencia de recombinación entre los RV contemporáneos que pertenezcan a diferentes grupos/especies. La incapacidad para someterlos a intercambio de segmentos, incluso bajo condiciones experimentales, indica que los grupos RV se pueden pensar como únicas especies virales.

Con un número creciente de secuencias disponibles de genomas completos de RVA, se volvió necesario un sistema de nomenclatura estandarizada para cepas de RVA. Matthijnsens y colaboradores (2008), realizaron una comparación de 45 genomas de diferentes cepas de RVA, de los cuales 25 eran de cepas humanas (Matthijnsens *et al.*, 2008). El análisis incluyó las secuencias genómicas de RVA humanas con 15 combinaciones G-P[] diferentes (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G3P[9], G4P[6], G5P[8], G6P[9], G8P[6], G8P[10], G9P[8], G10P[14], G12P[4], G12P[6], G12P[8], y G12P[9]). A partir de estas secuencias, un sistema de clasificación basado en el genoma completo fue desarrollado para RVA, que permite la asignación de diferentes genotipos para cada uno de los once genes virales. De acuerdo a este sistema, los genes de RVA que codifican para: VP7-VP4-VP6-VP1 VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, determinan los siguientes genotipos: Gx-P [x]-IX- Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = números arábigos a partir de 1), respectivamente (Matthijnsens *et al.*, 2008). Los análisis del genoma completo han reafirmado la importancia de la relación entre las cepas humanas y animales de RVA, poniendo en relieve la importancia del análisis de genomas completos y el uso de una nomenclatura común. Recientemente, se formó el RCWG (*Rotavirus Classification Working Group*) que incluye a especialistas en el estudio de RV de todo el mundo. Dicho grupo, propuso más recientemente que las distintas cepas de RVA se denominen usando la siguiente nomenclatura (fig. 4): Grupo RV / especie de origen / nombre de país de identificación / nombre común / año de identificación /G y P tipo, similar a la utilizada para el virus Influenza A (Matthijnsens *et al.*, 2011).

1.4.5 Evolución molecular

La naturaleza segmentada del genoma del rotavirus proporciona una oportunidad para la redistribución de segmentos genómicos (en inglés, *Reassortment*), la cual, junto con las mutaciones puntuales, recombinación genética y rearrreglos de segmentos (en inglés, *Rearrangements*), se han identificado como los mecanismos de evolución viral y generación de diversidad para los rotavirus en la naturaleza. (Tsugawa *et al.*, 2008).

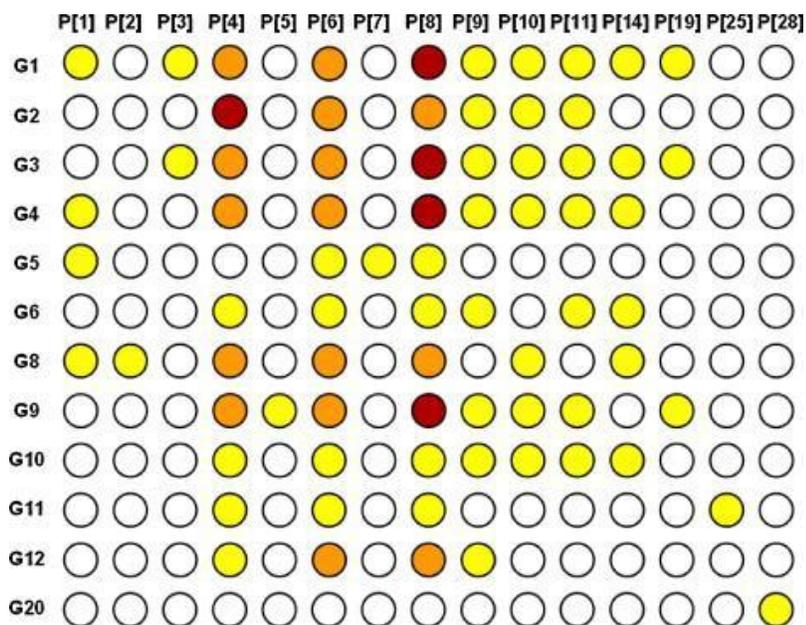


Fig 4- Combinaciones de G y P de cepas de RVA humanos. En rojo las combinaciones más frecuentemente identificadas, en naranja combinaciones inusuales (rango de prevalencia de 0.2 - 2 %) y en amarillo cepas raras con una prevalencia de < 0.2%), en blanco las cepas aún no reportadas (Matthijnssens *et al.*, 2009; Banyai *et al.*, 2012).

Los estudios de 2008 evidenciaron que las cepas humanas de RVA, con pocas excepciones, tienen constelaciones de genes internos que consistían enteramente de genes *Wa-like* o *Ds-1-like* (Matthijnssens *et al.*, 2008). Estos resultados apoyan la idea de que los RVA humanos han mantenido evolutivamente constelaciones preferidas de genes, tal vez debido a presiones selectivas que favorecen el mantenimiento de los conjuntos de proteínas virales que funcionan idealmente en la replicación del virus. Por lo tanto, a pesar de que los RVA pueden intercambiar genes por *Reassortment*, pueden surgir virus que sean menos aptos evolutivamente que los parentales, haciendo que dichos virus con *Reassortment* tengan como costo un bajo éxito en su expansión dentro del pool de virus circulantes (Patton *et al.*, 2012).

Los *Reassortments* entre RVA que parten de huéspedes iguales o diferentes y ocurren después de coinfecciones en un huésped han demostrado ser uno de los mecanismos más importantes para generar diversidad viral (Martella *et al.*, 2010; Bilcke *et al.*, 2009). Los *Reassortments* pueden generar nuevas combinaciones de genotipos G y P, las cuales evaden la respuesta inmune del hospedero y pueden eventualmente ser más

patogénicas que las que existían previamente. En este sentido, los animales juegan un importante rol en la evolución de los RVA en humanos, ya que son reservorio de muchos genotipos que comúnmente no circulan en la población humana pero que potencialmente pueden saltar la barrera inter-especie e infectar al humano, ya sea mediante una infección heteróloga (cuando un virión de origen animal es capaz de infectar al humano y provocar enfermedad), o mediante un evento de *Reassortment* humano-animal. Esta última es la más frecuentemente observada, durante una infección mixta de RVA humano-animales y se cree que tienen una influencia significativa en la evolución de los RVA (Matthijnssens *et al.*, 2006; Matthijnssens *et al.*, 2008; Tsugawa *et al.*, 2008; Matthijnssens *et al.*, 2009; Matthijnssens *et al.*, 2010). Las mutaciones puntuales se acumulan en el genoma de RVA constantemente en cada ciclo de replicación debido a la ARN polimerasa - ARN dependiente (sigla en inglés *RdRp*) viral, la cual comete errores y carece de mecanismos de corrección de los mismos, quedando expuestas a la acción de la selección negativa o positiva. La velocidad a la que estas mutaciones se acumulan en el genoma para el grupo A de RV ha sido poco estudiada. Dichas mutaciones son las responsables del surgimiento de linajes y sublinajes dentro de los diferentes genotipos G y P de RVA. Ejemplos claros de esto lo representan el surgimiento de los linajes y sublinajes que han sido identificados dentro de los genotipos G9 y G12 (Matthijnssens *et al.*, 2010). Existen otros mecanismos de variabilidad genética que han sido observados en RVA con menor frecuencia, como los rearrreglos de segmentos (*Rearrangement*) y la recombinación genética, que se cree son menos importantes para la evolución molecular de estos virus (Desselberger *et al.*, 1996; Matthijnssens *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2008). Algunos RVA muestran perfiles electroforéticos inusuales en los que los segmentos de ARN de doble cadena *standard* se sustituyen por formas más grandes, reorganizadas, denominados rearrreglos de segmentos (en inglés, *Rearrangements*) (Desselberger *et al.*, 1996). Los *Rearrangement* genéticos fueron aislados por primera vez de niños inmunocomprometidos que tenían infección crónica (Hundley *et al.*, 1987, Pedley *et al.*, 1984) y se puede obtener *in vitro* por pases consecutivos en cultivo celular con una alta multiplicidad de infección (MOI) (Hundley *et al.*, 1985; Shen *et al.*, 1994; Kojima *et al.*, 2000). Recientemente, se han identificado los *Rearrangement* en pacientes inmunocompetentes con infección aguda por RVA (Schnepf *et al.*, 2008). El *Rearrangement* del gen normalmente consiste en una duplicación parcial de cabeza a cola de una secuencia del segmento. En la mayoría de los casos, la duplicación de la secuencia se produce después del codón de parada, dejando el marco de lectura abierto (ORF) intacto sin cambios (Desselberger *et al.*, 1996). Menos frecuentemente, la duplicación se produce dentro de la ORF y puede dar origen a una proteína modificada que la mayoría de la veces es no-funcional (Gault *et al.*, 2001).

1.4.6 Epidemiología

En 2008 se realizó un estudio a nivel mundial en el que se le atribuye a la diarrea causada por RVA el resultado de 453000 muertes (IC del 95% 420000-494000), 37% de las muertes atribuibles a la diarrea en niños menores de 5 años y lo que representa un 5% de todas las muertes de niños menores de 5 años (Tate *et al.*, 2012). La

mayoría de estas muertes se producen en los países en desarrollo, en particular los situados en el África subsahariana y el sudeste asiático.

Son cinco países en los que se encuentra distribuida más de la mitad de todas las muertes atribuibles a la infección por RVA: República Democrática del Congo, Etiopía, India, Nigeria y Pakistán, la India por sí sola representa el 22% de las muertes (98,621 defunciones) (Tate *et al.*, 2012).

Casi todos los niños de 5 años de edad han sido infectados por RVA al menos una vez, sin importar si viven en países desarrollados o en vías de desarrollo (Velazquez *et al.*, 2009). Sin embargo, infecciones múltiples son la norma en los primeros años de vida. Un estudio (Velázquez *et al.*, 1996) mostró que el 13% de los niños mejicanos se habían sometido a 5 infecciones por RVA a los dos años de edad. La primera infección por RVA es la que tiene más probabilidades de producir enfermedad con diarrea moderada a grave. La incidencia de las diarreas moderadas a severas disminuye con la segunda infección y las terceras infecciones suelen ser asintomáticas. Los RVA asociados a segundas infecciones tienen genotipos G y P[] que por lo general difieren de los que causan la infección primaria. Por ejemplo, en el estudio de Velázquez, los genotipos G1 y G3 son la causa más frecuente de las infecciones primarias, mientras que el genotipo G2 fue la causa más frecuente de las segundas. Estos resultados sugieren que las infecciones primarias inducen respuestas protectoras que son al menos parcialmente genotipo específicas. Es esta posibilidad -“que las infecciones por RVA inducen fuertes respuestas inmunitaria específicas con anticuerpos específicos por VP7 (G)” (O’Ryan *et al.*, 1994) que ha dado el impulso para el desarrollo de vacunas polivalentes que incluyen múltiples virus con diferentes tipos G (Christy *et al.*, 1988; Patton *et al.*, 2012)

Los RVA poseen una amplia distribución mundial y son responsables del 40% de las hospitalizaciones debido a diarreas virales reportadas en todo el mundo, independientemente del nivel económico. Se estima que cada año en todo el mundo se producen alrededor de 111 millones de episodios de gastroenteritis de las cuales hay 25 millones de consultas médicas, 2,4 millones de hospitalizaciones y miles de decesos (Parashar *et al.*, 2009; Parashar *et al.*, 2003). A pesar de que los índices de mortalidad que existen en los países desarrollados respecto a los países en vías de desarrollo, son significativamente menores, la incidencia de la enfermedad provocada por RVA es similar en todo el mundo, lo que indica que las mejoras en las condiciones sanitarias y de higiene que existen en los países desarrollados no reducen esta incidencia (Chandran *et al.*, 2010). Debido a esto, es que se plantea la vacunación como la mejor alternativa para prevenir los casos graves de GA por RVA en todo el mundo. Actualmente existen varias vacunas desarrolladas contra RVA (anti-RVA), que están siendo aplicadas en diferentes países en todo el mundo y han demostrado ser eficaces en reducir los casos graves de GA, reduciendo así el número de hospitalizaciones y muertes provocadas por RVA (Chandran *et al.*, 2010). En este sentido es imprescindible estudiar y establecer la epidemiología molecular de RVA que circulan en cada país antes de la implementación de una vacuna. Los resultados de éstos estudios permitirán evaluar cual será la mejor vacuna a aplicar de acuerdo a las cepas virales mayoritarias que circulan, así como estudiar los aspectos moleculares de

los RVA que circulan inmediatamente posterior a la vacunación para evaluar si la misma está funcionando a nivel de la población.

La GA provocada por RVA presenta un carácter epidémico en países de clima templado, con brotes y epidemias en los meses más fríos y secos del año. Por otro lado, en países de clima tropical la GA provocada por RVA presenta un carácter endémico y los casos de GA por RVA ocurren de forma uniforme durante todo el año (Chandran *et al.*, 2010).

En la actualidad no existe un tratamiento específico disponible para la infección por rotavirus (Parashar *et al.*, 2006), a excepción de la prevención mediante la vacunación que ha ganado la aceptación en muchos países desarrollados y en vías de desarrollo (Ruiz -Palacios *et al.*, 2006; Okoh *et al.*, 2010; Parashar *et al.*, 2003; Santos & Hoshino., 2005).

Para comprender la situación a nivel regional de las cepas circulantes de RVA en la población es necesario conocer los resultados de trabajos de vigilancia en países de Latinoamérica. Un estudio regional incluyó 5 países latinoamericanos, en el cual 1989 muestras que fueron caracterizadas. De ellas el 12% (233) fueron por infecciones mixtas con más de 1 cepa y el 20% (402) no fueron completamente tipificables. 1354 muestras fueron descritas completamente, el 83% representó los 4 genotipos más comunes en humanos: G1P[8] (40%), G2P[4] (30%), G3P[8] (6%) y G4P[8] (7%). Las cepas inusuales (no comunes) proporcionan interesantes ideas sobre la evolución del virus: algunas cepas (G5) fueron comunes en la región, las nuevas cepas G9 se distribuyeron ampliamente., muchos RVA animales y humanos reordenados estaban presentes y algunos genotipos comunes (G3 y G4) fueron de origen animal. También un genotipo inusual, el G12, fue detectado en Argentina (Castello *et al.*, 2004). Centrándonos en países con los que compartimos frontera como Argentina, en 2001 se publicó un estudio de monitoreo de 20 años de duración, el cual se llevó a cabo en nueve localidades de Argentina. Se estudió la prevalencia de la enfermedad, la detección de RVA y la genotipificación de RVA. Los resultados mostraron que un 42% de los ingresos por diarrea estuvieron asociados a RVA (Bok *et al.*, 2001).

Entre 2005 y 2009 se realizó un estudio de vigilancia que comprendió 18 estados de Brasil, donde se colectaron 6109 muestras. RVA fue detectado en 20,3% (n=1242) de las muestras, en niños menores de 2 años de edad, independientemente del estado de vacunación anti-RVA. Las tasas de detección de RVA fueron de 33,8% en 2005, 23,7% en 2006, 16,8% en 2007, 22,9% en 2008, y 18,3% en 2009 (Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

Estudiando los antecedentes de registro de rotavirus en Uruguay, solo contamos con cuatro trabajos publicados, dos de ellos en revistas nacionales (Ribeiro *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2011) y dos internacionales (Torres *et al.*, 2001; Berois *et al.*, 2003) todos ellos realizados con pacientes de Montevideo. El trabajo publicado por Berois en 2003, fue el único que presenta datos de biología molecular para RVA y caracteriza las cepas en nuestro país.

1.4.7 Virología ambiental

Volcándonos hacia la detección de este virus en el ambiente, punto en el que se centra esta tesis, tanto global como regionalmente, tenemos evidencia de la presencia de RVA en el ambiente, particularmente en cuerpos de agua superficiales.

En el 2007, un muestreo de un año de duración se llevó a cabo en arroyos de la cuenca hidrográfica que rodea a la ciudad de Manaus, Estado de Amazonas, en Brasil. Se colectaron 52 muestras distribuidas en 13 puntos distintos. En el 42% de las muestras estuvo presente RVA, resultando ser el virus más frecuente en la totalidad de las muestras colectadas (Miagostovich *et al.*, 2008).

También en Brasil, en 2010, se realizó un estudio de aguas residuales tratadas y barro activado, provenientes de una planta de tratamiento de la ciudad de Florianópolis. El fin del estudio era estudiar la presencia de RVA y su viabilidad. La viabilidad viral, estudiada por PCR integrada a cultivo celular (en inglés, *Integrated Cell Culture - PCR*, sigla: *ICC-PCR*), en el lodo fue de un 25% (dentro de un 33% de muestras con genomas positivos), mientras que un 0% fue registrado para el agua tratada (donde si hubo 41,6% de muestras positivas por detección de genoma) (Schlindwein *et al.*, 2010).

Deteniéndonos en Argentina, encontramos estudios como el realizado en Córdoba en el año 2010, (Barril *et al.*, 2010), donde no solamente se verificó la presencia de RVA en ambiente sino que también se los correlacionó con las cepas de RVA identificadas en muestras clínicas. Se estudiaron los RVA en aguas residuales, y se los correlacionaron con muestras del mismo periodo de tiempo obtenidas de pacientes con diarrea. La distribución proporcional de los genotipos de RVA en las aguas residuales y muestras clínicas durante la estación climática fría del año fue similar: G1 fue identificado en el 26,6% de los aislamientos de aguas residuales y en el 28,8% de las infecciones clínicas., los aislamientos positivos para el genotipo G3 representaron el 21,9% y 25,8%, el genotipo G2 tuvo 15,6% y 10,6%., el genotipo G4 presentó una proporción de 17,2% y 21,2%, el genotipo G8 1,6% y 0%, y el genotipo G9 17,2% y 13,6%, en el ambiente y en muestras clínicas respectivamente. Un cuadro similar de detección de genotipos de RVA fue obtenido en muestras de aguas residuales colectadas durante las estaciones frías y cálidas del año. Los resultados indican que existe una correlación entre los genotipos de RVA aislados de pacientes humanos con diarrea y los procedentes de muestras de aguas residuales.

1.5 Norovirus

1.5.1 Historia: el virus y estructura

Un gran avance se dio en 1972 con el descubrimiento de virus de Norwalk (NV) por Kapikian y colaboradores. Los investigadores analizaron mediante la técnica de Inmunomicroscopía electrónica (IEM), muestras de materia fecal de individuos con gastroenteritis aguda de un brote que ocurrió en una escuela en Norwalk, Ohio, USA, en octubre de 1968., de ahí el nombre inicial del virus (Norwalk), el cual posteriormente se cambio a Norovirus (Kapikian *et al.*, 1972). El virión de NV no posee envoltura lipídica, y está formado por una cubierta proteica de simetría icosaédrica que está

compuesta por 90 dímeros de la proteína viral VP1, estos dímeros forman proyecciones con forma de “cáliz” (o copa) en la superficie de la partícula viral, estructura característica de los virus pertenecientes a la familia Caliciviridae, de ahí el nombre de esta familia viral (Green *et al.*, 2000).

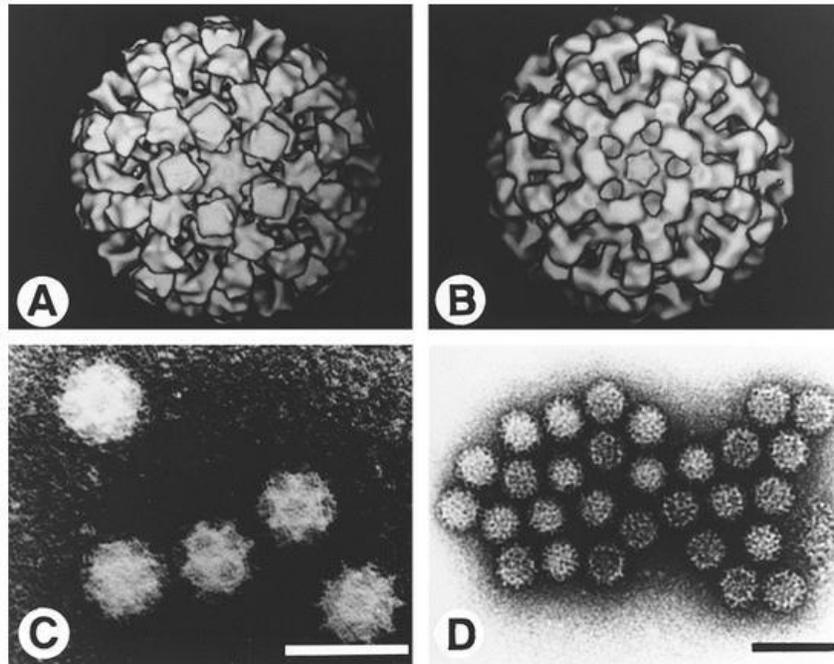


Figura 5- Estructuras símil copa en la superficie del virión son el sello de los calicivirus. A) Imagen de la reconstrucción de Pan-1, calicivirus de primate a partir de criomicroscopía electrónica. B) Imagen de reconstrucción de partículas recombinantes de Norwalk de criomicroscopía electrónica. C) Microfotografía electrónica de contraste negativo de Pan-1 del virus en los extractos de cultivo de tejidos. D) Microfotografía electrónica de contraste negativo de Norwalk-like virus en muestras de heces humanas. Las barras representan los 50 nm (Green *et al.*, 2000).

El genoma de NV está constituido por una única molécula de ARN simple hebra, de polaridad positiva de aproximadamente 7,7 kilobases (Kb) de largo, que se divide en 3 “marcos abiertos de lectura” ORF-1 a 3 (del inglés, *Open Reading frame* - ORF), que codifican para las proteínas estructurales y no-estructurales del virus. La ORF-1 codifica para las proteínas no-estructurales, incluidas la ARN polimerasa viral y la proteína VPg que se une al extremo 5' del genoma viral. La ORF-2 codifica para la proteína estructural principal de la cápside viral, la VP1. Y la ORF-3 codifica para la proteína estructural secundaria, la VP2 (Fig. 6).

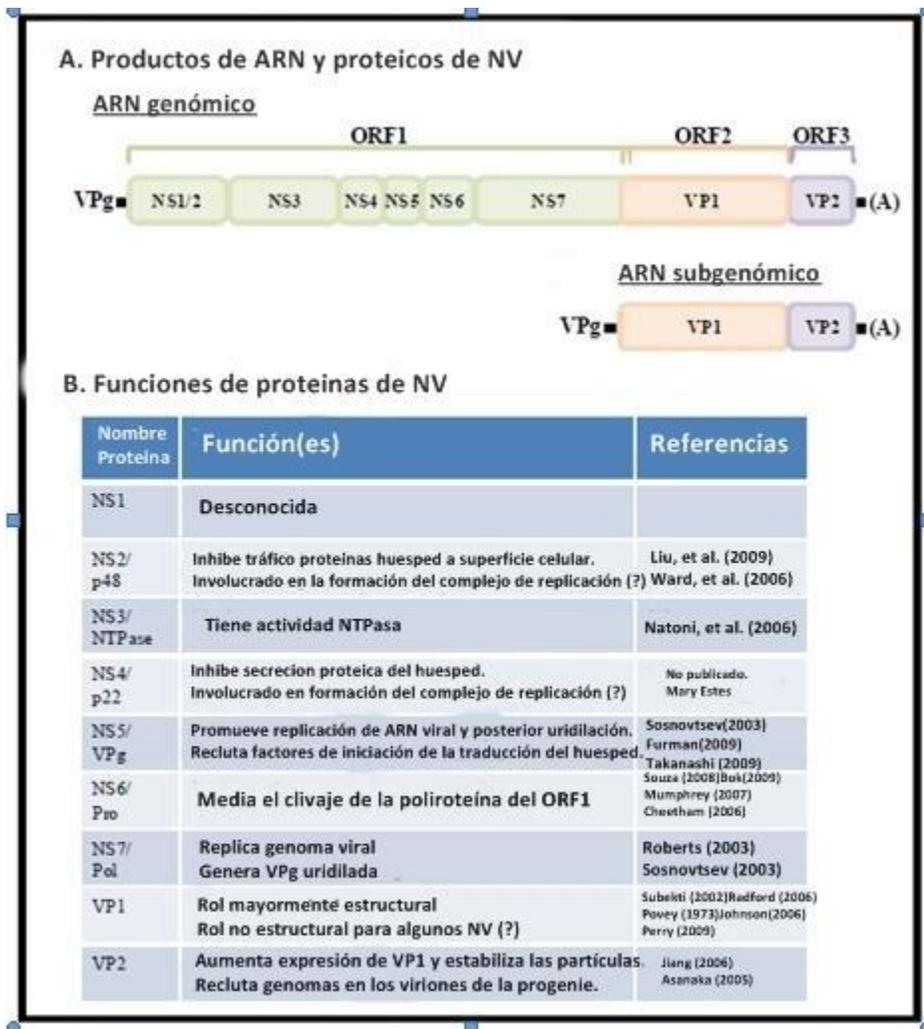


Figura 6- Organización del genoma y funciones proteicas de NV.
 (A) Contienen tres marcos abiertos de lectura (ORF), uno codifica una poliproteína de 7 productos proteicos no estructurales (en verde), uno codificando la proteína estructural principal VP1 (en naranja), y una codificando la proteína estructural menor VP2(en violeta).
 (B) Funciones conocidas e hipotéticas de las proteínas maduras de NV (Karst *et al.*, 2010).

1.5.2 Patología e inmunidad

Debido a la falta de un sistema de cultivo celular y de modelos animales de infección para NV humanos, el conocimiento sobre patogénesis de la infección por NV proviene principalmente del estudio histológico, y los estudios bioquímicos de voluntarios humanos infectados. En los últimos años, el trabajo en modelos de NV

porcino y bovino también ha comenzado a contribuir a nuestra comprensión de la patogénesis causada por el NV.

En los adultos inmunocompetentes, el curso de la infección causada por el NV es rápido, con un período de incubación de 24-48 horas y la resolución de los síntomas dentro de 12-72 horas (Estes *et al.*, 2006). Los síntomas incluyen vómitos y diarrea con o sin náuseas y calambres abdominales. Fiebre baja y malestar también se pueden desarrollar. Si bien la infección causada por el NV generalmente causa un ataque agudo de gastroenteritis que se resuelve en pocos días del inicio de los síntomas, la enfermedad inducida por el NV puede ser mucho más grave y prolongada en los grupos de riesgo específicos. Por ejemplo, los bebés y niños pequeños pueden desarrollar la gastroenteritis más grave tras la infección por el NV, con síntomas que duran hasta seis semanas (Kirkwood *et al.*, 2008; Zintz *et al.*, 2005). Los NV han sido reportados como la segunda causa más importante de gastroenteritis aguda en la infancia, luego de los RVA (Sakai *et al.*, 2001; Glass *et al.*, 2009) teniendo en cuenta el reciente éxito en la vacunación de niños contra las infecciones por RVA, algunos especialistas especulan que NV probablemente se convertirá en la causa más común de enfermedad diarreica en la infancia en el futuro previsible.

La prolongación de la sintomatología ha sido bien documentada en los pacientes trasplantados y otras personas inmunodeprimidas, con síntomas que llegan a durar hasta más de dos años (Gallimore *et al.*, 2004; Westhoff *et al.*, 2009). Del mismo modo, la infección por NV puede ser particularmente grave en los ancianos, incluso resultar en la muerte (CDC 2007; Karst *et al.*, 2010).

1.5.3 Transmisión

Los NV humanos se excretan en las heces de pacientes infectados en altas concentraciones, por lo tanto, la vía fecal-oral a través del consumo de agua o alimentos contaminados es un modo predominante de su transmisión. Los NV se han detectado, mediante técnicas moleculares como la PCR, en diversos tipos de muestras de agua, tales como aguas residuales (Lodder *et al.*, 1999; Lodder *et al.*, 2005), agua del río (Hörman *et al.*, 2004; Haramoto *et al.*, 2005), agua de mar (Griffin *et al.*, 1999; Katayama *et al.*, 2002), e incluso agua del grifo (Haramoto *et al.*, 2004). Los NV humanos se han detectado con frecuencia en muestras de agua durante la estación de invierno, mientras que muchas de las muestras colectadas en verano fueron negativas (Haramoto *et al.*, 2006)

1.5.4 Clasificación

Los Norovirus (NV) pertenecen a la familia *Caliciviridae*. La familia está compuesta por 5 géneros, Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Vesivirus y Nebovirus y 3 géneros propuestos, Recovirus, Valovirus y Calicivirus de pollo (Farkas *et al.*, 2008; L'Homme *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2011). Los NV y Sapovirus, son denominados "Calicivirus

humanos”, o sea, lo únicos dentro de esta familia capaces de infectar al hombre. Recientemente, Smits y colaboradores (2012), identificaron en Bangladesh Calicivirus en la materia fecal de casos de diarrea en humanos, los cuales fueron clasificados dentro de un nuevo género propuesto en la familia, el género Recovirus (Smits *et al.*, 2012). Basado en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos para la proteína más importante de la cápside (VP1), las cepas de NV se clasifican actualmente en cinco genogrupos (GI a GV) (Ando *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006) Los NV humanos se encuentran en el GI, GII y GIV, los NV bovinos pertenecen sólo a GIII, los porcinos pertenecen a GII y los murinos a GV (Fankhauser *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2010; Vinjé *et al.*, 2000). Recientemente, NV de GIV fueron identificados en un cachorro de león muerto y en un perro (Martella *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2007). Dentro de GIII, existen dos genotipos de NV bovino (Oliver *et al.*, 2006). Estos están representados por el Jena Virus (JV), que fue aislado de ganado en Alemania (Günther *et al.*, 1987; Günther *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1999), y el virus *Newbury 2*, el cual fue identificado en las heces de terneros con diarrea en el Reino Unido (Woode *et al.*, 1978). Recientemente, los NV estrechamente relacionadas con los GIII bovinos fueron identificados en las muestras de heces de cerdos y ovejas en Nueva Zelanda, que posiblemente representa un tercer genotipo dentro de GIII (Otto *et al.*, 2011).

Los cinco genogrupos, a su vez, se subdividen en genotipos: 8 genotipos dentro de GI, 21 genotipos en GII [161 CDC (2011)], 2 en GIII, 1 en GIV, y 1 en GV (Zheng *et al.*, 2006). Los NV de los genogrupos GI, GII y GIV se encuentran en los seres humanos. Recientemente, estudios de epidemiología molecular han demostrado que el 70% de los brotes de NV son causados por la variante genotípica GII.4 (Gallimore *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2007; Morillo *et al.*, 2011).

1.5.5 Evolución molecular

La recombinación es una fuerza importante en la evolución viral y también contribuye en la variación genética de los NV (Worobey *et al.*, 1999). La recombinación del virus puede afectar la formación de grupos filogenéticos, aumentar la virulencia del virus, causar estudios confusos de epidemiología molecular y hacer que el diseño de vacunas resulte más difícil (Bull *et al.*, 2007). La clonación de genomas completos en el análisis de los genomas, y el estudio de la recombinación de NV, son maneras eficientes de evaluar las características epidemiológicas y moleculares de NV y el descubrimiento posterior de los genotipos y los nuevos tipos antigénicos (Shen *et al.*, 2012).

En NV, el genoma de un virus recombinante agrupa en 2 grupos filogenéticos diferentes cuando dos regiones (normalmente genes estructurales y no estructurales) del genoma están sujetas a análisis filogenético. La recombinación fue registrada por primera vez en 1997 (Hardy *et al.*, 1997). Desde entonces se ha incrementado la

identificación de ocurrencia natural de recombinación múltiple en NV a nivel mundial (Bon *et al.*, 2005; Bull *et al.*, 2005; Etherington *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2006). Han sido datados al menos 22 tipos de recombinantes ocurridos naturalmente. Estos eventos de recombinación han sido observados tanto intra-Genogrupo, como inter-Genogrupo (Etherington *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2007; Symes *et al.*, 2007; Nayak *et al.*, 2008). De los cuales uno fue para GI, 16 para GII, 2 para GIII, 2 en GV y un recombinante intergenogrupo. El alto número de NV recombinantes sugiere que es un mecanismo importante de evolución.

Figura 7 Virus representando los 19 tipos de Norovirus recombinantes

Genogrupo de NV	Cepa prototipo	Genotipo RdRp	Genotipo Cápside	Pto. corte promedio	Primera publicación
I	WUGI/01/JP	GI.2	GI.6	5	Katayama <i>et al.</i> (2002)
II	Picton/03/AU	GII.b	GII.1	-26	Bull <i>et al.</i> (2005)
	Snow Mountain/76/US	GII.c	GII.2	-55	Hardy <i>et al.</i> (1997)
	E3/97/Crete	GII.4	GII.2	-25	Bull <i>et al.</i> (2005)
	Pont de Roide 673/04/Fr	GII.b	GII.2	-21	Bon <i>et al.</i> (2005)
	SydneyC14/02/AU	GII.b	GII.3	+23	Buesa <i>et al.</i> (2002), Lole <i>et al.</i> (1999)
	Sydney2212/98/AU	GII.a	GII.3	-59	Jiang <i>et al.</i> (1999)
	Chiba1/04/JP	GII.4	GII.3	-7	Vidal <i>et al.</i> (2006)
	771/05/IRL	GII.4/GII.d	GII.4	-595 - 212	Waters <i>et al.</i> (2007)
	Nyiregyhaza/1057/02/HUN ^a	GII.b	GII.4		Gallimore <i>et al.</i> (2004)
	S63/99/Fr	GII.2	GII.5	+35	Bull <i>et al.</i> (2005)
	Hokkaido133/03/JP	GII.d	GII.5	-18	Bull <i>et al.</i> (2007)
	Kunming/04/CH	GII.6	GII.7	-54	Phan <i>et al.</i> (2006b)
	Mc37/01/Th	GII.4	GII.10	+4	Hansman <i>et al.</i> (2004)
SaitamaU1/02/JP	GII.4	GII.12	-38	Katayama <i>et al.</i> (2002)	
III	Minato14/99/JP	GII.6	GII.15	-53	Sasaki <i>et al.</i> (2006)
	VannesL23/99/US	GII.5	GII.15	-31	Bull <i>et al.</i> (2005)
	B-1SVD/03/US	GIII.2	GIII.1	-20	Bull <i>et al.</i> (2007)
V	CV521/02/US	GIII.1	GIII.2	-10	Han <i>et al.</i> (2004)
	S28/06/DE	ND ^c	ND	+17	Muller <i>et al.</i> (2007)
VI	MNV-4/05/US	ND	ND	+55	Muller <i>et al.</i> (2007)
	L8775/06/ID	GI.3	GII.4	+22	Nayak <i>et al.</i> (2008)

^a Datos de secuencia para RdRp y cápside no están disponibles para esta cepa

^b El punto de corte promedio se determinó por 2 métodos: Simplot y método chi cuadrado máximo (Bull *et al.*, 2007) La numeración es en relación al principio del ORF2

^c ND, genotipo no definido.

Figura 7 -Norovirus recombinantes. Adaptado de Hansman *et al.*, 2010)

Los CV han sido detectados en un amplio rango de mamíferos incluyendo humanos, ratones, vacas y cerdos (Wang *et al.*, 2008) con una fuerte evidencia de transmisión zoonótica (Widdowson *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2012).

En cuanto a la mutación puntual, los NV tiene una elevada tasa de mutación, inclusive ha sido recientemente observada una tasa mayor que la determinada para el virus HIV para el caso de su genotipo más prevalente en el todo el mundo, el GII.4 (Victoria *et al.*, 2009). Existe una gran variabilidad genética, principalmente por mutación puntual, en GII.4, que genera el surgimiento de nuevas variantes genéticas en intervalos regulares de tiempo que están asociadas con un importante aumento en el número de brotes, donde la emergencia de una nueva variante acaba remplazando a la dominante que circulaba en el periodo anterior (Pang *et al.*, 2010). Otro punto muy importante que esta siendo discutido actualmente, y que también está relacionado a la evolución molecular de NV y su efecto en la patogénesis del virus en humanos, es la posible ocurrencia de eventos de transmisión interespecie de NV animales a humanos. Los CV han sido detectados en un amplio rango de mamíferos incluyendo humanos, ratones, vacas y cerdos (Wang *et al.*, 2008) con una fuerte evidencia de transmisión zoonótica (Widdowson *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2012). Se sospecha que este tipo de eventos pueda ocurrir, ya que existen NV animales en los mismos Genogrupos que infectan al humano, como es el caso de las cepas de NV de león y caninos encontradas dentro del Genogrupo 4 (GIV), y principalmente las cepas de NV porcinos dentro del Genogrupo GII, el más importante epidemiológicamente para humanos (Martella *et al.*, 2008).

1.5.6 Epidemiología

La transmisión de NV es muy eficiente debido a la alta infectividad del virus, la probabilidad media de desarrollar una infección con una sola partícula viral es del 50% (Teunis *et al.*, 2008). Los individuos infectados pueden eliminar el virus en las heces después del período sintomático durante más de 20 días resultando en una posible fuente de contaminación de los nuevos casos de gastroenteritis (Rockx *et al.*, 2002). Por estas características, los brotes de gastroenteritis causados por NV ocurren principalmente en ambientes de uso colectivo, tales como hospitales, clínicas geriátricas, escuelas, cruceros y restaurantes, afectando a individuos de todas las edades (Rockx *et al.*, 2002; Widdowson *et al.*, 2005). La infección se produce por la vía de transmisión fecal-oral, siendo la ingestión de agua contaminada y alimentos dos de los principales mecanismos de infección, dando lugar a brotes de gastroenteritis en las personas que entran en contacto con estas aguas o alimentos (Hoebe *et al.*, 2004; Hewitt *et al.*, 2007; Arvelo *et al.*, 2012; Nihon *et al.*, 2012).

El patrón de estacionalidad para las infecciones de NV no está bien establecido, se producen casos de gastroenteritis aguda causada por la NV durante todo el año. Sin embargo, en países con climas templados, los picos de detección se han identificado con frecuencia en el período invernal (Patel *et al.*, 2009).

Los NV tiene una distribución bastante ubicua, detectándose tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Schnagl *et al.*, 2000; de Wit *et al.*, 2001;

Parashar *et al.*, 2004; Vardy *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008). Los NV causan cada año 900.000 de episodios de gastroenteritis aproximadamente, casos que requieren una visita a la clínica y alrededor de 64.000 hospitalizaciones en niños menores a 5 años de edad residentes en países de ingresos altos.

Si se asume que la proporción de hospitalizaciones asociadas con la diarrea infantil (\approx 124 millones) y las muertes (\approx 1,8 millones) en los países en desarrollo se aproximan a la proporción total de niños (12,1%), con enfermedad grave por NV (Patel *et al.*, 2008), NV puede causar hasta a 1,1 millones hospitalizaciones y 218.000 muertes cada año en niños en los países en desarrollo.

Estudios de caracterización molecular de NV llevados a cabo en todo el mundo, en los casos de gastroenteritis aguda, han mostrado una frecuente co-circulación de diferentes genotipos de GII y GI, pero las cepas de GII son las que tienen mayor prevalencia, representando un 75% a 100% de las cepas caracterizadas, siendo GII.4 la más frecuente. Debido a la rápida evolución de estos virus, nuevas variantes surgen con frecuencia reemplazando las variantes antiguas, diseminándose rápidamente en las diferentes regiones del mundo. Este fenómeno se ha evidenciado particularmente con las variantes de GII.4. La aparición de nuevas variantes se relaciona con un aumento considerable en el número de brotes notificados (Kroneman *et al.*, 2006; Siebenga *et al.*, 2007; Siebenga *et al.*, 2009)

En Wisconsin, USA, se realizó un estudio relevante, con un muestreo diverso y representativo que incluyó varias comunidades alimentadas por un sistema de agua público que proveía a las mismas de aguas subterráneas sin desinfección. Se relacionó la presencia de virus entéricos mediante qPCR (PCR cuantitativa) en agua de grifo de 14 comunidades con un suministro de agua subterránea no desinfectada, y la incidencia de la enfermedad aguda gastrointestinal (AGI). La incidencia de AGI fue estimada de registros sanitarios diarios completados semanalmente por los hogares dentro de cada comunidad de estudio durante cuatro períodos de 12 semanas. Se colectaron muestras de agua mensualmente a partir de cinco a ocho hogares por comunidad. Se midió la infectividad viral por cultivo celular y la presencia viral fue evaluada por qPCR. La incidencia de la AGI fue relacionada con la detección del virus utilizando la regresión de Poisson con efectos aleatorios. Las temporadas y las comunidades con mayores registros virales tenían una alta incidencia de AGI correspondiente. Esta asociación fue particularmente fuerte para los NV del genogrupo I (NV-GI) y entre la AGI en adultos y los Enterovirus cuando predominaron serotipos de Echovirus. En las concentraciones medias de 1 y 0,8 copias genómicas / L de NV-GI y Enterovirus, respectivamente, las proporciones de incidencia de AGI (por ej el riesgo relativo) aumentó en un 30%. Los adenovirus en el agua del grifo fueron bajos y no se asociaron positivamente con AGI. La fracción estimada de AGI atribuibles a los virus transmitidos por el agua del grifo fue entre 6% y 22%, dependiendo del modelo seleccionado de incidencia AGI/exposición viral, y podría haber sido tan alta como 63% entre los niños menores de cinco años de edad durante el período en que el NV-GI estaba muy presente en el agua potable. Aquí se vio que en la mayoría de los sistemas

públicos de provisión de agua subterránea en los EE.UU el agua se encontraba sin desinfectar. Estos hallazgos sugieren que las poblaciones atendidas por sistemas de este tipo pueden estar expuestos a virus transmitidos por el agua y con los consiguientes riesgos para la salud (Borchardt *et al.*, 2012).

En Brasil, varios estudios han detectado NV en los casos de gastroenteritis aguda en niños y adultos. Se han reportado altas tasas de detección alcanzando valores de 40%, como se demuestra en el estudio en Vitória, Espírito Santo (Ribeiro *et al.*, 2008). Diferentes genotipos de GI y GII se han detectado, siendo GII.4 el más frecuente (Victoria *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). Es importante destacar que el estudio de Nakagomi y colaboradores (2008) (Nakagomi *et al.*, 2008), al analizar los casos de niños hospitalizados por gastroenteritis aguda observó una gravedad similar entre los casos de gastroenteritis causadas por RVA y NV.

En un estudio de vigilancia realizado en Brasil, en el estado de San Pablo, se analizaron las infecciones causadas por RVA y NV en niños hospitalizados <5 años con gastroenteritis aguda durante un período de seis años (2004-2009). Este estudio retrospectivo, se llevó a cabo en 61 centros médicos, con muestras de heces colectadas por conveniencia, analizadas por EIA, PAGE, RT-PCR y secuenciación para caracterizar los genotipos. Las infecciones por NV y RVA se detectaron en el 29,6% (144/487) y el 29,2% (26/89) de las muestras, respectivamente. Los genotipos de RVA detectados con mayor frecuencia fueron G9P[8] en 2004, G1P[8] en 2005, G9P[8] en 2006, y G2P[4] durante los años 2007, 2008 y 2009. La tasa de detección se redujo de 36,3% (33/91) en 2004 a 4,2% (4/95) en 2009. Se encontraron NV pertenecientes al genogrupo GII en el 61,6% (16/26) de las muestras, y el 11,5% (3/26) pertenecieron a GI. Las infecciones mixtas de RVA y NV se observaron en el 2,2% (2/89) de las muestras, las cepas involucradas fueron GI + G9P[8] y GI + G2P[4]. La distribución de genotipos de RVA varió con los años, acompañada por una reducción en el número de casos detectados. Es necesaria la intensificación de la vigilancia posterior a la implantación de la vacuna para RVA, a fin de vigilar las cepas circulantes y su eficacia potencial frente a los genotipos emergentes. Los NV han sido cada vez más identificados como importantes agentes etiológicos entre niños hospitalizados y desempeñan un papel importante en la etiología viral de la gastroenteritis aguda en niños en San Pablo (Cilli *et al.*, 2011).

Por otro lado, en Nicaragua, el programa de vacunación nacional de RVA con la vacuna pentavalente RV5 (Rota teq® del laboratorio Merck) se llevó a cabo en octubre de 2006. Para determinar si la vacunación contra RVA disminuyó el número total de infecciones por este virus, se investigó la presencia de RVA y NV en aguas residuales en la ciudad de León, en el período comprendido entre julio 2007 y julio del 2008, y se comparó con los datos precedentes a la vacunación. El resultado principal fue la baja prevalencia de RVA en comparación con NV en todos los puntos de muestreo (11% vs

44%, $p < 0.05$), y la concentración de RVA fue menor en comparación con NV. Los autores concluyeron, que la introducción de la vacuna para RVA redujo la transmisión de este virus en la comunidad en Nicaragua. Sin embargo, la prevalencia de la diarrea en el país sigue siendo alta, y la alta prevalencia de NV en el hospital y las aguas residuales municipales es notable. Este estudio pone en evidencia la necesidad de una evaluación adicional de NV luego de la introducción de la vacuna contra RVA (Bucardo *et al.*, 2011).

En otro estudio realizado en Argentina, en año 2004, ocho brotes de gastroenteritis aguda se analizaron para Calicivirus Humanos (CVHs) como posibles agentes etiológicos. Los CVHs se encontraron en 39 de las 100 muestras analizadas. En 37 de las 39 muestras positivas para CVHs, se detectó NV, mientras que los dos restantes fueron positivas Sapovirus. Los análisis filogenéticos de 13 muestras positivas para NV revelaron la presencia de cepas de genogrupo GI, GII y GIV. Este estudio constituyó el primer reporte de la epidemiología molecular de CVHs humanos asociados a los brotes de gastroenteritis en Argentina (Gómez *et al.*, 2007).

En Chile, se reportó un brote en el año 2010 que duro desde el 8 de marzo al 28 de abril de ese año, con 31.026 casos. Se estudiaron muestras de materia fecal y muestras ambientales. Se detectó la presencia de NV-GII tanto en muestras ambientales como clínicas. Este brote fue causado por el consumo de verduras crudas, que fueron regadas, y por lo tanto contaminadas, con aguas residuales tratadas que contenían una baja concentración de cloro residual libre. Posteriormente, el brote se propagó de persona a persona en un ambiente sanitario deficiente (Díaz *et al.*, 2012).

1.5.7 Virología ambiental

Los NV son muy ubicuos y se encuentran en variados reservorios. Un estudio relativamente reciente que analizó la distribución de los NV en un ambiente estuarino, constató la presencia de NV en ostras, aguas superficiales y plancton (Gentry *et al.*, 2009). Las altas concentraciones de muestras de plancton con presencia de NV en comparación con las muestras de agua y de ostras proporcionan novedades inesperadas en la presencia y distribución de los NV humanos en el medio acuático (Gentry *et al.*, 2009). Ya en 1982 se relacionó a un brote que afectó a más de 1500 personas, ocurrido en Georgia (EEUU), con la presencia de los NV en aguas de consumo. Un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos contra NV se encontró en 12 de los 19 pares de sueros de los pacientes estudiados. La enfermedad por NV asociada con un sistema municipal de agua potable de gran tamaño no había sido documentada con anterioridad (Kaplan *et al.*, 1982).

Ya en un estudio más contemporáneo realizado en Argentina, se evaluó la presencia de NV en muestras de aguas residuales y aguas colectadas del río Suquía de la ciudad de Córdoba. El análisis filogenético demostró que el genotipo principal detectado era GII.4, perteneciente a la variante 2006b, la cual está ampliamente distribuida, seguido por cepas relacionadas con el virus putativo recombinante GII.g. Los NV detectados estaban filogenéticamente más relacionados con virus recientes de otros países que con las secuencias anteriores locales, lo que sugiere una rápida y amplia propagación de cepas del virus que evita que una filogenia esté geográficamente estructurada. Las muestras ambientales mostraron una mezcla de ambos tipos virales, que apunta a la co-circulación y el riesgo de infecciones mixtas y de recombinación. Este es el primer informe sobre la detección y caracterización de NV en aguas residuales en Argentina (Gomes *et al.*, 2007).

En Brasil, un estudio destacó la contaminación ambiental de los arroyos urbanos por NV en la ciudad de Manaus (Miagostovich *et al.*, 2008). Se estudió la presencia de varios virus entéricos, y NV apareció con una frecuencia de 5,8%. Posteriormente en el 2010, se realizó un monitoreo de un año colectando muestras de agua en diferentes puntos de la ciudad de Florianópolis, desde junio de 2007 a mayo de 2008. En este estudio, los NV fueron detectados en 23% (22/94) de las muestras analizadas, entre ellas: agua de mar, agua potable, agua superficial (agua salobre de arroyo y laguna) y aguas residuales tratadas. Las cargas virales medias de genogrupos GI y GII en muestras de aguas residuales tratadas fue de 297 y 440 copias genómicas (cg)/L, respectivamente, mientras que las muestras de agua de arroyos contenían 2603 y 1361 gc/L, respectivamente. Seis muestras fueron secuenciadas: dos muestras fueron GII.4, dos GII.2 y dos GI.3 (Victoria *et al.*, 2010). En el mismo año, pero en una planta de tratamiento de Rio de Janeiro, se publicó un estudio de un monitoreo durante un año de dicha planta, donde se estudio la presencia de NV. NV se detectó en siete (15%), 14 (29%) y 28 (58%) muestras usando RT-PCR, qPCR y Semined-PCR, respectivamente. Las mayores concentraciones de NV fueron detectadas en los meses más fríos, con 53.300 cg/L (copias genómicas por litro). La secuenciación de nucleótidos y el análisis filogenético reveló que cinco cepas se agruparon con cepas GI y seis con GII (Victoria *et al.*, 2010).

Los trabajos realizados en los laboratorios de vigilancia ambiental sugieren consistentemente la importancia de los estudios de virología ambiental, ampliamente documentada en el mundo y en la región desde mediados de los 90s, con más razón porque en Uruguay no existen registros publicados de monitoreos ambientales de NV , aquí yace la importancia de mi tesis como pionera en este aspecto.

1.6 Enterovirus

1.6.1 El virus: historia y estructura

El género *Enterovirus* (HEV) pertenece a la familia *Picornaviridae* y es uno de los 9 géneros que integran la misma. Dentro de EV que infectan a humanos encontramos a los Poliovirus, y a los virus no polio antes clasificados como coxsackie A y B, Echovirus y Enterovirus. Actualmente fueron reclasificados en Enterovirus A, B, C y D (Tabla 2). Son agentes etiológicos responsables de varias enfermedades (poliomielitis, miocarditis aguda y meningitis aséptica) y desempeñan un papel importante en las enfermedades crónicas comunes, como miocardiopatía dilatada y la diabetes mellitus insulino-dependiente. La identificación de los EV es esencial para la vigilancia epidemiológica, la identificación de los poliovirus (PV), el estudio de las correlaciones entre los subtipos de EV y enfermedades, la identificación de nuevos tipos de EV, y el tratamiento adecuado de las infecciones por EV en los recién nacidos y en pacientes inmunodeficientes (Palacios *et al.*, 2002). Las primeras descripciones clínicas de la poliomielitis (el mayor protagonista en la historia del género HEV) se hicieron en la década de 1800, con informes de casos de parálisis por la fiebre. En 1840, Von Heine (Heine: 1840) publicó una monografía, que describe la aflicción. Sus contribuciones y las publicaciones posteriores de Medin en 1891 (Medin :1891) condujeron a denominar la hoy conocida poliomielitis parálitica como “Enfermedad de Heine-Medin”.

TABLA 2. Clasificación de enterovirus

Taxonomía tradicional	Taxonomía actual
Poliovirus PV1-3	Human Enterovirus A (HEV-A) CAV2-8, 10, 12, 14, 16; EV71, EV76 EV89, EV90, EV91
Coxsackie A virus CAV1-22, 24	Human Enterovirus B (HEV-B) CAV9; CBV1-6; E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33; EV69, EV73-75, EV77-8, EV79-88, EV100-101
Coxsackie B virus CBV1-6	Human Enterovirus C (HEV-C) CAV1, 11, 13, 17, 19-22, 24, PV1-3
Echovirus E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33	Human Enterovirus D (HEV-D) EV68, 70
Enterovirus numerados EV68-71	

Los Enterovirus 79-101, los cuales no están incluidos aún en el International Committee on Taxonomy of Viruses classification (ICTV) se muestran en itálicas. Los saltos en la numeración son resultado de cambios en la clasificación. Desde el momento de su descubrimiento y su inicial clasificación, algunos serotipos han resultado ser idénticos a otros enterovirus (por ejemplo, coxsackievirus A15 es el mismo que coxsackievirus A11). A su vez, algunos serotipos han sido reclasificados como miembros de otros géneros de picornavirus o de otras familias virales.

Los trabajos sobre la poliomielitis han tenido un impacto considerable que sigue existiendo en el campo de la virología molecular. PV fue el primer virus animal clonado y secuenciado completamente (Kitamura *et al.*, 1981), el primer virus de ARN animales del que se construyó un clon infeccioso y el primer virus humano que tenía su estructura tridimensional resuelta por cristalografía de rayos X (Hogle *et al.*, 1985). En 1989, Mendelsohn y colaboradores (Mendelsohn *et al.*, 1989) identificaron el receptor de PV, CD155, un hallazgo que fue seguido por la generación de ratones portadores de CD155 como un transgen (Koike *et al.*, 1991; Ren *et al.*, 1990).

El virus *Coxsackie* (grupo A, CVA) fue aislado por primera vez durante una epidemia de poliomielitis en 1948 de las heces de los niños paralizados en Coxsackie, Nueva York (Dalldorf *et al.*, 1948). Estas cepas fueron obtenidas mediante la inoculación de ratones lactantes; la patogenicidad en ratones diferencia claramente a

estos virus de los PV. Al año siguiente, el primer virus *Coxsackie del grupo B (CVB)* fue aislado de casos de meningitis aséptica (Melnick *et al.*, 1949). Los aislados del grupo original de CVA producían miositis con parálisis flácida las extremidades posteriores en ratones recién nacidos, mientras que los virus CVB produjeron una parálisis espástica y una infección generalizada en ratones recién nacidos, con miositis, así como la participación del cerebro, el páncreas, el corazón y la grasa parda. En 1951, los *Echovirus (EchV)* se aislaron por primera vez de las heces de personas asintomáticas (Robbins *et al.*, 1951). El nombre de ECHO procede del acrónimo de "enteric cytopathic human orphan" o "virus huérfano citopático entérico". Estudios posteriores han demostrado que los *EchV*, de hecho, causan una variedad de enfermedades humanas. Estructuralmente, los EV contienen un genoma monocatenario de ARN de sentido positivo de 7500 pb, protegido por una cápside icosaédrica de unos 30nm de diámetro sin envoltura lipídica. El genoma codifica cuatro proteínas estructurales (VP1 a VP4) y siete proteínas no estructurales implicadas en la replicación viral y la maduración. Las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) están situadas en la superficie de la cápside, y por lo tanto contienen epítopos de anticuerpos. Como la mayoría de los miembros de la familia *Picornaviridae*, la cápside de los HEV está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (VP1-VP4), organizadas para formar una estructura icosaédrica (Kim *et al.*, 2007) (Figura 8).

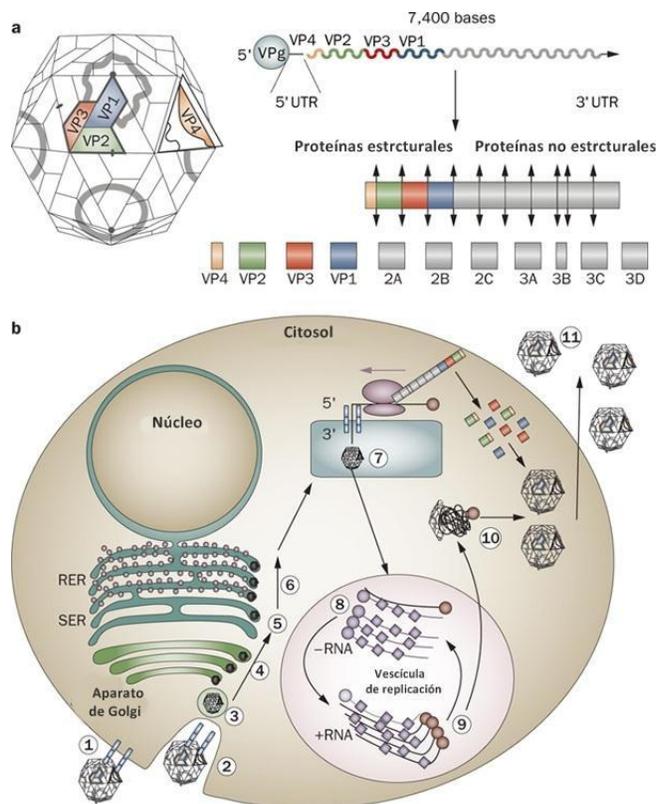


Figura 8- a) Cápside de EV: icosaédrica de 60 capsómeros, conformados de cuatro proteínas estructurales (VP1 a VP4). Genoma monocatenario de ARN sentido positivo (~ 7.400 bases). Extremo 5' unido a la proteína VPg. Único ORF, que produce cuatro proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales; b) *Replicación de Enterovirus*. Unión a un receptor específico (1), endocitosis (2), Partícula transportada por las vesículas endocíticas (3), al aparato de Golgi (4) y luego a través del Retículo endoplásmico liso (REL) (5) y el rugoso (RER) (6); ARN viral traducido en RER (7); Vesículas de replicación, (8, 9). El ARN viral es encapsidado con proteínas estructurales (10) y las nuevas partículas virales son liberadas (11) (Hober *et al.*, 2010).

1.6.2 Clasificación

El género Enterovirus (EV) dentro de la familia *Picornaviridae* está compuesto por más de 300 serotipos, la mayoría de los cuales son conocidos patógenos humanos y circulan ampliamente en todo el mundo. El género EV comprende al menos 10 especies, incluyendo 3 especies de rinovirus humanos y 4 especies de EV humanos (sigla en inglés, *HEV*) (A a D), junto con otras especies que infectan a cerdos y vacas (enterovirus bovino-en inglés, *BEV* y porcino) y primates no humanos (Hyypia *et al.*, 2005). Los aislados de cuatro especies de EV se clasificaron originalmente por sus propiedades antigénicas y patogénicas en los seres humanos y animales de laboratorio: estaban divididos en los *Poliovirus* (*PV*) (3 serotipos), los virus *CVA* (23 serotipos), los virus *CVB* (6 serotipos), los *EchV* (28 serotipos) y los *EV* 68 a 71. Más recientemente, se ha demostrado que secuencias de VP1 son predictivas del serotipo de EV y han permitido la identificación del serotipo a través de comparaciones genéticas en lugar de la laboriosa clasificación serológica (Norder *et al.*, 2001; Oberste 1999). En efecto, la secuencia de VP1 se ha considerado adecuada para la designación de nuevos tipos en la ausencia de datos serológicos por el *Internal Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV)*, *Picornavirus Study Group (PSG)* (Stanway *et al.*, 2005), lo que ha permitido a muchos otros EV ser formalmente clasificados en especies y tipos (EV 73 en adelante) sin que necesariamente exista la información de reactividad antigénica cruzada para asignar el serotipo. Estos tipos genéticamente caracterizados se han numerado cronológicamente (33 a finales de julio de 2010), dando lugar a un total combinado de 97 serotipos (Harvala *et al.*, 2011).

Se han descubierto recientemente otros picornavirus que infectan a los humanos, o que antes se consideraban EV y se reclasificaron como un género aparte. Este género es genéticamente distinto del género EV, pero comparte cierta similitud física y estructural con EV. Sobre la base de una relación genética muy baja, las diferencias en las proteínas virales y el procesamiento de las mismas, y una proteasa novedosa, los *EchV* 22 y 23 fueron reclasificados como un nuevo género, los *Parechovirus* (Ito *et al.*, (2004).

1.6.3 Patología e inmunidad

La patogenicidad de EV está mediada por un motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) el cual se encuentra en las proteínas de la cápside viral de la familia de los picornavirus (Williams *et al.*, 2004). Se han identificado alrededor de siete receptores distintos de EV a partir de células humanas: el receptor del PV (en inglés, *Polio Virus Receptor - PVR*, CD155), tres integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 6$), factor acelerador de deterioro (en inglés, *Decay-Accelerating Factor - DAF*, CD55), el receptor de Coxsackie-Adenovirus (en inglés, *Coxsackievirus and Adenovirus Receptor - CAR*), y la molécula de adhesión intercelular 1 (en inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1 ICAM-1*) (Palacios *et al.*, 2005). Típicamente, el sitio primario de la infección son las células epiteliales del tracto respiratorio o gastrointestinal. Desde el sitio de la infección primaria, los virus pueden propagarse a sitios secundarios particulares a raíz de la viremia. La infección secundaria del sistema nervioso central resulta en la meningitis aséptica o, con menos frecuencia, en encefalitis o parálisis (Palacios *et al.*, 2005). La mayoría de las infecciones por EV son asintomáticas o resultan sólo en enfermedades leves, como enfermedad febril no específica o infecciones leves del tracto respiratorio superior. Sin embargo, los EV también pueden causar una amplia variedad de enfermedades clínicas incluyendo la conjuntivitis hemorrágica aguda, meningitis aséptica, erupción cutánea indiferenciada, parálisis flácida aguda, miocarditis y enfermedad tipo sepsis neonatal (Bauer *et al.*, 2002). Los EV son los agentes etiológicos más comunes de la miocarditis viral humana y están asociados con algunos casos de miocardiopatía dilatada (MCD), la única que afecta aproximadamente de cinco a ocho personas por cada 100.000 al año en todo el mundo (Peng *et al.*, 2000). Los EV son citopáticos, la mayoría de las infecciones resultan en la destrucción de células de tejidos específicos, a pesar de que algunas manifestaciones de la enfermedad puedan ser resultado de la respuesta inmune del huésped (Palacios *et al.*, 2005). Una de las enfermedades más distintivas ocasionadas por EV es la poliomielitis. Es casi invariablemente causada por uno de los tres serotipos de PV. PV también puede causar meningitis aséptica o enfermedades secundarias no específicas (Hyypia *et al.*, 1997). La ruta normal de la infección por el virus de la polio en los hospederos naturales permisivos, comienza con una infección del sistema entérico a través de la ingestión oral del virus (Daley *et al.*, 2005). El receptor de la célula para los tres serotipos de PV es CD155, una glicoproteína que es un miembro de la super familia de proteínas de las inmunoglobulinas (Racaniello *et al.*, 2006). Las partículas virales replican inicialmente en el sistema gastrointestinal, pero la replicación en este sitio no da lugar a ninguna patología detectable (Daley *et al.*, 2005). A partir de los sitios principales de la multiplicación en la mucosa, el virus pasa a los ganglios linfáticos cervicales y mesentéricos y luego a la sangre, causando una viremia transitoria. La mayoría de las infecciones naturales de los seres humanos finalizan en esta etapa con una enfermedad leve que comprende síntomas inespecíficos como dolor de garganta, fiebre, y malestar general. Se cree que la replicación en los sitios extraneurales mantiene la viremia más allá de la primera etapa y aumenta la probabilidad de la entrada del virus en el sistema nervioso central. Tales sitios extraneurales pueden incluir grasa marrón, tejidos reticuloendoteliales, y músculo (Racaniello *et al.*, 2006). Así como se extiende la viremia, la infección de las células dendríticas y los macrófagos puede ayudar en el transporte de los virus a través de la barrera sangre-

cerebro o el transporte a lo largo de las vías neurales para infectar las células del cerebro (Daley *et al.*, 2005; Fuselli *et al.*, 2010).

1.6.4 Transmisión

Los EV se pueden encontrar en fuentes de agua tales como pozos semisurgentes, que se contaminan cuando las heces de personas infectadas entran en el agua a través de diferentes vías: desbordamientos de aguas residuales, sistemas de alcantarillado que no están funcionando correctamente, y la escorrentía de aguas pluviales contaminadas. Los pozos pueden ser más vulnerables a la contaminación después de una inundación, sobre todo si los pozos son de poca profundidad, se han excavado accidentalmente o que han sido sumergidos por las inundaciones por largos períodos de tiempo (Rotbart *et al.*, 1995).

Los EV se han encontrado en aguas superficiales y subterráneas en todo el mundo. En los trópicos, la supervivencia del virus es más prolongada en el agua subterránea, ya que es más fría que el agua superficial. En el caso de las piscinas, EV se puede encontrar incluso después de la cloración, y aún en ausencia de coliformes fecales. En los países industrializados, la transmisión de EV en agua potable al parecer es poco común, pero es una fuente constante de preocupación para los investigadores de salud pública, debido a que las condiciones habituales en las que se clora el agua potable de las ciudades puede ser insuficiente para inactivar completamente los EV (Rotbart *et al.*, 1995).

Los EV, especialmente los PV, se encuentran con regularidad en las aguas residuales. Son más frecuentes en aguas residuales de zonas con condiciones socioeconómicas precarias o con una gran proporción de niños pequeños. Además, se ha demostrado que los trabajadores de aguas residuales tienen una mayor prevalencia de anticuerpos séricos a EV que trabajadores de otras áreas (Rotbart *et al.*, 1995).

La transmisión fecal oral es el modo clásico de transmisión de enterovirus y probablemente explica los patrones de dispersión en los países en desarrollo, donde la higiene y sanidad son probablemente imperfectas incluso en los centros de atención. (Rotbart *et al.*, 1995).

Los patrones de eliminación y las vías de transmisión de los poliovirus son similares a los observados para otros enterovirus. PV es resistente a la acidez del estómago, haciendo que al intestino delgado de un medio propicio para la replicación viral después de la ingestión del virus. PV es muy eficiente en el establecimiento de la infección, y un valor de TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose 50%) tan bajo como 100 puede infectar a un bebé por vía oral. La eliminación fecal del virus se produce durante un período prolongado, a veces durante más de 6 semanas. La dispersión del virus puede ser intermitente y se ve afectada por el estado inmunológico del individuo, la cantidad y la duración de la replicación del virus puede reducirse significativamente como resultado de la inmunidad a una infección natural con PV salvaje, la vacunación con la vacuna oral (en inglés: *OPV Oral Poliovirus Vaccine*) o la IPV (en inglés: *Inactivated Poliovirus Vaccine*), o debido a infecciones entéricas que compiten. Los virus se pueden recuperar a partir de frotis de garganta y lavados durante la fase aguda

temprana de la infección, pero la secreción de virus en la saliva se produce durante un tiempo mucho más corto que la excreción fecal.

1.6.5 Evolución molecular

Entre los mecanismos evolutivos que emplean los EV para generar variabilidad genética con el fin de lograr una mejor adaptabilidad tenemos:

i) Mutación puntual. Los virus ARN, debido a la falta de capacidad correctora de la ARN polimerasa viral, presentan una elevada tasa de mutaciones puntuales por sustitución nucleotídica del orden de 10^{-4} sustituciones por sitio por año (s/s/a), lo que les permite a estos virus organizarse en cuasiespecies, es decir, circulan en el hospedero como una nube de mutantes estrechamente relacionadas entre sí (Domingo *et al.*, 2000; Kinnunen *et al.*, 1990). Ésta característica les confiere a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios.

La alta tasa de mutación de PV es del orden de 10^{-4} errores por nt por ciclo de replicación del genoma viral, debido a la baja fidelidad de la ARN polimerasa 3D de PV (3Dpol) y la ausencia de mecanismo de reparación de errores (Ward *et al.*, 1988). El error de frecuencia 3Dpol se determinó in vitro para en varios sitios en el genoma viral, pero no hubo variación significativa en los valores (Ward *et al.*, 1992). Sin embargo, la región de codificación de la cápside, con una tasa de fijación de sustituciones totales en el orden de 10^{-2} s/s/a (sustituciones por sitio por año), parece menos genéticamente estable que la región que codifica proteínas no estructurales (Combelas *et al.*, 2011; Rajal *et al.*, 2011).

Se han realizado estudios de muestras ambientales y de pacientes, para constatar la presencia de EV.

En uno de ellos, los autores determinaron la diversidad de EV mediante secuenciación una región altamente conservada VP1 (de la que hay disponibles un gran número de secuencias en *GeneBank*). La mayoría de las cepas de EV detectadas agruparon con los genotipos (o especies) conocidos disponibles en el GeneBank (HEV-A, HEV-B, HEV-C, HEV-D). En este trabajo se hace una descripción detallada de los diferentes genogrupos (ejemplo: EV71), clados (siguiendo el mismo ejemplo: C) y subgenogrupos (siguiendo el mismo ejemplo: C2) encontrados dentro de cada genotipo identificado (siguiendo el mismo ejemplo: HEV-A). Demostrando, de esta forma, la gran diversidad genética generada por mutación puntual, que poseen los EV encontrados tanto en pacientes como en el ambiente (Apostol *et al.*, 2012).

ii) Recombinación genética. Debido a la circulación simultánea de diferentes estirpes (pertenecientes o no a distintos genotipos) en un mismo hospedero, la recombinación es un importante mecanismo para la generación de diversidad genética, pudiendo ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, mayor capacidad de transmisión o más virulentas. Entre los EV los procesos de recombinación tanto intra como interserotípica son muy comunes. Los puntos de recombinación se han encontrado principalmente dentro de la VP4 (interserotípica) y dentro de 2BC (intraserotípica) (Lukashev *et al.*, 2003). Oberste y colaboradores (Oberste *et al.*, 2004), analizaron el genoma completo de las cepas de referencia de los *HEV-B* demostrando

que han existido múltiples eventos de recombinación entre ellos en la región no estructural, resultando en un complejo mosaico de secuencias. Encontraron, que la diferencia aminoacídica entre los *HEV-B* con los restantes grupos de *HEV* (A,C y D) oscila entre 42-53% para la proteína VP1., entre 33-42% para VP2 y entre 27-38% para VP3. Dentro de los *HEV-B* la similaridad aminoacídica es del 68-87% para VP1, de 93-99% para VP2 y de 94-99% para VP3. Lo que demuestra claramente que las proteínas no estructurales son muy conservadas entre los *HEV-B* siendo la 2C y la 3D las más conservadas mientras que la más variable resulto ser la 2A. La mayor variabilidad se da dentro de las proteínas de la cápside, siendo la VP1 la más variable con una identidad aminoacídica de 56-83% (Oberste *et al.*, 2004).

iii) Uso de codones. Aunque menos estudiado, las variaciones en el uso de los codones sinónimos constituyen un importante mecanismo utilizado por los virus a fin de generar variabilidad genética y adaptabilidad a sus hospederos. Debido a que el Código Genético es degenerado la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón (codones sinónimos). Esos codones codificantes de un mismo aa no son utilizados equitativamente por muchos organismos, lo que origina la presencia de un sesgo en el uso de los codones sinónimos. Para explicar la presencia de dicho sesgo se han desarrollado 2 modelos: 1) El modelo traduccional o seleccionista, según el cual existe una co-adaptación entre el uso de codones sinónimos y la abundancia relativa de los ARN de transferencia (ARNt), a fin de optimizar la eficiencia traduccional, dándose una correlación entre el uso de codones y la expresión de los genes., 2) Por otra parte el modelo mutacional o neutral, establece que la composición genética está influenciada por la probabilidad de que una mutación se fije por deriva génica. Ambos modelos no son mutuamente excluyentes. Comprender el alcance y las causas del sesgo en el uso de codones es esencial para comprender la evolución viral y en particular la interacción virus-célula hospedera, así como la interacción del virus con la respuesta inmune.

1.6.6 Epidemiología

A pesar de la naturaleza casi omnipresente de las infecciones por EV y la gran variedad de presentaciones clínicas, las características demográficas de las diferentes infecciones y las enfermedades tienen algunas características en común. En particular, varios factores, incluyendo edad, sexo y nivel socioeconómico, tienen efectos en gran parte predecibles.

La excreción de EV no implica necesariamente la asociación con la enfermedad, ya que la mayoría de las excreciones son asintomáticas. Esto se aplica particularmente a los países en desarrollo, donde los EV son ubicuos y las infecciones infantiles son comunes y generalmente silenciosas.

La actividad de EV en las poblaciones puede ser esporádica o epidémica, y ciertos tipos de EV se asocian con la ocurrencia de enfermedades tanto esporádicas como epidemias. La prevalencia reportada de una determinada enfermedad por EV puede verse incrementada real o artificialmente en una situación de brote repentino, cuando el foco de la atención mejora el diagnóstico y notificación de casos, pero esto también puede aumentar la notificación de ausencia de casos. Además, puede haber una tendencia de otras cepas a ser excluidas cuando una cepa particular es predominante en una comunidad, sin embargo, en grandes comunidades con enfermedad enteroviral de verano, típicamente se observa la co-circulación de varios tipos diferentes de forma simultánea y en ausencia de un patrón particular (Fields: 5 ed, 2007).

Un concepto importante en la comprensión de la epidemiología de EV es la variación: por serotipo, por tiempo, por ubicación geográfica, y por enfermedad. Este concepto se ilustra en los estudios de vigilancia de las infecciones por EV no-polio (Fields: 5 ed, 2007).

La variación según la ubicación es también una característica importante de EV. Los brotes pueden ser restringidos a pequeños grupos (por ejemplo, las escuelas y guarderías), comunidades selectas, o pueden llegar a ser difundidas a nivel regional, nacional o incluso internacional. Los brotes en grupos pequeños a veces pueden estar vinculados epidemiológicamente a una ruptura en las prácticas de higiene (Fields: 5 ed, 2007).

En los climas templados, los EV son detectados con mayor frecuencia durante el verano y principios del otoño, aunque los brotes pueden continuar en el invierno. De hecho, la circulación de EV tiene un patrón estacional, que varía según el área geográfica. En cambio, los PV atenuados (la mayoría de cepas vacunales) son aislados durante todo el año, lo que refleja la administración rutinaria de la vacuna contra la poliomielitis a los niños.

En las zonas tropicales y semitropicales, las tendencias de circulación tienden a ser todo el año o asociadas con la temporada de lluvias. En USA, 10 años de vigilancia indican que el 82% de los aislamientos de EV se hicieron durante los cinco meses de verano o en el otoño de junio a octubre. En un estudio de 6 años de la enfermedad viral del SNC (Sistema Nervioso Central), el 85% de las enfermedades por EV, en comparación con el 12% al 26% de las enfermedades causadas por otros agentes virales, se produjeron entre junio y noviembre (Moore *et al.*, 1982).

Muchos estudios han examinado la prevalencia de anticuerpos contra EV en poblaciones específicas con varias conclusiones importantes. En primer lugar, el número de personas que tienen anticuerpos neutralizantes contra cualquier EV dado,

es grande, lo que indica una alta incidencia de infección en el pasado. Una alta incidencia de infección reciente, también fue sugerida por los estudios de anticuerpos IgM contra EV, que normalmente muestran un 4% a 6% de positividad. En segundo lugar, las infecciones con un serotipo de EV pueden aumentar los títulos de anticuerpos contra otros serotipos de EV como fue medido por IgM o neutralización. El patrón de la respuesta heterotípica varía por serotipo y entre los individuos.

Los estudios sobre la epidemiología molecular de EV no-polio se han centrado en la inferencia evolutiva derivada de la comparación de las cepas del virus dentro de un serotipo en el tiempo, así como la comparación de las cepas de diferentes serotipos, e incluso entre diferentes géneros dentro de *Picornaviridae*. Se han reportado estudios de epidemiología molecular mediante secuenciación para *CVB1*, *CVB5*, *EchV 30*, y *EV71* (Brown *et al.*, 1999; Drebot *et al.*, 1999; Kopecka *et al.*, 1995; Oberste *et al.*, 1999). Uno de los estudios de cepas de *CVB5* examinó el patrón de cambios genéticos en tres brotes separados en USA. La secuencia de nucleótidos a partir de aislados múltiples de la epidemia, demostró que cada una de las epidemias fue causada por un solo genotipo (Oberste *et al.*, 1999).

El genotipo de *CVB5* observado en la epidemia de 1967 mostró una mayor similitud con el virus observado en la epidemia de 1983 que con los virus aislados durante los años intermedios (Kopecka *et al.*, 1995), lo que sugiere la transmisión discontinua de la epidemia de *CVB5* en los Estados Unidos durante este tiempo. De manera análoga, genotipos de *EchV 30* han demostrado una sucesión solapada entre los aislamientos caracterizados en los Estados Unidos (Ogra *et al.*, 1971). Se puede encontrar más de un genotipo en ciertos períodos, y el genotipo desplazado se puede encontrar en otras partes del mundo, después de haber cesado en aislamientos en USA durante muchos años. En los estudios de *EV71*, tres genotipos distintos se han caracterizado (Brown *et al.*, 1999). A diferencia de la situación con *EchV 30* y más similar al del ejemplo de *CVB5*, la transición de un genotipo a otro se produjo durante un solo año, 1987, y el genotipo más antiguo no ha sido aislado en los Estados Unidos todavía a pesar de que si ha sido aislado en otras partes del mundo.

En 1988, la Asamblea Mundial de la Salud resolvió erradicar la poliomielitis en todo el mundo (CDC: 2011). La vacuna atenuada antipoliomielítica oral *OPV* tiene muchas ventajas que favorecen su uso para la erradicación de la poliomielitis: se administra fácilmente por vía oral, confiere inmunidad intestinal haciendo a los que recibieron recientemente la *OPV* resistentes a la infección por PV salvaje (en inglés, *Wild type Poliovirus - WPVs*), proporciona protección a largo plazo contra la enfermedad parálitica a través de inmunidad humoral duradera, y es barata. A pesar de sus muchas ventajas, con el uso de la *OPV* se corre el riesgo de aparición de casos raros de poliomielitis parálitica asociada a la cepa vacunal entre los receptores inmunológicamente normales de la *OPV* y de sus contactos, y el riesgo adicional para la aparición de PV derivados de la vacuna. Debido a estos riesgos, el uso de la *OPV* se suspenderá en todo el

mundo una vez que el objetivo de erradicar la transmisión de todos los *WPVs* se logre. El virus vacunal puede causar brotes de poliomielitis en zonas de baja cobertura de *OPV* y puede replicar por años en las personas inmunodeficientes, por lo tanto, las estrategias para fortalecer la vacunación global para *PV* y la vigilancia, son necesarios para limitar el surgimiento de poliovirus derivados de vacuna *VDPV* (en inglés: *vaccine-derived polioviruses*) (CDC: 2011).

Durante la replicación, la vacuna oral contra la poliomielitis puede revertir a una forma neurovirulenta y causar poliomielitis paralítica. En vacunados individuales, puede adquirir mutaciones puntuales específicas que revierten a formas neurovirulentas, lo que lleva a poliomielitis paralítica asociada a la vacuna (*PPV*). Con más tiempo de replicación, *OPV* puede mutar en poliovirus derivados de la vacuna (*VDPV*), que causan brotes de poliomielitis similares a los causados por poliovirus salvaje. Después de la erradicación del poliovirus salvaje, una eliminación segura de la vacunación probablemente requiera el uso global de la vacuna antipoliomielítica inactivada (*IPV*) hasta el cese de la circulación de la *OPV* (Troy *et al.*, 2011).

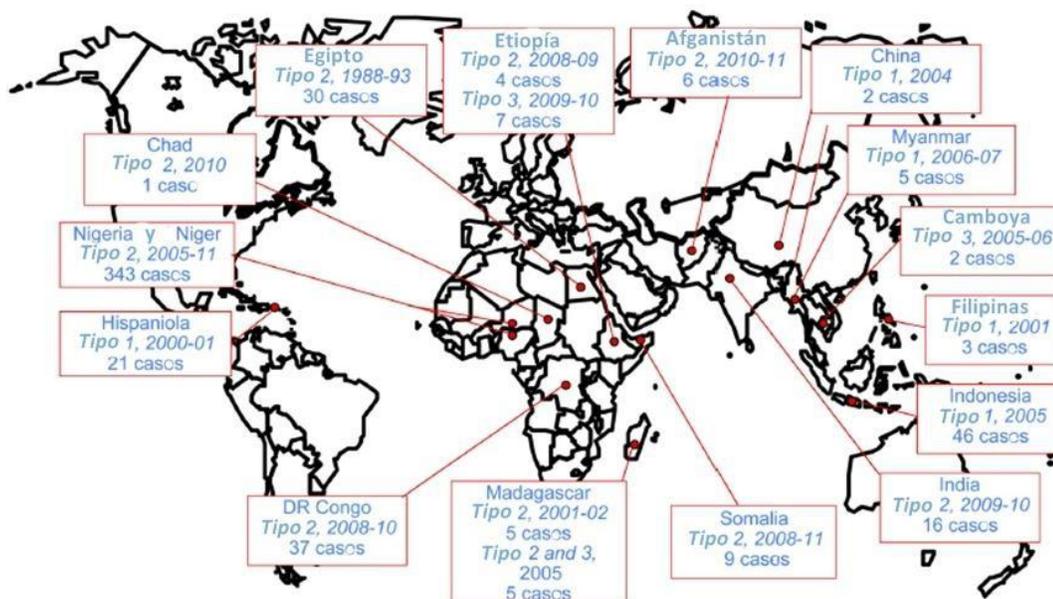


Figura 9-Brotes de Poliomielitis reportados debido a poliovirus circulantes derivados de vacuna (cVDPVs) desde 1988. Se indica: País, tipo de cVDPV, año del brote y número de casos reportados. Datos disponibles al 3 de mayo de 2011 en WHO/HQ (Combela *et al.*, (2011).

En México, donde los niños reciben la vacuna de rutina, pero en donde la *OPV* se administra dos veces al año durante los días nacionales de inmunización (en inglés: *National Immunization Day-NID*), existe un entorno natural para estudiar la duración de la circulación de la *OPV* en una población principalmente vacunada con la *IPV*. Se desarrolló un ensayo de PCR en tiempo real para detectar y distinguir *OPV* serotipo 1 con y sin reversión (*OPV-1*), *OPV-2*, y *OPV-3* a partir de ARN extraído directamente de heces y aguas residuales. Las muestras de heces de 124 niños y 8 muestras de 1 litro de agua residual de Orizaba, Veracruz, México, fueron recogidas de 6 a 13 semanas después de un *NID* y se analizaron. Se encontraron *OPV-1* con reversiones en las heces a las 7 y 9 semanas, y *OPV-2* y *OPV-3* sin reversiones fueron encontradas en las heces de dos niños de 10 semanas después del *NID*. *OPV-1* con reversión y *OPV-2* y -3 sin reversión, se detectaron en las aguas residuales a las 6 y 13 semanas después del *NID*. El ensayo de PCR en tiempo real fue capaz de detectar pequeñas cantidades de *OPV*, tanto en las heces como en las aguas residuales, y de distinguir los serotipos con reversión y sin reversión, y demostró que la *OPV* sigue circulando por lo menos 13 semanas después de un *NID* en una población mexicana vacunada rutinariamente con *IPV* (Troy *et al.*, 2011) (Fig. 9).

Un importante estudio de vigilancia en muestras de materia fecal realizada en Argentina, fue publicado en 2007, donde se tuvo un panorama de distintos EV humanos polio y no-polio circulantes entre 1991 y 1998. Este estudio describe los resultados de la detección de los enterovirus humanos (*HEV*); su aislamiento mediante cultivo celular, detección por PCR y posterior tipificación molecular en 2167 muestras obtenidas de parálisis flácida aguda, meningitis aséptica y encefalitis aguda. EV fue aislado en 130 de los 666 casos (19,5%) y en 36 de 666 (5,4%). El ARN de EV fue detectado en 28,8% (231/801) y en el 3,0% (21/700) de los pacientes con meningitis y encefalitis, respectivamente. Se identificaron *EchV4*, *EchV9*, *EchV30* y *EchV17* de los brotes de meningitis. Se recuperaron *CVA2*, *CVB2*, *CVB5*, *EchV7*, *EchV11*, *EchV19*, *EchV24*, *EchV29* y *EV 71* sólo de casos esporádicos. Tres serotipos diferentes fueron identificados en pacientes con encefalitis *EchV4*, *EchV7* y *EchV24*. Un total de 28 serotipos diferentes de EV no-polio se detectaron en casos de parálisis flácida aguda. (Cisterna *et al.*, 2007).

Recientemente en Brasil, se publicó un estudio de vigilancia de EV no polio como agentes etiológicos de meningitis. Se sabe que los virus no-polio son responsables de más del 80% de las meningitis virales en las que se identifica el agente etiológico. En el estudio, se mostró la frecuencia de meningitis producida por EV en Brasil desde diciembre de 1998 a diciembre 2003. Los EV fueron aislados en 162 (15,8%), de un total de 1.022 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) analizadas. *EchV 30* fue identificado en 139 de estas cepas (139/162-85.2%). Otros EV identificados fueron:

CVB5 (3,7%), *EchV 13* (3,7%), *EchV 18* (3%), *EchV 6* (1,2%), *EchV 25* (1,2%), *EchV 1* (0,6%), y *EchV 4* (0,6%). A lo largo del período de vigilancia, cinco brotes de meningitis viral fueron confirmados: cuatro en el sur de Brasil y uno en el noreste de Brasil. *EchV 30* fue responsable de cuatro de los cinco brotes, mientras que *EchV 13* causó el quinto. Además de los brotes, 734 casos esporádicos también fueron identificados durante el período de estudio y 59 de ellos fueron positivos para el aislamiento del virus (8%). *EchV 30* representó el 70% de los aislamientos. Los resultados de este estudio mostraron que *EchV 30* fue el agente etiológico más frecuente de meningitis viral en Brasil, causando brotes y casos esporádicos (Dos Santos *et al.*, 2006).

1.6.7 Virología ambiental

Regionalmente existen estudios de vigilancia de circulación de EV en cuerpos de agua contaminados de países latinoamericanos como Ecuador, Perú, Chile, Brasil y Argentina. Y otros estudios llevados a cabo en EEUU. Muchos han hecho hincapié en la vigilancia de cepas vacunales de PV que como se ha observado en algunos trabajos (Kew *et al.*, 2004; Cherkasova *et al.*, 2003), cepas atenuadas de la vacuna han aumentado la virulencia y se han registrado brotes de poliomeilitis actual en varios países del mundo (CDC :2011).

En Hawaii, se realizó entre junio de 2010 y octubre de 2011, un monitoreo para la detección de EV en aguas ambientales. Se muestrearon playas, ostras y agua residual de una planta de tratamiento. La evaluación ambiental realizada, indicó que once de veintidós sitios de muestreo estaban contaminados con EV. EV se detectó en el tejido de mariscos de seis de los nueve sitios de playa testeados. De los 16 productos de PCR de EV secuenciados, 12 fueron identificados como CV A o B humanos (incluyendo EV humano 90). También fue detectado EV humano 68 y 2 *EchV* humanos (Connell *et al.*, 2012).

En Ecuador, se realizó un estudio para determinar la circulación de *VDPV* en aguas residuales de zonas con más riesgo de infección por PV debido a la cobertura irregular de vacunación y con un número bajo de casos de parálisis flácida aguda reportados. De las 14 muestras ambientales colectadas y analizadas para determinar la presencia de PV, 13 (93%) tenían efecto citopático (en inglés: *cytopathic effect CPE*) en células RD (en inglés: *rhabdomyosarcoma*), y seis (43%) eran CPE-positivas sobre las células L20B. Los PV se confirmaron en los seis cultivos de células L20B-positivas tanto por neutralización con un pool de anticuerpos polivalentes tipo 1, 2 y 3., y por RT-PCR utilizando cebadores PV-específicos. La secuenciación completa de los genes de VP1 de estas cepas de PV reveló que todas eran idénticas a las cepas Sabin de OPV (> 99% de similitud de secuencia) (Dayan *et al.*, 2004).

En Argentina, en la provincia de Córdoba, se realizó un estudio de monitoreo del virus de la poliomeilitis en aguas residuales de poblaciones con diferentes esquemas de vacunación (la vacuna antipoliomielítica oral (OPV) o la vacuna antipoliomielítica

inactivada (*IPV*), entre mayo de 2005 y abril de 2006. Desde enero de 2003 a diciembre de 2005, Córdoba utilizó *IPV* para la vacunación infantil de rutina, con la excepción de uso intermitente de la *OPV* en agosto de 2005. Entre mayo de 2005 y abril de 2006, se recogieron muestras semanales de aguas residuales en la ciudad de Córdoba y tres grandes ciudades de la provincia, donde se hizo uso continuado de *OPV* en todo momento. Durante los meses de uso de *IPV* en Córdoba Ciudad, la proporción total de muestras positivas para PV fue de 19%. Durante el uso intermitente de *IPV* y *OPV*, la proporción aumentó a 100% en 2 meses. Durante los 3 meses en los cuales se volvió a introducir la *IPV* para sustituir a la *OPV*, una proporción sustancial de las muestras (25%) se mantuvo positiva para PV. En los sitios que se usó la *OPV*, en promedio, el 54% de las muestras fueron positivas para PV. Setenta y siete por ciento de los aislamientos de PV mostraron al menos una mutación en la secuencia que codifica para VP1., la máxima divergencia genética de la cepa Sabin fue de 0,7%. Varias cepas mostraron mutaciones en los marcadores de atenuación en la región codificante de VP1. La frecuencia o el tipo de mutación del virus no fue diferente entre los períodos de uso *IPV* y *OPV* o por los serotipos de virus. Este estudio indica que la transmisión sostenida del virus de la *OPV* se limitó durante el uso de *IPV* en un país de ingresos medios con un clima templado. La continua importación de PV y de la inestabilidad genética de las cepas de la vacuna, incluso en la ausencia de circulación sostenida, sugieren que la alta cobertura de la vacuna de PV tiene que ser mantenida para todos los países hasta que el riesgo de reintroducción de PV salvaje, o bien derivado de vacuna, sea cercano a cero en todo el mundo (Mueller *et al.*, 2009).

En Brasil, uno de los únicos y primeros estudios de detección de EV en aguas residuales se publicó en este mismo año. La detección molecular de estos virus se llevó a cabo en muestras de aguas superficiales recogidas del Arroyo Diluvio, un cuerpo de agua que atraviesa la ciudad de Porto Alegre (Rio Grande del Sur), recibiendo grandes volúmenes de aguas residuales sin tratar en el área de un gran centro urbano. El muestreo se realizó durante el año 2009, en tres instancias distintas (enero, abril y setiembre). La tasa de detección para EV fue de 64,28% (Vecchia *et al.*, 2012).

En lo relativo a nuestro país, hasta la fecha no hay datos de circulación de RVA, NV y EV en el ambiente, por lo cual este trabajo será el primero en aportar información sobre la circulación de estos patógenos en aguas del Río Uruguay.

2. Objetivos

2.1 General:

Estudiar y analizar por primera vez la presencia de virus gastroentéricos en cuatro puntos estratégicos claves del Río Uruguay a fin de determinar las relaciones filogenéticas existentes entre éstos durante el período de un año.

2.2 Objetivos específicos:

1. Desarrollo de metodologías para concentración de virus en aguas.
2. Implementación de la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para la detección de los genomas de rotavirus, norovirus y enterovirus en ecosistemas acuáticos. De la misma manera desarrollar la puesta a punto de la cuantificación por la técnica de PCR en tiempo real o qPCR.
3. Analizar la presencia de Rotavirus, Norovirus y Enterovirus en muestras de agua extraídas del río Uruguay provenientes de 4 puntos: Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos; la cuales se obtendrán quincenalmente entre los meses de mayo de 2011 a abril de 2012.
4. Documentar la prevalencia de virus en muestras ambientales, comparar su presencia en distintos puntos altamente poblados del río Uruguay.
5. Realizar estudios filogenéticos, de variabilidad genética, evolutivos, y bioinformáticos de secuencias de Norovirus, Rotavirus y Enterovirus en las aguas del río Uruguay a fin de conocer en profundidad las estirpes que circulan durante cada período estacional, establecer su genotipo o la existencia de nuevas variantes genéticas, compararlas con estirpes de otras regiones del mundo, etc.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención de muestras: Se realizaron colectas quincenales en el período comprendido entre marzo de 2011 y febrero de 2012. Las mismas fueron realizadas en la zona de salida o eliminación de aguas residuales al río Uruguay, en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos. Se colectaron 40 ml en cada punto. En Bella Unión la colecta de muestras se hizo a la salida de un lagunaje de pre-tratamiento facultativo. En Salto, Paysandú y Fray Bentos, se colectaron aguas residuales no tratadas vertidas directamente al río Uruguay.

3.2 Concentración Viral: La concentración de los virus en las muestras de agua residual fue realizada mediante la técnica de ultracentrifugación siguiendo el protocolo de Pina y colaboradores (1998), con modificaciones. Brevemente, fueron centrifugados 40 mL de muestra a 100.000 xg por una hora a 4°C. El pellet fue eluído en 3,5 mL de tampón glicina 0,25 N (pH 9,5) e incubado en hielo por 30 minutos con agitación cada 5 minutos. Posteriormente, fueron adicionados 3,5 mL de PBS 2X (pH 7,2) y centrifugados a 12.000 xg por 15 minutos. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 100.000 xg por 1 hora a 4 °C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 200 µL de PBS 1X y almacenado a -70 °C para su posterior análisis.

3.3 Control Interno: Antes de realizar la concentración viral, todas las muestras fueron inoculadas con 500 µL del bacteriófago PP7 como control interno de todo el proceso: concentración, extracción, RT y PCR

3.4 Extracción del ARN viral: El RNA viral fue extraído a partir de 140 µL de la muestra concentrada mediante la utilización del kit comercial “QIAamp® Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.5 Síntesis del ADN copia (ADNc), Transcripción Reversa: La síntesis de ADNc se realizó a partir de 5 µl del ARN obtenido a partir de la extracción. La síntesis del ADNc fue realizada utilizando cebadores hexaméricosrandómicos (SBS Genetech Co., Ltd.) y la enzima Transcriptasa Reversa “RevertAid™” (Fermentas), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.6 Detección mediante PCR cualitativa: Todas las reacciones de PCR cualitativas fueron realizadas utilizando la enzima “Maxima® Hot StartTaq DNA Polymerase”, 10X Maxima® Hot StartTaq Buffer, 25mM de MgCl₂ (Fermentas), Mix de dNTPs 10mM (Bioron International) y agua libre de nucleasas (AMRESCO®). Los cebadores utilizados fueron adquiridos en la empresa Integrated DNA Technologies, IDT® y se utilizaron a una concentración de 10µM.

3.6.1 Detección del PP7 por PCR cualitativa: La detección del control interno PP7 fue realizada por PCR utilizando los cebadores 247f y 320r: tamaño esperado del producto de PCR de 73 pb, de acuerdo al protocolo descrito por Rajal y cols *et al.*, 2007.
Mix para 1 reacción:

Agua	12 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	0,8 µL
dNTP's 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	2,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,2 µL
Molde de ADNc	5,0 µL

Condiciones de ciclado: 94°C durante 2 minutos. Luego 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 60 segundos, 72°C por 30 segundos. Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

3.6.2 Detección de RVA por RT-PCR cualitativa: La detección de RVA fue realizada mediante la amplificación parcial de los genes que codifican para VP4 y VP7.

En el caso de VP4, se realizó una PCR semi anidada utilizando los cebadores consensuales 4con3 (sentido) y 4con2 (antisentido) (Gentsch *et al.*, 1992) para el primer "round" de PCR: tamaño esperado del producto de 876 pb. Para el segundo "round" de PCR, se utilizaron los siguientes cebadores: 4con3 (sentido) y 1T-1, 1T-1Wa, 1T-1VN, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1, ND2 y p4943 (antisentido), diseñados para la detección específica de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11] y P[14] (W.H.O., 2009).

En el caso de VP7, se realizó una PCR semi anidada utilizando los cebadores consensuales 9con1 (sentido) y 9con2 (antisentido) para el primer "round": tamaño esperado de producto de 904 pb (Das *et al.*, 1994., Fischer *et al.*, 2000). Para el segundo "round" fueron utilizados los cebadores 9con1 (sentido) y 9T-1, 9T-2, 9T-3, 9T-4, 9T-9, FT5 (antisentido)., diseñados para la detección específica de los genotipos G1, G2, G3, G4, G9 y G5, respectivamente (WHO, 2009).

Tanto en el caso de VP4 como de VP7, los cebadores antisentido utilizados en el segundo "round" de PCR originan fragmentos de distinto tamaño en función del genotipo G y/o P que se amplifique (ANEXO1-Tabla 7) y determinan los genotipos de la cepa de RVA.

Reacción de genotipaje para G y P.

Mix para 1 reacción de primer round:

Agua	15,6 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	1,6 µL
dNTP's 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	1,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,3 µL
Molde de ADNc	2,5 µL

Mix para 1 reacción de segundo round:

Agua	17,1 µL
Buffer 10X	2,5 µL

MgCl ₂ 50mM	1,6 µL
dNTP's 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	1,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,3 µL
Molde Producto 1er round	1,0 µL

Condiciones de ciclado para ambos rounds: 95°C durante 4 minutos. Luego 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, y 72°C por 60 segundos. Extensión final de 10 minutos a 72°C.

A fin de poder secuenciar VP4 y VP7 los productos se realizó un segundo "round" de PCR a partir del producto de la PCR realizada con los cebadores consensuales. En este segundo "round" fueron utilizados los cebadores VP4-F/VP4-R y VP7-F/VP7-Rdeg para los genes VP4 y VP7, originando fragmentos de 663pb y 881pb, respectivamente (Iturriza-Gomara OMS 2009).

Mix para 1 reacción de Amplificación de G y P para secuenciar:

Agua	16,7 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	2,0 µL
dNTP's 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	1,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,3 µL
Molde Producto 1er round	1,0 µL

Condiciones de ciclado: 95°C durante 3 minutos. Luego, 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, 50°C por 60 segundos para P y 52°C para G, y 72°C por 60 segundos. Extensión final de 10 minutos a 72°C.

3.6.3 Detección de NV GI y GII por PCR cualitativa: Para la detección de NV fue realizada una PCR semi anidada para los genogrupos GI y GII (Kitajima *et al.*, 2010), que amplifica el gen de la cápside de NV. El primer "round" fue realizado con los cebadores COG1F y G1SKR para la detección del GI y con los cebadores COG2F y G2SKR para la detección de GII: tamaño de productos esperados de las PCR de 380 y 390 pb respectivamente. El segundo "round" fue realizado utilizando los cebadores G1SKR y G1SKF para el GI y G2SKR y G2SKF para el GII: tamaño de productos esperados de PCR de 330 y 340 pb respectivamente.

Mix para 1 reacción de primer round de NV GI y GII

Agua	13,1 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	1,6 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	1,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,3 µL

Molde de ADNc 5,0 µL

Condiciones de ciclado: 95°C durante 4 minutos. Luego 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, y 72°C por 60 segundos. Extensión final de 10 minutos a 72°C.

Mix para 1 reacción de segundo round de NV GI y GII

Agua	16,1 µL
Buffer 10X	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	1,6 µL
dNTP 10mM	0,5 µL
Cebadores 10µM	1,0 µL de c/u
Enzima (5U/µL)	0,3 µL
Molde Producto 1er round	5,0 µL

Condiciones de ciclado: 95°C durante 3 minutos. Luego 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, y 72°C por 60 segundos. Extensión final de 10 minutos a 72°C.

3.7 Productos de PCR enviados a secuenciación: En el caso de NV se enviaron a secuenciar los productos obtenidos del segundo “round” de las PCR utilizadas para la detección de GI y GII.

Controles positivos y negativos fueron utilizados durante todos los procedimientos desde la extracción del ARN viral. Se siguieron estrictamente todos los protocolos de manipulación requeridos para evitar contaminaciones durante el procesamiento de las muestras. Los controles positivos para RVA y NV GI y GII fueron proporcionados por el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Osvaldo Cruz de Río de Janeiro, dirigido por el Dr. José Paulo Gagliardi Leite. El control positivo de EV fue proporcionado por el MSc. Ricardo Recarey del Centro de Investigaciones Nucleares de Facultad de Ciencias.

3.8 Electroforesis en geles de agarosa: Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las electroforesis se realizaron con las siguientes condiciones: 100 Volts por 1 hora y 20 minutos, y con una concentración del gel de agarosa al 3% en Buffer TAE 1X. Para la visualización de los productos de PCR, fue utilizado el agente intercalante de ácidos nucleicos “GoodView™ NucleicAcidStain” (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.), el cual fue incorporado en el gel antes de su solidificación. Este agente intercalante una vez unido al ADN, al ser expuesto a luz UV en un transiluminador, emite fluorescencia, permitiendo visualizar en el gel el fragmento de ADN generado por la PCR. 2 µL de 5x “DNA Loading Bufferblue” (BIOLINE®) fueron adicionados a 10 µL de producto de PCR para aumentar su densidad y permitir su visualización antes de la aplicación de dicho producto de PCR en los pocillos del gel, además permite tener una idea de la migración de los diferentes fragmentos de ADN en el gel durante la electroforesis.

Los geles fueron visualizados en transiluminador de luz ultravioleta (CleverScientific Ltd.) y la fotografía fue registrada mediante el sistema de captura de imagen “FOTODYNE Incorporated FOTO/Analyst® Express”.

3.9 Purificación y secuenciación: Las purificaciones de los productos de PCR fueron realizadas utilizando el kit comercial “AxyPrep™ PCR Cleanup Kit” (AXYGEN®). El kit “AxyPrep™ DNA Gel Extraction kit” (AXYGEN®) fue utilizado para purificar la banda del tamaño esperado directamente del gel de agarosa cuando además del amplicón esperado también se observaron bandas inespecíficas. En ambas ocasiones se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron enviados al “Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo” para obtención de su secuencia de ADN. Se secuenció en ambos sentidos con respecto a la hebra molde.

3.10 Cuantificación viral mediante PCR en Tiempo Real: Las muestras positivas mediante la técnica de PCR convencional fueron cuantificadas utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real con tecnología TaqMan®.

Para la realización de las PCR cuantitativas fue utilizado el kit “SensiMix™IIProbe Kit” (BIOLINE) siguiendo las indicaciones del fabricante, y el termociclador “Rotor Gene Q” (Qiagen®). Se utilizó como molde 5 µL del producto de la Transcripción Reversa con cebadores randómicos (detallada anteriormente) conteniendo ADNc. Estos fueron añadidos al mix de PCR (1 mix por cada virus, y en caso de NV 1 mix por genogrupo), el cual contenía 12,5 µL de 2X SensiMix™IIProbe en una concentración final de 1X, 10 µM de cebadores sentido y antisentido con respecto a la hebra molde (a una concentración final de 400 nM para RVA y NV y 800 nM para EV), 10 µM de sonda (en el caso de RVA y NV a una concentración final de 200 nM para cada una de las sondas y para EV a una concentración final de 400 nM). Para cada reacción se agregó el volumen de agua estéril libre de nucleasas (AMRESCO®) necesario para llevar la reacción a un volumen final de 25 µL.

En cada caso, la fluorescencia se midió en cada paso de annealing y el Ct fue calculado determinando el punto al cual la fluorescencia excede el límite umbral.

3.10.1 Cuantificación de RVA: Los RVA fueron cuantificados utilizando los cebadores NSP3-F y NSP3-R que amplifican un segmento de 86 pb del gen que codifica para la proteína NSP3, de acuerdo con el protocolo descrito por Zeng y colaboradores (2008). Condiciones de ciclado: Desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, luego 45 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 60 segundos a 60°C para el annealing y la extensión.

3.10.2 Cuantificación de EV: Para la cuantificación de los EV fueron utilizados los cebadores EV-rtF y EV-rtR que amplifican un segmento de 149 pb dentro de la región 5'UTR, de acuerdo con el protocolo descrito por Oberste y colaboradores (2010). Condiciones de ciclado: Desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, luego 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 60 segundos a 50°C para el annealing y la extensión.

3.10.3 Cuantificación de NV GI y GII: La cuantificación de NV fue realizada de forma independiente para cada genogrupo, siguiendo el protocolo descrito por Kageyama y colaboradores (2003). Para cuantificar el GI se utilizaron los cebadores COG1F y COG1R (que amplifican un segmento de 106 pb) y para GII se utilizaron los cebadores COG2F y COG2R (que amplifican un segmento de 118 pb). Ambos pares de cebadores amplifican una región de la unión del ORF1 con el ORF2. Condiciones de ciclado para ambos genogrupos: Desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, luego 45 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 60 segundos a 50°C para el annealing y la extensión.

Para cada virus, los valores de Ct de las muestras de las PTAR fueron extrapolados en la curva estándar correspondiente y así se calculó el número de copias para cada reacción.

En el ANEXO 1- Tabla 8 se detallan las secuencias, “quenchers”, y fluoróforos de cada sonda utilizada para la cuantificación de cada uno de los virus estudiados.

3.11 Estandarización de las PCR cuantitativas: Para lograr las curvas patrón para cuantificar cada uno de los virus de este estudio se clonaron los blancos de amplificación en vector pJET1.2/blunt para generar cantidades conocidas de ADN plasmídico molde a ser usadas como estándares. Para ello se utilizó el kit CloneJET PCR Cloning de Fermentas (Fermentas LifeSciences Inc., Hanover, MD) y bacterias *E. coli* XL-1 Blue competentes (Anexo 3).

Los insertos para RVA, EV, NV GI y GII fueron obtenidos utilizando los cebadores que se detallan para cada virus en la sección anterior “Cuantificación viral mediante PCR en Tiempo Real” en **Materiales y métodos**. Se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos y las siguientes condiciones de ciclado para obtener los insertos:

El análisis de las colonias obtenidas fue realizado mediante rastreo por PCR utilizando los cebadores específicos para amplicón según fuera el caso. Las condiciones utilizadas para preparar el mix de reacción fueron las mismas que para la obtención de los fragmentos clonados.

Los clones positivos fueron crecidos en medio LB con ampicilina durante toda la noche en agitador a 37°C para luego extraer el ADN plasmídico, lo cual se realizó por el **método** de fenol-cloroformo según protocolo modificado de Sambrook (1989) (Anexo 3). La estimación de la cantidad obtenida de ADN plasmídico fue mediante la comparación de la intensidad de los amplicones con otros de concentración conocida en geles de agarosa.

Se corroboró la correcta extracción de ADN plasmídico mediante PCR y los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

Luego, se procedió a realizar las diluciones seriadas estándares y se realizó con las mismas las PCR cuantitativas para cada virus. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y se incluyeron controles negativos en cada experimento.

Se obtuvo una curva estándar para cada virus. Se calculó el coeficiente de linealidad y la pendiente de cada curva estándar.

3.12 Análisis Filogenético: El programa SeqMan™ (DNASTarIncorporated) fue utilizado para ensamblar y editar las secuencias obtenidas. El alineamiento de las mismas y la reconstrucción filogenética se realizó utilizando el programa MEGA versión 5 (Tamura, *et al.*, 2011) y la distancia genética se calculó 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 RVA y NV y otras provenientes de diferentes países de la región y del mundo fueron obtenidas de "EntrezPubmed -Genbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

4. Resultados

4.1 Desarrollo de metodologías para concentración de virus en aguas.

Se logró estandarizar el método de concentración viral: ultracentrifugación. Se utilizó como control interno (CI) el bacteriófago PP7, como se describió previamente en la sección de materiales y métodos. El protocolo funcionó correctamente como se puede visualizar en la figura 10 en los carriles 1, 2, 3, 4, 5, y 7. Se observó la eficiente recuperación del CI. Las bandas corresponden al producto de PCR esperado de 73 pb. La visualización se realizó en electroforesis en gel de agarosa al 3%.

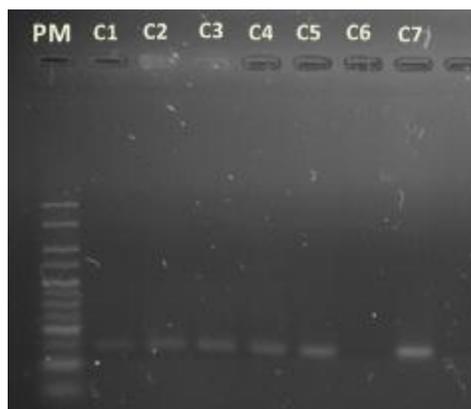


Figura 10-PCR para detección del bacteriófago PP7 usado como control interno (CI) de la técnica de Ultracentrifugación.

4.2 Implementación de RT-PCR para detección de RV y NV y puesta a punto de cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) para RV, EV y NV.

4.2.1 Implementación de RT PCR : Se logró, en relación al objetivo específico número 2, poner a punto la técnica de RT-PCR para la detección de los genes VP4 y VP7 de Rotavirus A como se puede observar en la figura 11. Cabe destacar que se pusieron a punto dos metodologías (como se detalla en materiales y métodos), la primera (Das *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 2000) permite la genotipificación de RVA (Fig11-A y B) mientras que la segunda (Iturriza-Gomara OMS 2009) amplifica al gen VP4 y VP7 para una posterior secuenciación y estudio filogenético (Fig11-C), así como también la región D de Norovirus GI (Fig 11-D) y GII (Fig11-E) como se describió previamente en Materiales y Métodos, la cual permite discriminar entre genogrupo I y II de NV mediante la amplificación del gen de la cápsida, posteriormente confirmados por secuenciación.

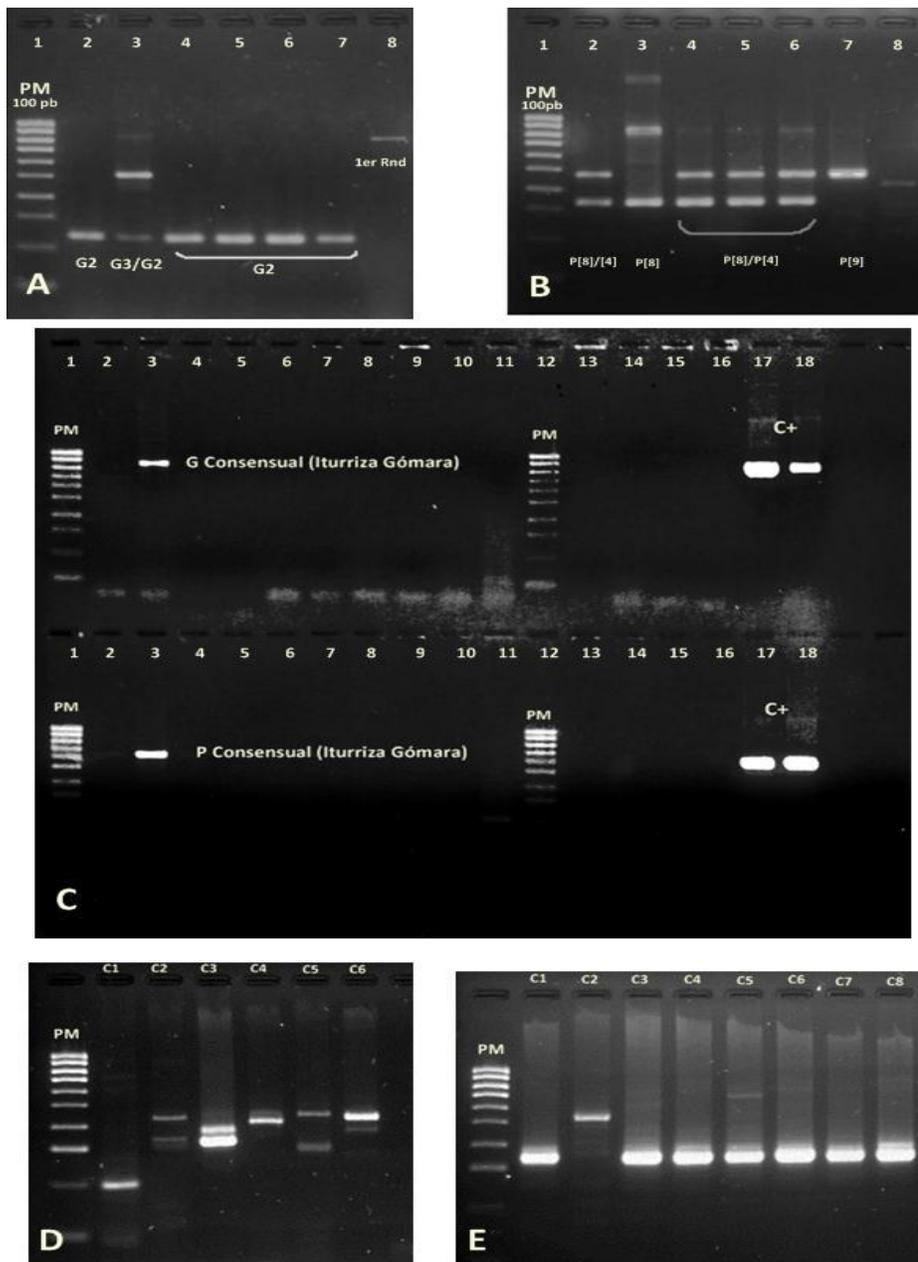


Figura 11-Resultados de las electroforesis de las estandarizaciones de las PCR para RVA para los genes VP7 (A y C), VP4 (B y C) y NV genogrupos I (D) y genogrupos II (E)

4.2.2 *Implementación de qPCR*: Para la puesta a punto de las PCRs cuantitativas para RVA, NVGI, NVGII y EV, se amplificaron mediante PCR los respectivos controles positivos y luego se purificaron (como se describe en Materiales y métodos) los fragmentos de interés. Tales fragmentos fueron cuantificados resultando en valores satisfactorios para realizar la clonación correspondiente. A modo de ejemplo se observa en la figura 12 A, para el caso de EV. Para la confirmación de una correcta clonación del inserto de interés, se realizó un screening de las colonias, donde se confirmó una correcta recuperación de los insertos por PCR, como se observa en la figura 12 B.

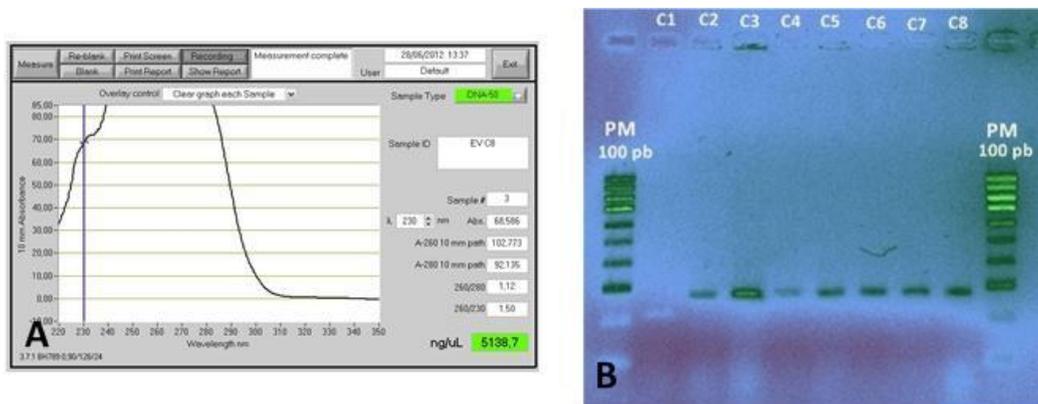


Figura 12- **A** Cuantificación por espectrofotómetro (Nanodrop) del plásmido con inserto de 5'UTR de EV de una de las colonias usadas para la clonación. **B** Resultado del screening de las colonias con el inserto de la 5'UTR para EV, por PCR.

La cuantificación de EV fue realizada mediante la estandarización de la metodología de qPCR. Se analizaron un total de 60 muestras. La curva estándar fue correctamente establecida como se visualiza en la figuras 13 y 14 siguiendo los procedimientos detallados en materiales y métodos.

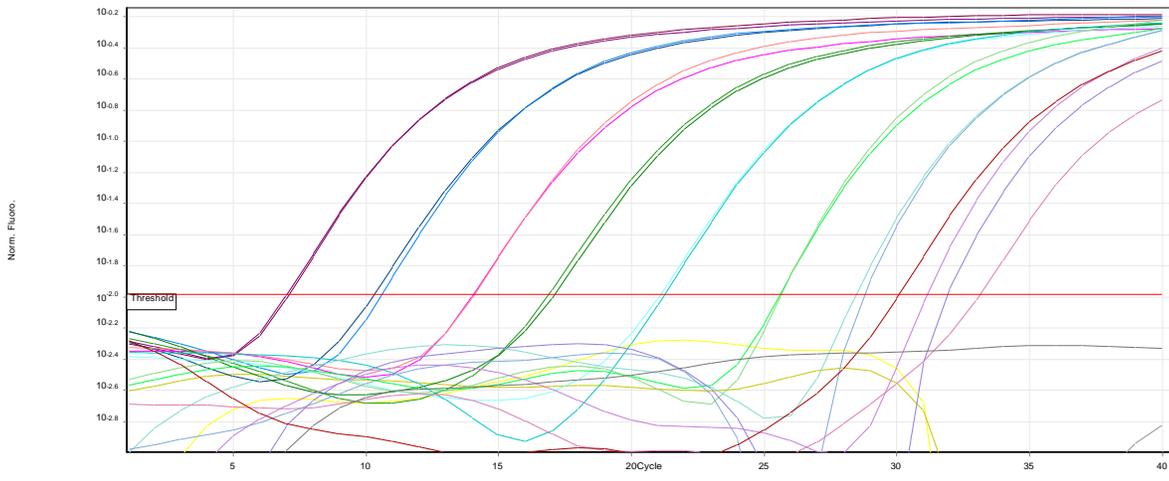


Figura 13- Análisis de cuantificación para realización de la curva estándar de la qPCR PCR de EV. Se utilizaron las siguientes diluciones seriadas en duplicados: 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0

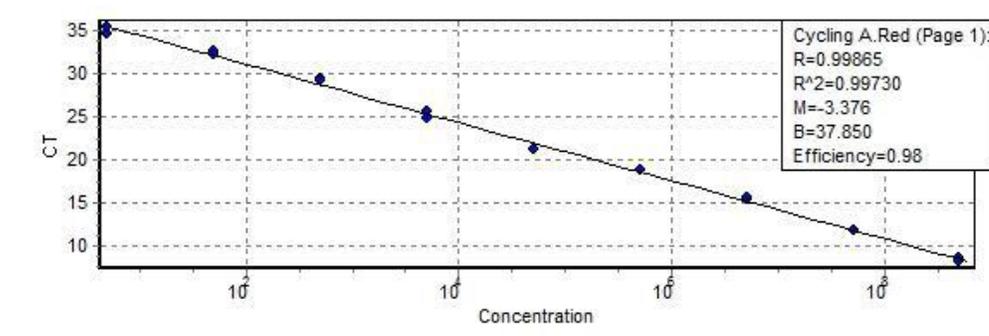


Figura 14- Curva estándar de cuantificación para qPCR de EV.

Se realizaron las curvas estándar correspondientes para cada virus de NVGI (Fig 15 y 16) y GII (Fig 17 y 18) así como de RV (Fig 19 y 20).

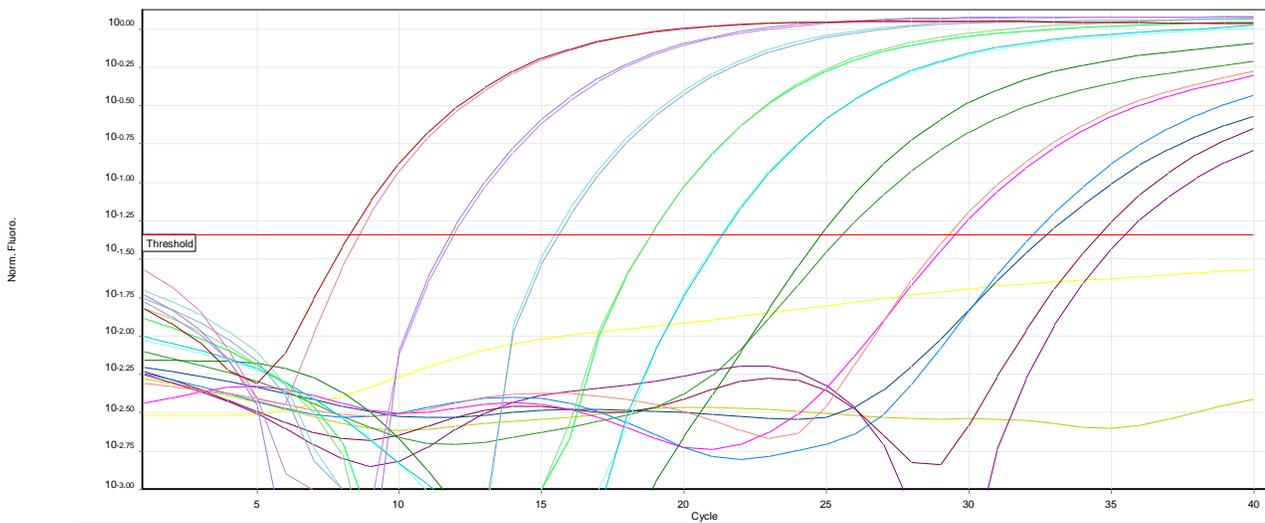


Figura15-Análisis de cuantificación para realización de la curva estándar de la qPCR de NVGI. Se utilizaron las siguientes diluciones seriadas: 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0

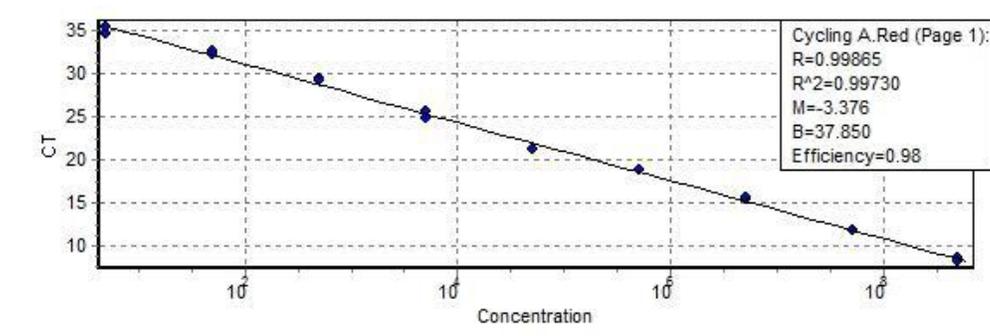


Figura 16- Curva estándar de cuantificación para qPCR de NVGI.

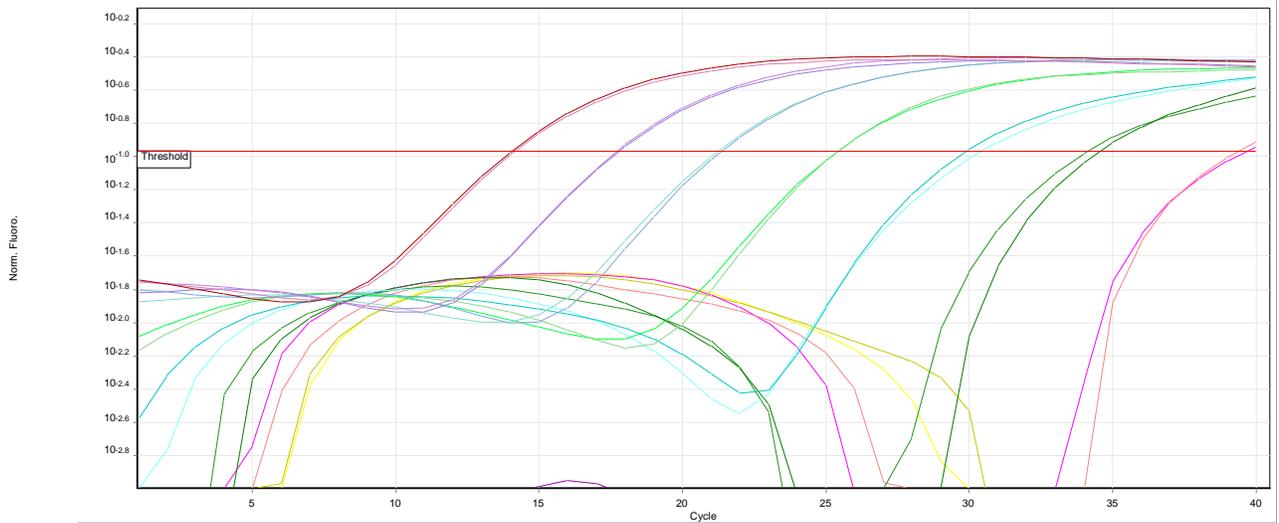


Figura17- Análisis de cuantificación para realización de la curva estándar de la qPCR de NVGII. Se utilizaron las siguientes diluciones seriadas: 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0

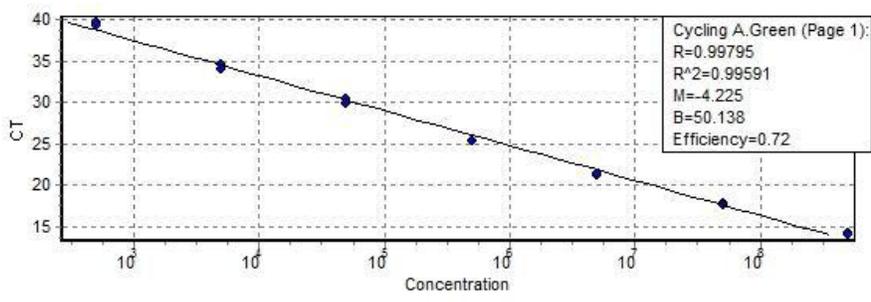


Figura 18- Curva estándar de cuantificación para qPCR de NVGII.

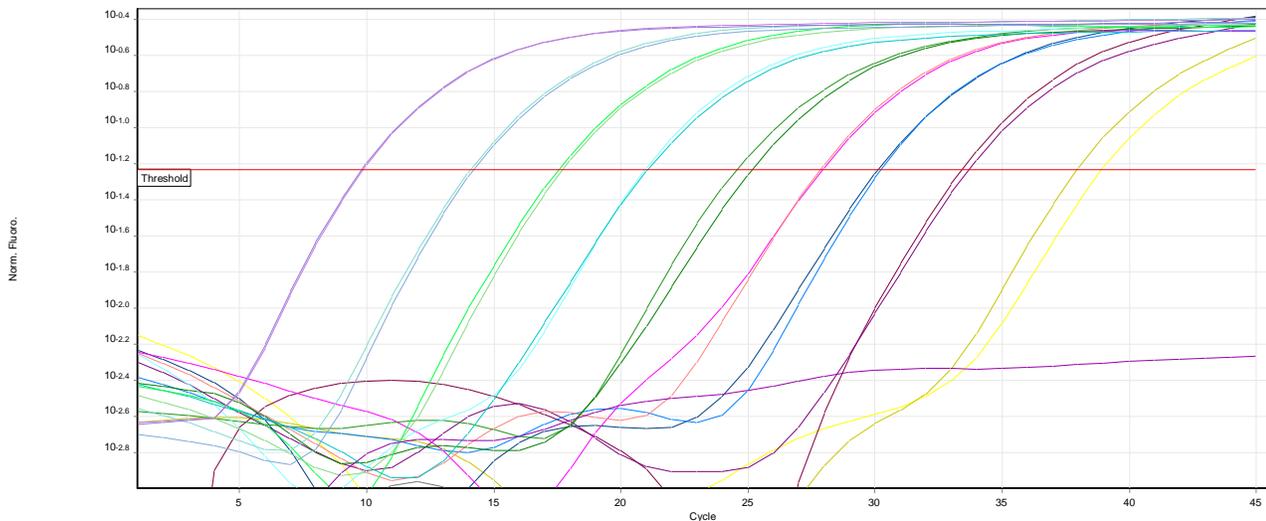


Figura19- Análisis de cuantificación para realización de la curva estándar de la qPCR de RVA. Se utilizaron las siguientes diluciones seriadas: 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0

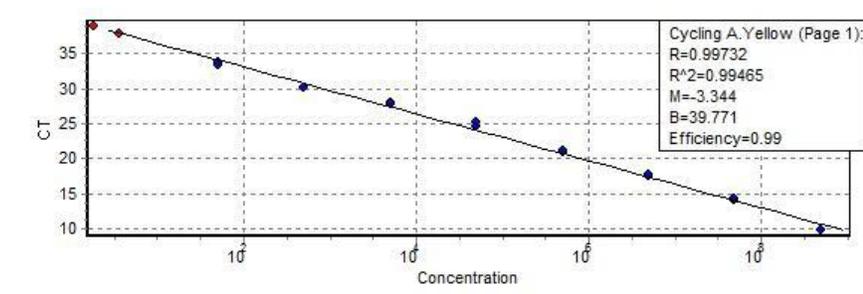


Figura 20- Curva estándar de cuantificación para qPCR de RVA.

4.3 Análisis de presencia viral en muestras del Rio Uruguay en 4 puntos de colecta entre marzo de 2011 y febrero de 2012

Se logró analizar la presencia de los tres virus para todas las muestras colectadas en el período comprendido entre marzo de 2011 y febrero de 2012 (n=99), con la excepción en el caso de EV, el cual se analizó en las muestras de las primeras quincenas de las

colectas de los cuatro puntos, sumando un total de 60 muestras a lo largo de todo el año.

Esto fue posible para el caso de RVA y NV GI y GII gracias a la implementación de las técnicas de PCR cualitativas. En el caso de EV, el análisis de su presencia en las muestras fue derivado de los datos obtenidos mediante la qPCR, también puesta a punto previamente en el marco de esta pasantía.

Tabla 3 Resultados de análisis de presencia de Virus gastroentéricos en cuatro puntos de colecta del Rio Uruguay en los primeros 6 meses del muestreo

<i>Nº Muestra</i>	<i>RV PCR</i>	<i>NVGI PCR</i>	<i>NVGII PCR</i>	<i>EV PCR</i>	<i>Nº Muestra</i>	<i>RV PCR</i>	<i>NVGI PCR</i>	<i>NVGII PCR</i>	<i>EV PCR</i>
A1-SA-02_11		9.85E+01	4.03E+02	3.43E+01	A33-SA-05_11				
A2-FB-02_11		4.45E+02		4.85E+02	A34-FB-06_11	3.85E+03		9.61E+02	
A3-PY-02_11			1.99E+02	1.92E+01	A35-PY-06_11	4.92E+03		3.68E+02	
A5-BU-03_11	4.48E+00		5.37E+00		A36-BU-06_11				
A6-FB-03_11		4.46E+00			A37-SA-06_11	1.02E+03	1.09E+02	1.36E+02	
A7-PY-03_11	1.84E+02		3.43E+01		A38-FB-06_11	5.05E+01		1.33E+02	8.67E-01
A8-SA-03_11	1.68E+00				A39-PY-06_11				
A9-FB-03_11			5.04E+01	1.08E+01	A40-BU-06_11		4.62E+01	7.17E+01	1.00E+02
A10-PY-03_11					A41-SA-06_11			3.55E+02	1.07E+02
A11-SA-03_11	2.97E+00	+		4.15E+00	A42-FB-07_11	5.98E+01		1.17E+02	
A13-BU-03_11	3.57E+00				A43-PY-07_11	2.45E+02	+	8.29E+02	
A15-BU-04_11					A44-BU-07_11			8.95E+01	
A16-FB-04_11			3.93E+01		A45-SA-07_11	1.85E+03			
A17-PY-04_11		3.39E+01	1.15E+02	8.34E+00	A46-FB-07_11			3.14E+01	3.06E+02
A18-SA-04_11				4.52E+02	A47-PY-07_11	1.68E+02			
A20-BU-04_11					A48-BU-07_11	5.66E+02	2.06E+01	3.11E+01	2.60E+01
A21-SA-04_11	7.39E+00				A49-SA-07_11	4.29E+01			2.67E+01
A22-FB-04_11					A50-FB-08_11			1.57E+02	
A23-PY-04_11					A51-PY-08_11	1.13E+02	6.16E+00		
A24-FB-05_11					A52-BU-08_11				
A25-PY-05_11		1.51E+02	6.13E+03		A53-SA-08_11	3.26E+02			
A27-BU-05_11				1.69E+02	A54-FB-08_11	1.98E+02		1.66E+02	4.84E+02
A28-SA-05_11	8.18E+01			1.41E+03	A55-PY-08_11	1.10E+03			1.84E+01
A29-FB-05_11				2.67E+02	A56-BU-08_11	1.96E+02			7.52E+01
A30-PY-05_11		2.60E+02	8.81E+02		A57-SA-08_11	2.37E+03			4.76E+01
A32-BU-05_11									

□ Los números corresponden a copias genómicas por µl correspondientes a las muestras positivas cuantificadas. El símbolo de + es una muestra positiva no cuantificada. El nombre de la muestra es: El numero de muestra, el punto de colecta, el mes de muestreo y el año.

Tabla 4 Resultados de análisis de presencia de Virus gastroentéricos en cuatro puntos de colecta del Rio Uruguay en los segundos 6 meses del muestreo

Nº Muestra	RV rPCR	NV GI rPCR	NV GII rPCR	EV rPCR	Nº Muestra2	RV rPCR	NV GI rPCR	NV GII rPCR	EV rPCR
A58-FB-09_11	+				A94-FB-12_11		+	+	+
A59-PY-09_11	+				A95-PY-12_11	+			
A60-BU-09_11					A96-BU-11_11	+			
A61-SA-09_11	+				A97-SA-12_11				+
A62-FB-09_11					A98-FB-12_11			+	
A63-PY-09_11			+		A99-PY-12_11	+		+	
A64-BU-09_11					A100-BU-12_11				
A65-SA-09_11					A101-SA-01_12				
A66-FB-10_11				+	A102-SA-01_12				+
A67-PY-10_11	+	+		+	A103-BU-01_12				
A68-BU-10_11					A104-BU-01_12				
A69-SA-10_11	+			+	A105-SA-01_12				
A76-FB-10_11	+				A106-PY-01_12		+		+
A77-PY-10_11					A107-PY-01_12				
A78-BU-10_11					A108-FB-01_12				+
A79-SA-10_11					A109-FB-01_12			+	
A80-FB-11_11				+	A110-FB-02_12		+	+	+
A81-PY-11_11	+			+	A111-PY-02_12		+	+	+
A82-BU-11_11	+				A112-BU-02_12				
A83-SA-11_11				+	A113-SA-02_12				
A84-FB-11_11	+	+	+		A114-BU-02_12			+	
A85-PY-11_11		+	+		A115-BU-02_12				
A86-BU-11_11					A116-BU-02_12				
A86-BU-11_11					A117-SA-02_12				+
A87-SA-11_11		+	+						

*Para EV solo se detectó por qPCR los segundos 6 meses de muestreo

4.3.1 Análisis de positividad viral en el año: En la figura 21 se muestra la proporción de positividad detectada según las técnicas antes descritas.

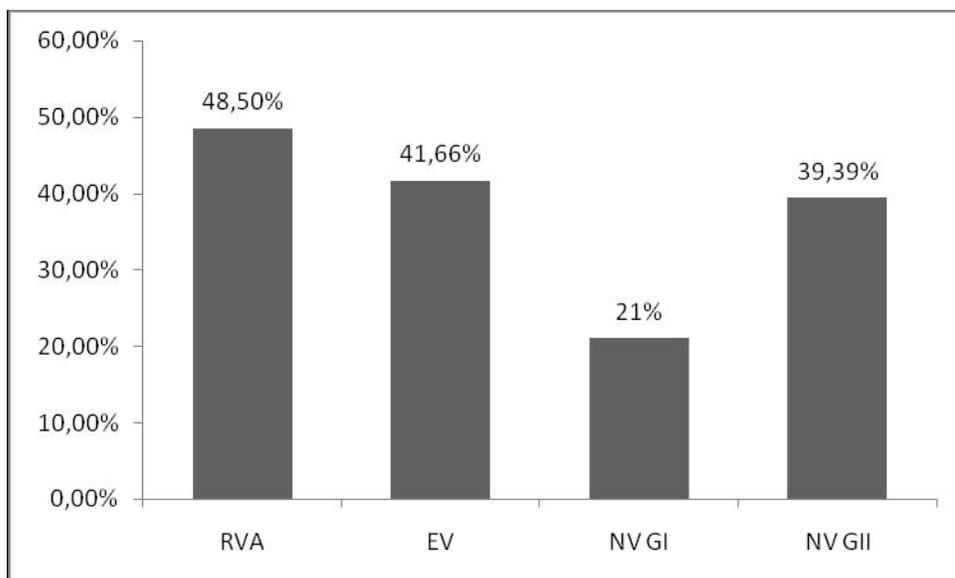


Figura 21- Porcentaje de muestras positivas para RV, EV y NV GI y GII en el período de muestreo entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012 en los cuatro puntos de colecta del Río Uruguay.

En el muestreo comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012, se obtuvieron los siguientes valores de positividad. Rotavirus fue el virus presente en mayor número de muestras, con un 48.5% de muestras positivas. Luego lo sigue EV, con una prevalencia del 41.6%, seguido de 39,4% correspondiente a NVGII y finalmente NVGI, el menos presente, con un 21% de muestras positivas.

4.3.2 Análisis de positividad de cada virus en cada punto de colecta:

En caso del grupo de RVA (fig 22-A), se encontraron con mayor frecuencia en las muestras de agua residual correspondientes a la ciudad de Paysandú, departamento de Paysandú, con un 57% de muestras positivas en la totalidad del muestreo. Los siguientes puntos en orden descendente fueron, departamento de Salto con 50%, Bella Unión perteneciente al departamento de Artigas y Fray Bentos, departamento de Río Negro presentaron los mismos porcentajes de positividad con un 40%.

Para NVGI (fig.22-B), Paysandú obtuvo los valores más altos de positividad, con un 39% seguido de Fray Bentos con un 20%, seguido de Salto con 15% de positividad y por último Bella Unión con 4%.

Norovirus GI (fig. 22-C) tuvo un porcentaje de positividad diferente de GI. Fray Bentos representó el punto de colecta con más número de muestras positivas para este genogrupo, con un porcentaje de 52%, el siguiente punto fue Paysandú con un 50% de positividad, seguido de Salto con 31% y por último la ciudad de Bella Unión con una positividad de 14%.

Para Enterovirus (fig 22-D), el punto con mayor número de muestras positivas fue Fray Bentos con un 75% de positividad seguido de Salto con 66%, Paysandú con 58% y Bella Unión con tan solo 8%.

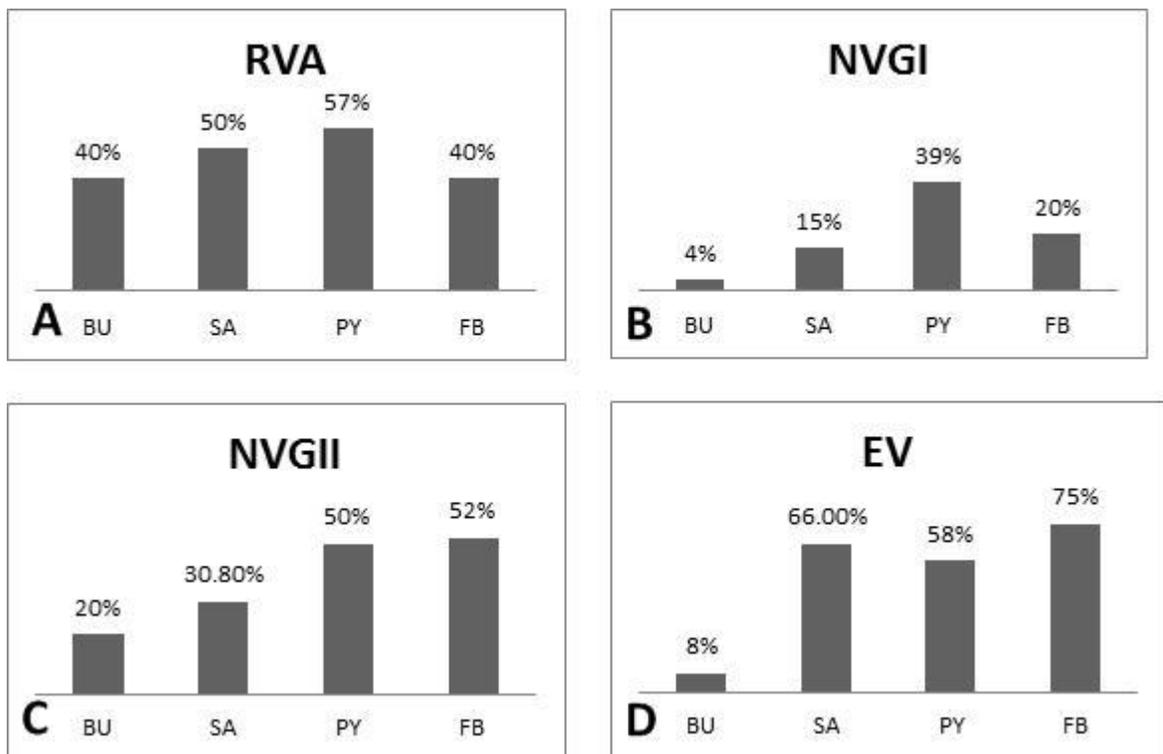


Figura 22 -Porcentaje de positividad para RVA GI y GII, RV y EV detectado en cada uno de los cuatro puntos de colecta en el primer semestre de muestreo (Marzo 2011-Febrero 2012)

4.3.3 Análisis de estacionalidad según el virus durante el muestreo completo

En este análisis de datos, como se observa en la figura 23 para el caso de RVA, se detecta una tendencia estacional. En los meses fríos (junio, julio y agosto) e incluyendo a setiembre, el porcentaje de positivos es alto y constante. Luego en los meses cálidos (octubre, noviembre, diciembre, enero) decae.

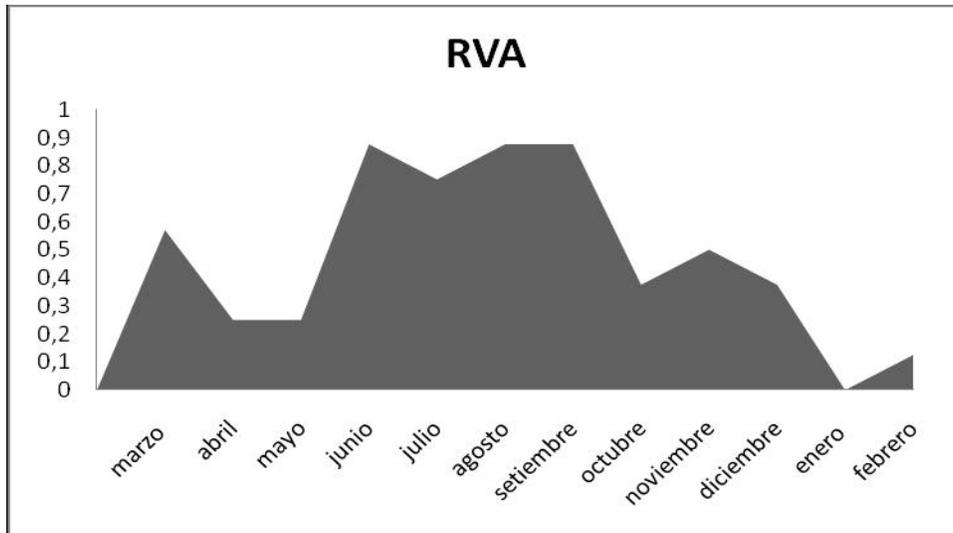


Figura23- Patrón de estacionalidad dado por porcentaje de positivos de RVA durante el período comprendido entre Febrero de 2011 y Febrero de 2012 para los cuatro puntos de colecta.

Para NVGI no es clara una tendencia estacional (fig. 24). Se registraron valores altos de positividad tanto en meses cálidos (Noviembre 2011) en meses intermedios (Marzo y Mayo 2011) y en meses fríos (Junio y Julio 2011). En promedio, los valores altos se registraron más en los meses cálidos (Marzo y Noviembre 2011). En Setiembre de 2011 no se registraron muestras positivas.

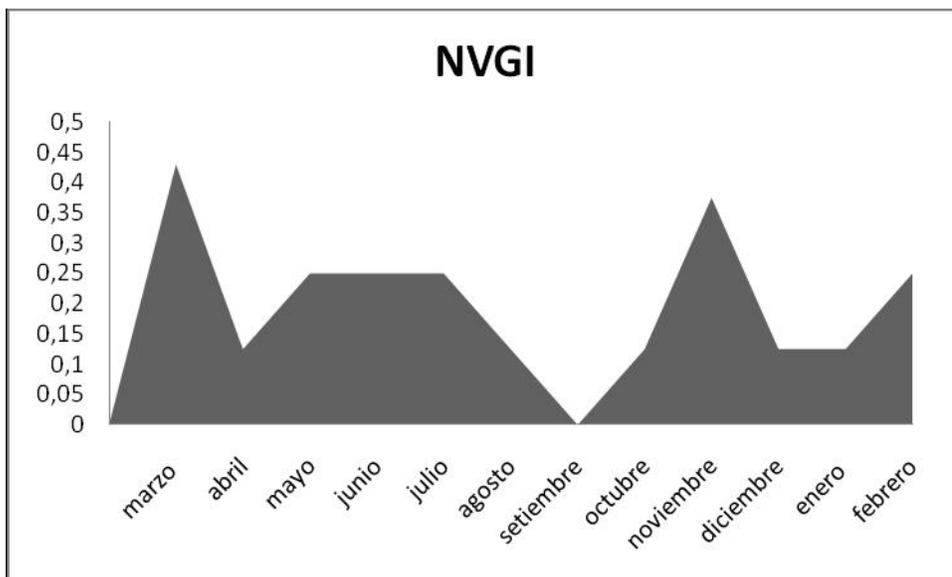


Figura24- Patrón de estacionalidad dado por porcentaje de positivos de NVGI durante el período comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012 para los cuatro puntos de colecta.

Para NVGII de NV (fig. 25), en los meses de Junio 2011 y Diciembre del mismo año se registran los valores máximos de muestras de aguas residuales positivas para este virus. En Los meses fríos (Julio 2011 Agosto 2011) y cálidos (Noviembre 2011, Enero 2012 y Febrero 2012) se registraron máximos relativos altos. En Marzo y Abril 2011 se detecta una caída en los casos de positividad al igual que en Setiembre y Octubre de 2011 donde en este último llega a cero.

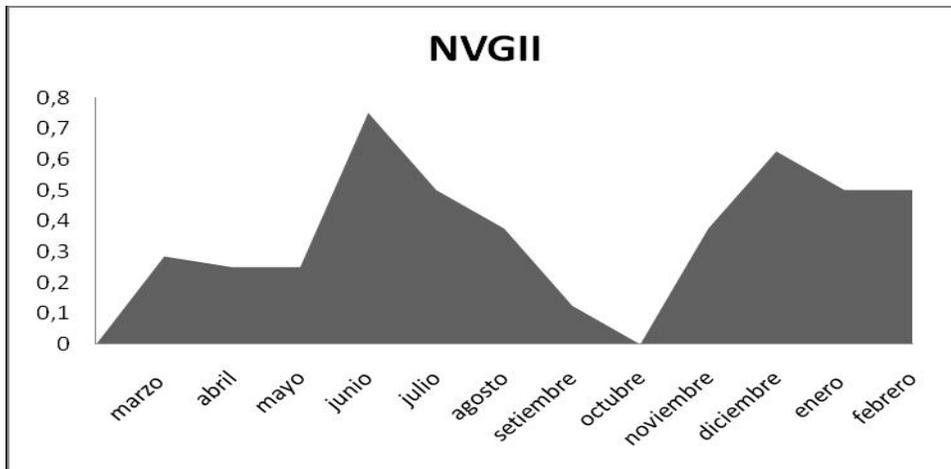


Figura25- Patrón de estacionalidad dado por porcentaje de positivos de NVGII durante el período comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012 para los cuatro puntos de colecta.

Para EV (fig. 26), en los meses de Mayo 2011, Julio 2011 Octubre 2011, Noviembre 2011, Enero 2012 y Febrero del mismo año se registran los valores máximos de muestras de aguas residuales positivas para este virus. En Los meses de Marzo y Abril de 2011 se detectan valores bajos de positividad y en Setiembre de 2011 hay una caída abrupta que llega a cero en los casos de positividad.

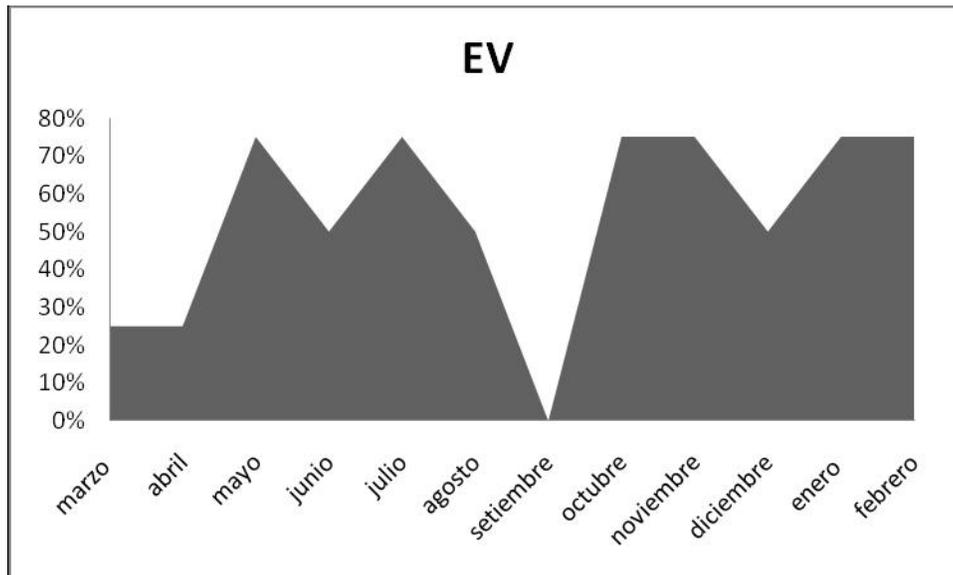


Figura26- Patrón de estacionalidad dado por porcentaje de positivos deNVGII durante el período comprendido entreMarzo de 2011 y Febrero de 2012 para los cuatro puntos de colecta.

4.3.4 Análisis de estacionalidad de los virus en el Río Uruguay en el año.

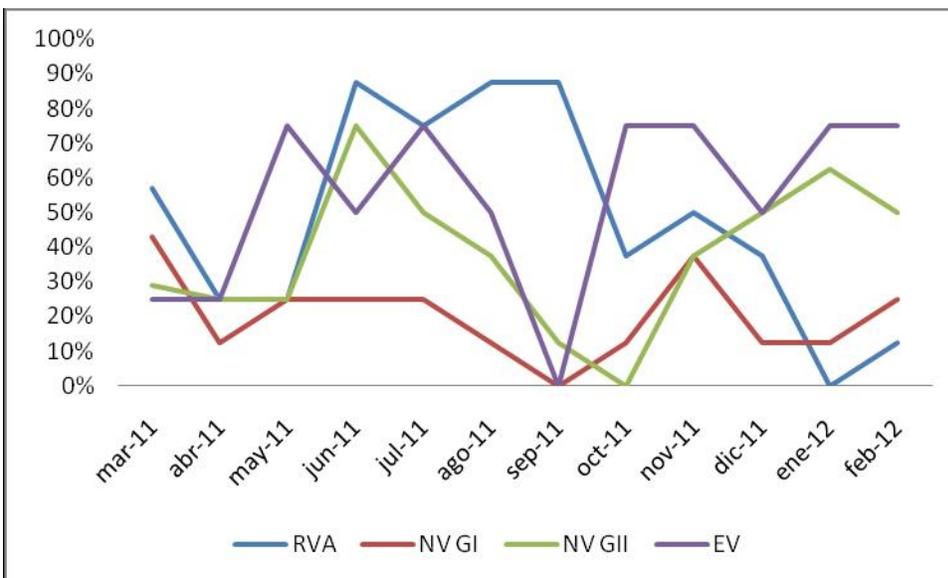


Figura 27 -Estacionalidad de RVA NVGI y NVGII en el período comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012 en las 99 muestras de los 4 puntos de colecta del Río Uruguay.

En la figura 27 se observa la evolución de la positividad de las muestras de agua residual en 4 puntos distintos del recorrido del Río Uruguay para RVA, NV GI y NV GII. Se observa un aumento de la presencia de RVA y NV GII hacia los meses fríos, a partir

de Junio 2011, donde se registra el valor máximo para ambos virus. En caso de RVA se mantiene por más tiempo (Setiembre 2011). En caso de NVGI esta tendencia se dio en Mayo de 2011 pero llegando a valores menores comparativamente, y también se sostuvo en el tiempo. Hacia los meses de Setiembre y Octubre de 2011 (Agosto en caso de NVGI) se registró un descenso en la cantidad de muestras positivas, llegando a valores nulos en los tres virus. Posteriormente, se dio un máximo relativo en los tres casos, para NVGI y RVA en Noviembre de 2011 y para NVGII en Enero de 2012. Luego de estos máximos relativos los tres virus mostraron un aumento en la cantidad de muestras positivas hacia Febrero de 2012.

4.3.5 Análisis de estacionalidad de RVA, NVGI, NVGII y EV según el punto de colecta

En el caso de Bella Unión, la figura 28 representa la cantidad de muestras positivas correspondientes a cada virus por mes. En todos los meses hubo 2 muestras por mes a excepción de Febrero y Marzo de 2011 que solo hubo 1 por cada mes. Los RVA estuvieron mas presentes en las muestras de Bella Unión, alcanzando el 100% de positividad en las muestras en los meses de Marzo 2011, Junio 2011 y Agosto 2011. En tres meses estuvieron presentes en la mitad de las muestras (Setiembre 2011, Noviembre 2011 y Diciembre 2011). En los meses restantes no fueron registrados en las muestras tomadas en la ciudad de Bella Unión. Los NVGI fueron detectados en la mitad de las muestras de dos meses de frío (Junio y Julio de 2011). Para NVGII, una positividad del 50% se halló en Junio, Julio y Agosto de 2011. Para EV, en el mes de julio e 2011 se detectaron el 100% de las muestras positivas.

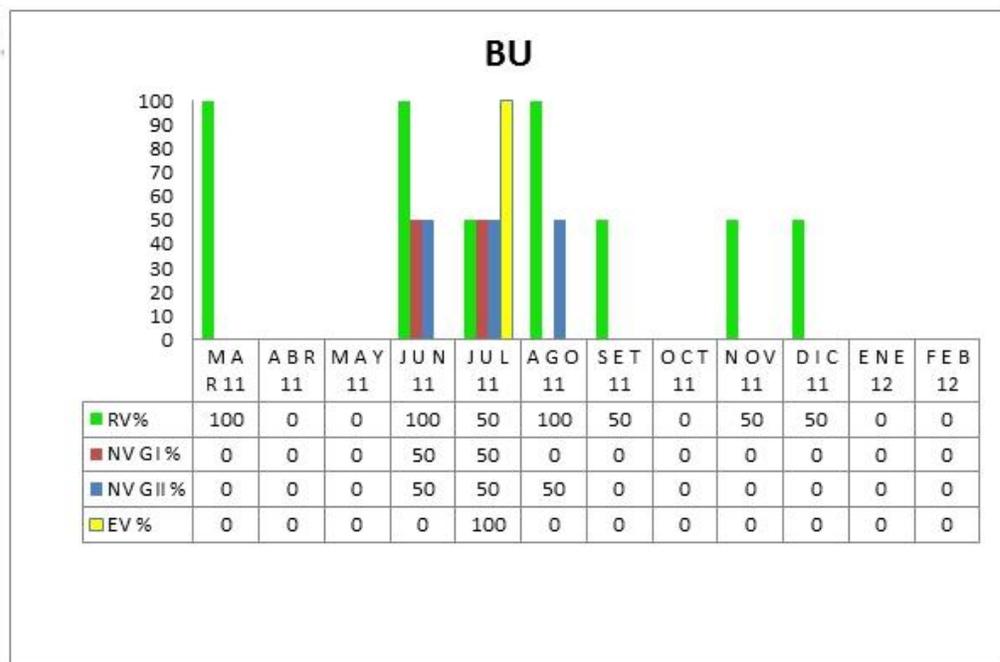


Figura 28- Porcentaje de positividad de RVA, NV GI y NV GII durante el muestreo del Rio Uruguay comprendido entre Febrero de 2011 y Febrero de 2012 en el punto de colecta de la ciudad de Bella Unión, departamento de Artigas.

En el caso de Salto, la figura 29 representa la cantidad de muestras positivas correspondientes a cada virus por mes. En todos los meses hubo 2 muestras por mes a excepción de Marzo de 2011 que solo hubo 1 colecta en el mes. Los RVA estuvieron mas presentes en las muestras de Bella Unión, alcanzando el 100% de positividad en las muestras en los meses de Marzo 2011, Junio 2011 y Agosto 2011. En tres meses estuvieron presentes en la mitad de las muestras (Setiembre 2011, Noviembre 2011 y Diciembre 2011). En los meses restantes no fueron registrados en las muestras tomadas en la ciudad de Bella Unión. Para el caso de NV GI en dos meses (Marzo y Julio 2011) fue positivo en la mitad de las muestras y para NV GII ,en marzo solo la mitad de las muestras fueron positivas y en Julio el total de las mismas. En EV todos los meses menos marzo, abril, julio agosto y setiembre, fueron positivos en todos los muestreos .En el caso de Paysandú, la figura 30 representa la cantidad de muestras positivas correspondientes a cada virus por mes. En todos los meses hubo 2 muestras por mes a excepción de Marzo de 2011 que solo hubo 1 colecta en el mes. Los RVA estuvieron mas presentes en las muestras de Bella Unión, alcanzando el 100% de positividad en las muestras en los meses de Febrero 2011, Marzo 2011, Junio 2011 y Agosto 2011.

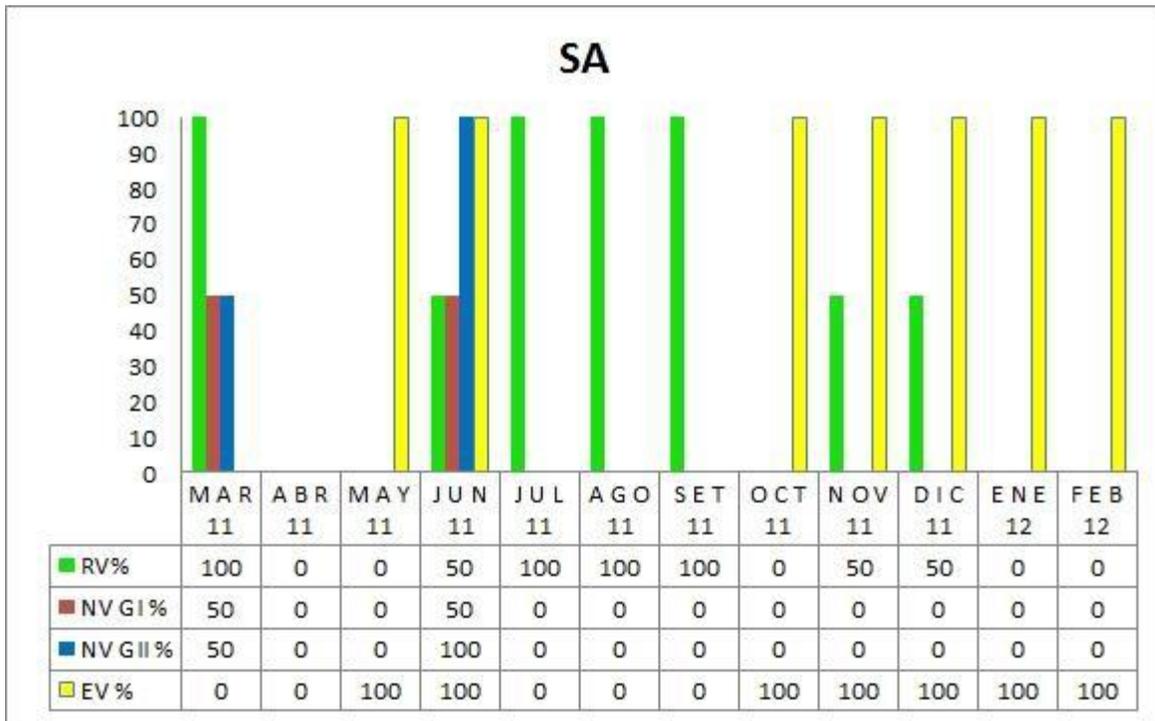


Figura 29- Porcentaje de positividad de RVA, NV GI y NV GII durante el muestreo del Rio Uruguay comprendido entre Febrero de 2011 y Febrero de 2012 en el punto de colecta de la ciudad de Salto, departamento de Salto.

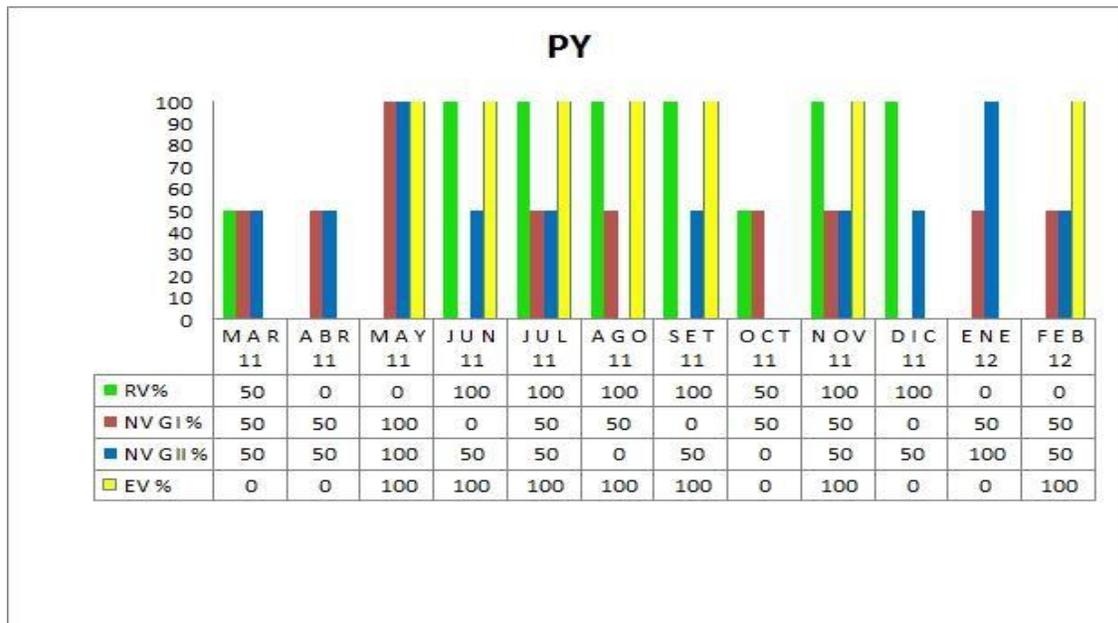


Figura 30- Porcentaje de positividad de RVA, NV GI y NV GII durante el muestreo del Rio Uruguay comprendido entre Febrero de 2011 y Febrero de 2012 en el punto de colecta de la ciudad de Paysandú, departamento de Paysandú.

En tres meses estuvieron presentes en la mitad de las muestras (Setiembre 2011, Noviembre 2011 y Diciembre 2011). En los meses restantes no fueron registrados en las muestras tomadas en la ciudad de Bella Unión.

4.3.6 Análisis de frecuencia de cocirculaciones de los tres virus de estudio en las muestras de todo el año.

En orden decreciente de frecuencia de aparición, las cocirculaciones de las distintas combinaciones de virus halladas en los muestreos del estudio se detallan en la figura 31.

Se halló que la cocirculación más frecuentemente encontrada en las aguas colectadas sobre el Rio Uruguay es de RVA con NVGII (fig. 31-A), seguida de NVGI con NVGII (fig 31-B).

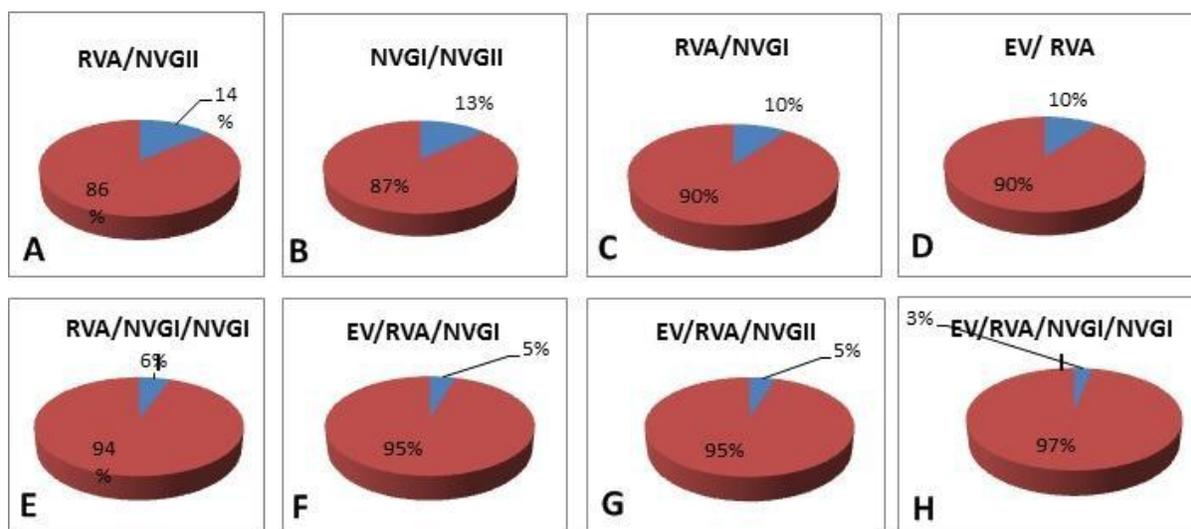


Figura 31- Cocirculaciones detectadas para las distintas combinaciones de RVA, EV, NVGI y NVGII en el muestreo del Rio Uruguay en el período comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012.

Otras cocirculaciones encontradas con cierta frecuencia (10%) fueron las de EV con RVA y NVGI con RVA (fig. 31C-D).

Las cocirculaciones halladas menos frecuentemente fueron, en orden decreciente:

RVA, NVGI y NVGII (6%), EV, RVA, NVGI y EV, RVA, NVGII con 5% y todos los tipos virales juntos que se encuentran en un 3% de las muestras (fig. 31 E, F, G, H).

4.3.7 Análisis de diversidad genética de RVA hallada en el Río Uruguay.

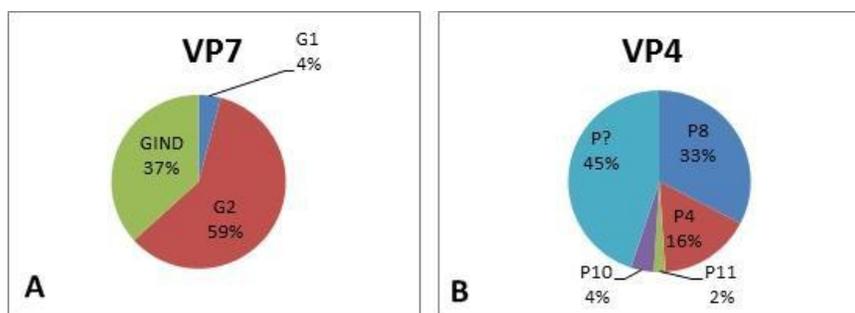


Figura 32- Diversidad hallada en las muestras de RVA colectadas en el Río Uruguay entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012 en BU, SA, PY y FB. Genotipos obtenidos por PCR cualitativa multiplex. Se observa la diversidad tanto para VP7 (G) como para VP4 (P)

Para el caso del multiplex que detecta el gen de VP7 para genotipar, se lograron detectar en su mayoría G2 (57%), seguidos de un 39% de G indeterminados y un 4% de G1 (fig. 32-A).

Para VP4 fue más diverso el resultado de las PCR. Se detectó P indeterminado en un 45%, P[8] en un 33%, P[4] en un 16%, P[10] en un 4% y P[11] en un 2% (fig. 32-B)

4.4 Análisis filogenético de RVA, NVGI y NVGII hallada en el Río Uruguay.

Se han logrado secuenciar hasta el momento las muestras positivas de los primeros 6 meses y los resultados también incluyeron algunas secuencias de febrero de 2011. Para el caso de RVA, en el análisis de VP4 se incluyó la secuencia de la muestra A3. Para NV se incluyeron las muestras de A1, A2 Y A3 también correspondientes a febrero de 2011. Esto se detalla en la tabla 5. Para la construcción de los árboles filogenéticos se eligieron algunas de las secuencias obtenidas. Se dividió el muestreo en 3 estaciones: verano, siendo febrero y marzo de 2011, otoño, correspondiendo a abril, mayo y junio de 2011, e invierno, representado por las muestras de julio y agosto de 2011. Se eligió, por estación del año cuatro muestras por virus, una de cada punto de colecta, siempre que existiera una secuencia y esta fuera analizable. De ese filtrado, que se visualiza en la tabla 5 se procedió a la realización de los 4 árboles, para NVGI, NVGII, RVA VP4 y RVA VP7, que analizaremos a continuación.

Tabla 5 -Secuencias incluidas en el análisis filogenético de las muestras del Río Uruguay en las estaciones de Verano, Otoño e Invierno de 2011 con representantes de los 4 puntos de colecta BU, SA, PY y FB.

Muestra	RVA VP7	RVA VP4	NVGI	NVGII
A1-SA-02_11	—	—	—	SECUENCIA
A2-FB-02_11	—	—	SECUENCIA	—
A3-PY-02_11	SECUENCIA	—	—	SECUENCIA
A5-BU-03_11	—	SECUENCIA	—	SECUENCIA
A7-PY-03_11	—	SECUENCIA	SECUENCIA	—
A9-FB-03_11	—	—	—	SECUENCIA
A11-SA-03_11	—	SECUENCIA	SECUENCIA	—
A21-SA-04_11	—	SECUENCIA	—	—
A30-PY-05_11	—	—	SECUENCIA	—
A35-PY-06_11	SECUENCIA	SECUENCIA	—	—
A37-SA-06_11	SECUENCIA	—	SECUENCIA	—
A38-FB-06_11	SECUENCIA	—	—	—
A40-BU-06_11	—	—	SECUENCIA	SECUENCIA
A41-SA-06_11	—	—	—	SECUENCIA
A42-FB-07_11	SECUENCIA	—	—	—
A43-PY-07_11	SECUENCIA	—	SECUENCIA	SECUENCIA
A48-BU-07_11	—	—	SECUENCIA	—
A49-SA-07_11	SECUENCIA			
A51-PY-08_11		—	SECUENCIA	—
A52-BU-08_11	—	—	—	SECUENCIA
A54-FB-08_11		—	—	SECUENCIA
A56-BU-08_11	SECUENCIA	—	—	—
A57-SA-08_11	—	SECUENCIA	—	—

4.4.1 Análisis filogenético del gen VP7 de RVA

El análisis filogenético de VP7 muestra una gran diversidad filogenética para las muestras tomadas como representantes de los primeros 6 meses de muestreo del Rio Uruguay. Como se observa en la figura 33, se encontraron secuencias, que en conjunto con las cepas referencia y las de la región agrupan en 3 clusters pertenecientes a los siguientes genotipos: G1, G2 y G3. El árbol se realizó como se describe en materiales y métodos. El soporte estadístico se realizó mediante 1000 réplicas de Bootstrap y en los árboles se indican los valores mayores a 70.

Una de nuestras muestras se agrupa en el cluster de G1 y con otras muestras de Uruguay (previas a éste estudio), aunque no tan cercanamente como con una de Bélgica del año 2008. En conjunto con cepas de la región (Brasil y Argentina), conforman el sublinaje 1c dentro del linaje 1 de G1.

G2 fue el genotipo que estuvo mas representado, conteniendo 5 de las muestras, las cuales agrupan juntas y están formando un cluster único que está muy emparentado con otro formado exclusivamente por cepas de Brasil, que datan de un período relativamente cercano en el tiempo (2008-2011). A su vez nuestras muestras junto con las de Brasil forman un cluster aparte dentro del linaje II de G2.

Una de las muestras se agrupó con el genotipo G3, con cepas de Méjico y EEUU con un elevado valor de bootstrap (99). También es cercana filogenéticamente a una cepa de Brasil del 2011. Por otra parte esta mas emparentada con cepas de RVA de caballo aisladas en 2011 en Argentina que con otras cepas referencia pertenecientes al cluster de G3, e incluso cepas humanas de la región pertenecientes a G3.

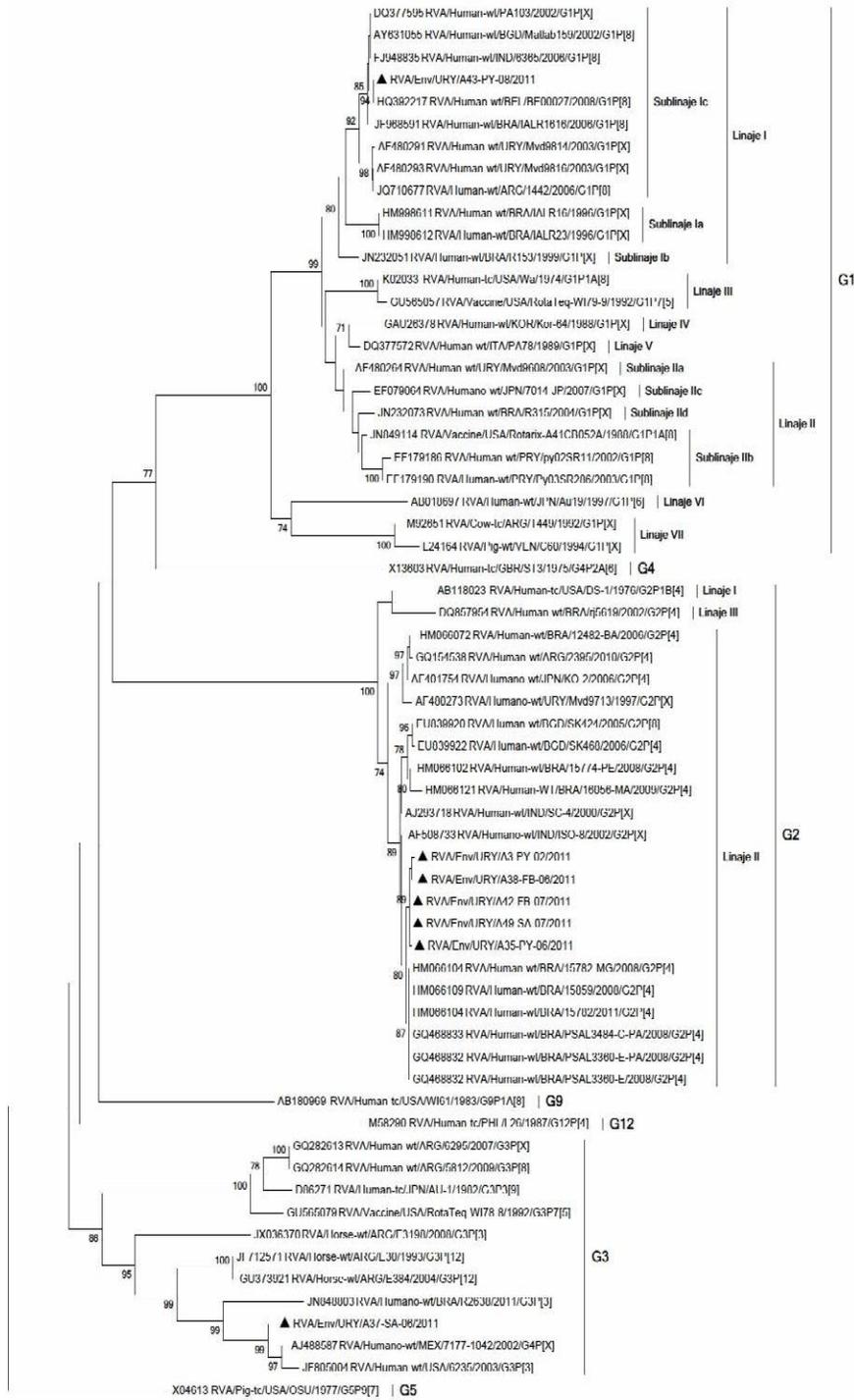


Figura-33. Análisis Filogenético de las secuencias de VP7 de RVA de muestras del Rio Uruguay entre Febrero 2011-Agosto 2011. Las secuencias de este estudio se marcaron con un triángulo.

4.4.2 Análisis filogenético del gen VP4 de RVA

El análisis filogenético de las secuencias de muestras uruguayas correspondientes al gen que codifica la proteína VP4, indica una importante diversidad dentro de los genotipos P8 y P4 y un fuerte parentesco con cepas de la región (Figura 34).

En el caso particular de P[4], dos muestras se agrupan en el linaje V de P[4], pero en dos clusters distintos. En el caso de la A57, está emparentada con varias cepas de Brasil y una de Paraguay que circularon todas en un período cercano temporalmente (2005-2011). Por otro lado, la A35 se agupa en un cluster junto con dos cepas de Brasil y esta cercanamente emparentada con una cepa de Méjico. Formando parte del cluster del linaje V, también hay más cepas de la región, de Paraguay y varias de Brasil.

El resto de los linajes de P[4] están formados por muestras de la región, exclusivamente brasileras, el II y el IV, cuentan con cepas de Brasil, no tan recientes, datadas entre el 2000 y el 2004.

Para el caso de P[8], contamos con 4 muestras de nuestro estudio, que forman un cluster único y solo una cepa está cercanamente emparentada, la cual es del tipo Wa, procedente de EEUU. Por otra parte, están emparentadas en menor medida con cepas de Brasil y Paraguay.

Las muestras que constituyen dicho cluster (A5, A7, A11 y A21) forman, junto con el grupo de secuencias de Brasil y la cepa prototipo de EEUU, el linaje I del genotipo P[8]. En la región, hay representantes de dos de los tres restantes linajes pertenecientes a P[8]. El linaje II tiene una cepa de Paraguay, el III tiene una de Paraguay y una de Brasil.

En este caso, no hay secuencias disponibles en el GeneBank para ningún aislamiento de Uruguay, por lo que sería la primera documentación de estas cepas en el país. Eso tampoco nos permite inferir nada con respecto al parentesco con cepas que ya circulaban en el río.

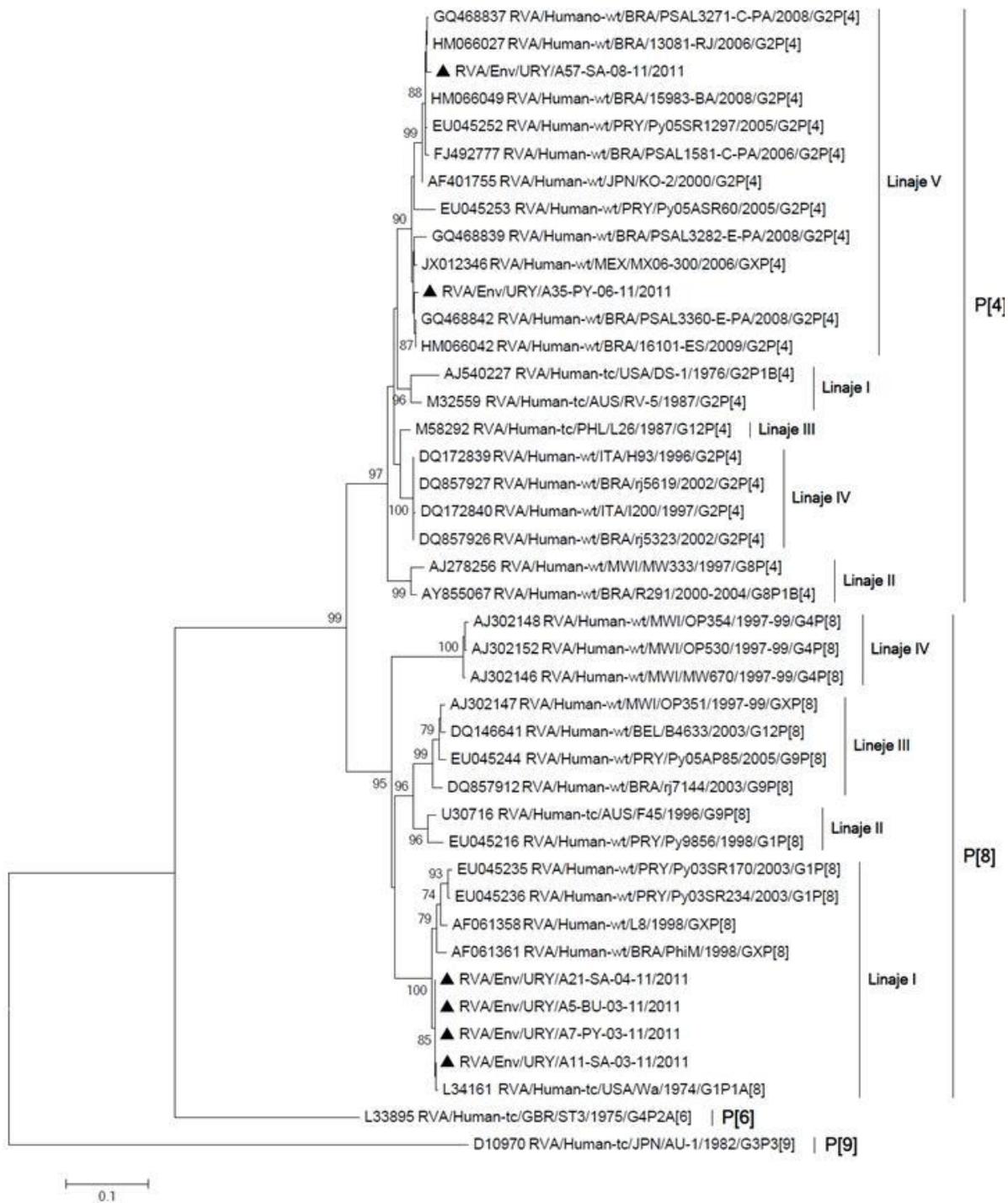


Figura 34- Análisis Filogenético de las secuencias de VP4 de RVA de muestras del Río Uruguay entre Febrero 2011-Agosto 2011. Las secuencias de este estudio se marcaron con un triángulo.

4.4.3 Análisis filogenético de la cápside de NVGI

En el árbol de esta región estudiada (fig. 35), se obtuvieron representantes de 4 linajes diferentes dentro del genogrupo 1.

Tres muestras pertenecieron al linaje 4, agrupando dos junto con una de Brasil, formando un cluster emparentado cercanamente con otra secuencia de Brasil. Formando ese linaje también tenemos a la otra muestra de nuestro estudio, la A43, la cual agrupa con los prototipos Koblenz-DEU y Valetta- MLT y una cepa de Brasil del 2008. Ese grupo de secuencias a su vez esta emparentado con varias cepas de otra región, usadas como prototipo.

En el linaje 1 encontramos tres muestras muy cercanas filogenéticamente entre sí, y coinciden en la época que circularon (verano de 2011). Dichas muestras junto con una de Méjico forman un cluster cercano filogenéticamente a las cepas prototipo de Japón 1-Aich124 y 1-KY89. Este linaje también tiene otra cepa de la región, de Venezuela, y el resto son prototipos.

Dos muestras, la A40 y la a51 pertenecen al linaje 8 de GI. Forman parte de un cluster que está formado por ellas y dos secuencias muy cercanas filogenéticamente, y además pertenecientes a la región. Mas lejana en parentesco, define el cluster la prototipo Boxer-USA02.

Exclusivamente formado por muestras de la región, el cluster de GI del linaje 3 contiene solo una muestra de nuestro estudio, la A30, junto con una de Brasil, la mas cercana en términos filogenéticos, y una de Méjico. Luego está emparentado con una de Brasil y varias cepas prototipo.

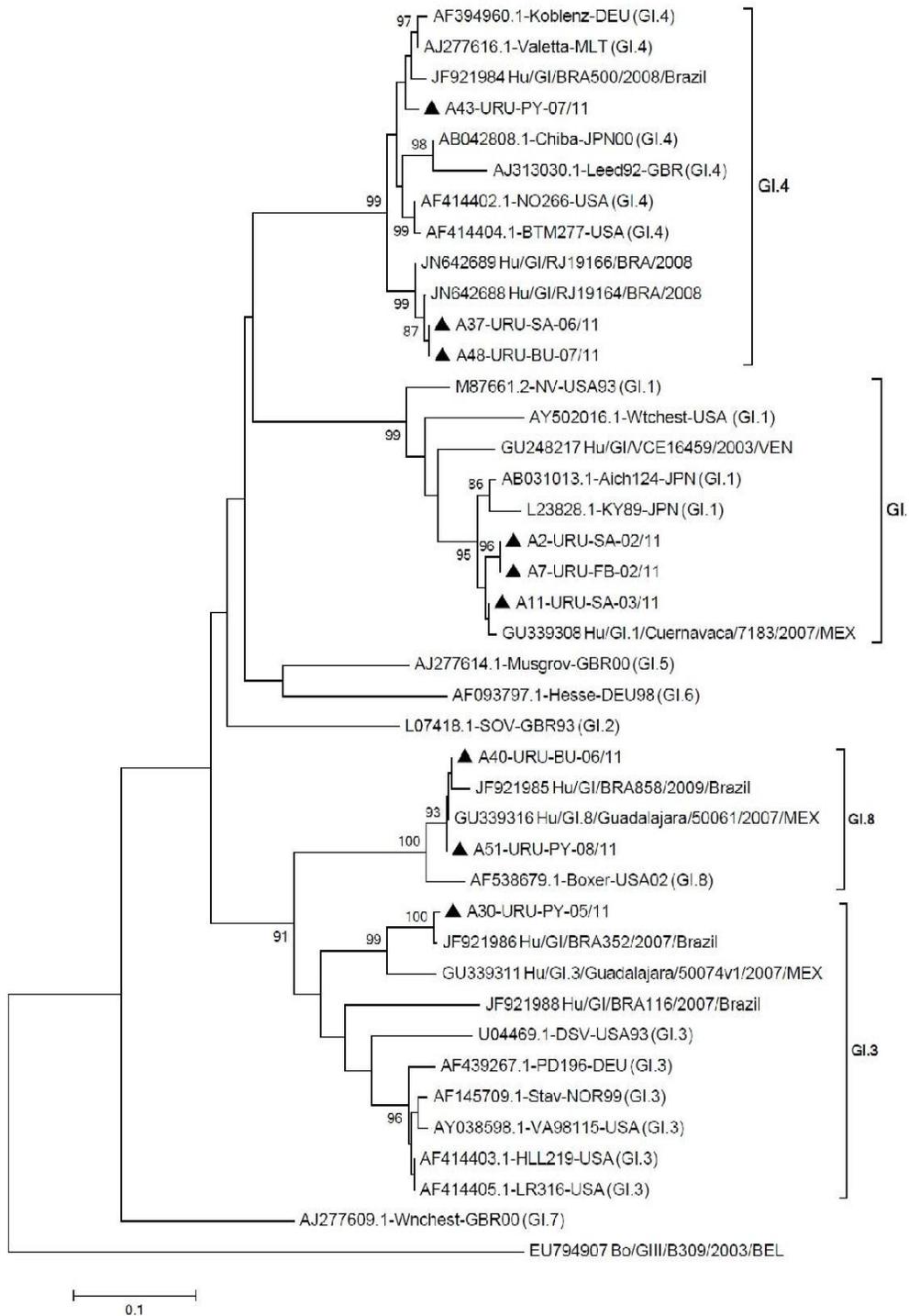


Figura 35- Análisis Filogenético de las secuencias de cápside de NVGI de las muestras del Río Uruguay entre Febrero 2011-Agosto 2011. Las secuencias de este estudio se marcaron con un triángulo.

4.4.4 Análisis filogenético de la cápside de NVGII

Como resultado del análisis de los árboles realizados en el estudio filogenético de las muestras del Río Uruguay, es de destacar que las muestras están más heterogéneamente distribuidas, siendo parte de 5 linajes distintivos dentro de un genogrupo (figura 36).

En el linaje I de NVGII, la muestra A41 y la A43, están muy cercanas filogenéticamente entre sí y a su vez separadas de otro cluster con la mayoría de las secuencias prototipo.

El linaje 13 de NVGII contiene 3 muestras de nuestro estudio, las cuales junto con una secuencia de Brasil del año 2009 forma un grupo monofilético, apoyado por un elevado valor de Bootstrap (99).

Por otra parte, otras dos cepas uruguayas aisladas en este estudio, la A1 y la A54, dos muestras bien distantes en el tiempo, pero que son las únicas dos que agrupan separadas; ambas están emparentadas con cepas de Brasil, de México y Nicaragua.

En GII.6 encontramos a la secuencia de A3, la cual se agrupa con muestras de Japón y USA, que están cercanas filogenéticamente. A su vez, A3 está emparentada con una cepa de México que se colectó en 2007.

Finalmente, A40 pertenece, se encuentra formando un cluster único separado del resto. Se divide en dos grandes clusters formados casi exclusivamente por cepas prototipo que no son de la región, con la excepción de 3 cepas mejicanas.

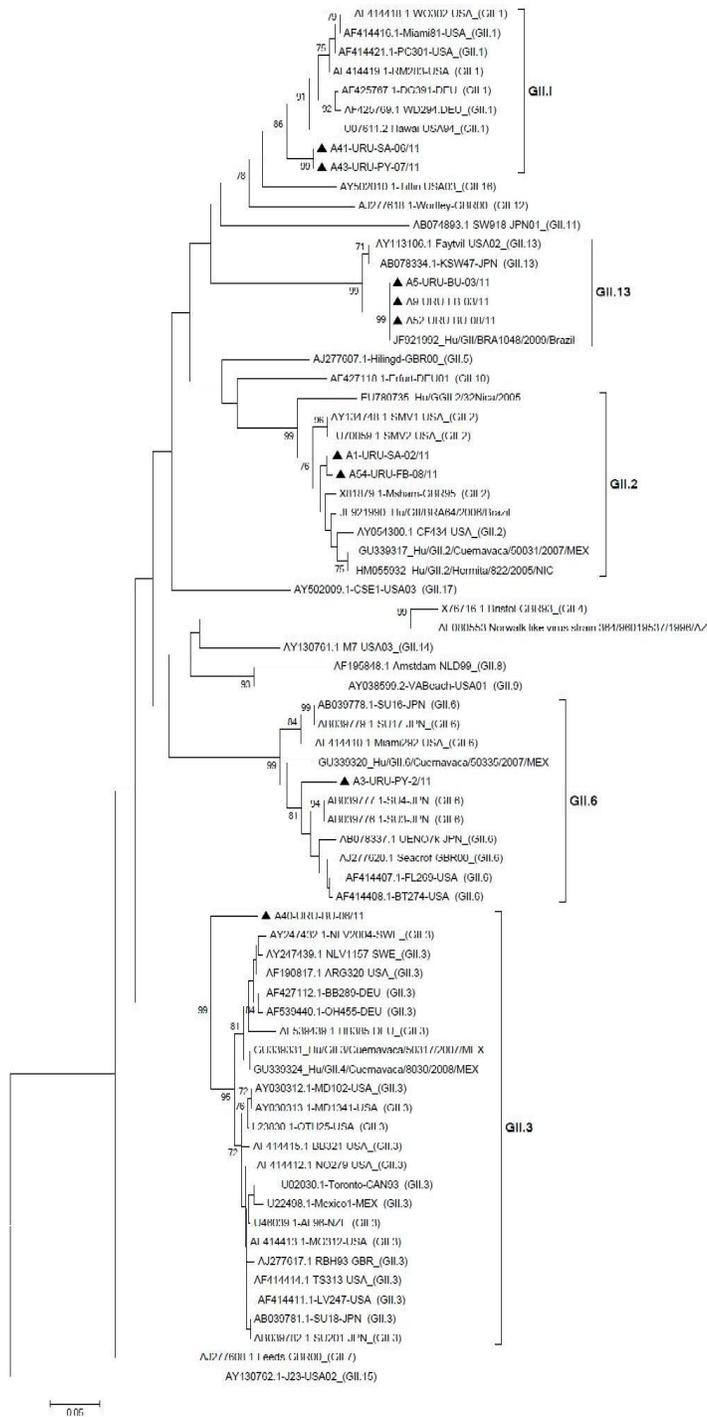


Figura 36- Análisis Filogenético de las secuencias de cápside de NVGII de las muestras del Río Uruguay entre Febrero 2011-Agosto 2011. Las secuencias de este estudio se marcaron con un triángulo.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio representan los primeros datos logrados que permiten demostrar el impacto directo que tiene la actividad humana sobre el Río Uruguay en términos de eliminación de virus gastroentéricos a través del vertido de aguas residuales en su mayoría no tratadas. La multiplicidad de análisis realizados sobre el numeroso muestreo; representado en cada una de las cuatro estaciones del año, en cuatro puntos distintos en el Río Uruguay, nos han permitido generar datos relevantes en el campo de la “Virología Ambiental” útiles para el país y la región. En si mismos, los datos permiten sacar conclusiones directas sobre: estacionalidad, sensibilidad de técnicas moleculares para su discusión, el grado de positividad para los distintos virus en estudio y finalmente poder establecer la epidemiología molecular.

Se colectaron 99 muestras quincenalmente en los cuatro puntos durante el período de un año. Ellos fueron seleccionados de manera estratégica con el propósito de generar una “foto instantánea” que abarque una región extensa y nos informe sobre la circulación viral en el Río Uruguay a lo largo del tiempo. Como se mencionó anteriormente, el Río Uruguay tiene muchos centros poblados sobre sus riberas los que contribuyen con sus aguas residuales a lo largo del todo litoral del territorio nacional. Con ellas se pudo realizar la concentración viral de manera satisfactoria mediante la correcta puesta a punto del método de ultracentrifugación. La concentración viral es una etapa muy importante para una fiel detección y posterior cuantificación de las muestras ambientales debido a los bajos títulos virales hallados en algunas de las muestras (Katayama *et al.*, 2009). El desarrollo de ésta metodología, cómo uno de los objetivos específicos de éste estudio, fue una elección acertada frente a otros métodos de concentración viral porque tiene la ventaja de ser sencilla en cuanto a su implementación, mas rápida y mas económica que las disponibles comercialmente (Calgua *et al.*, 2008; Bosch *et al.*, 2008). En este paso cada muestra fue experimentalmente contaminada con el bacteriófago (PP7) a ser utilizado como control interno (CI), el cual se recomienda en estudios de virología ambiental ya que valida todos los pasos sucesivos. Es decir, la extracción de ARN, la reacción de RT y posteriormente la PCR, fueron eficientemente performadas para cada una de las muestras involucradas en el presente estudio. Es importante destacar que el uso del CI PP7 permite eliminar los resultados falsos negativos como resultado de los inhibidores, los cuales están presentes en elevadas concentraciones en las aguas residuales (Bosch *et al.*, 2008).

Posteriormente, tanto la RT como las reacciones de PCR y QPCR para cada unos de los virus implicados en el presente estudio, RVA, NV y EV, se lograron poner a punto

adecuadamente, permitiendo una correcta obtención de los cDNA y luego el correcto estudio de todas las muestras.

Los resultados obtenidos han establecido que RVA fue el más prevalente, con 48,5 %, seguido de EV con un 41,6%; de NVGII con un 39,4% y finalmente NV GI con solo 21%. Los resultados sobre la prevalencia de RVA están en concordancia con los obtenidos en otras regiones del mundo como Alemania y China, indicando que es encontrado en el ambiente en porcentajes entre 32 y 90% (He *et al.*, 2011; Hamza *et al.*, 2009). Resultados de la región también apoyan esta distribución ya que Prado y cols (Prado *et al.*, 2011) detectaron a RVA en el ambiente con una frecuencia de 95% en muestras de Rio de Janeiro Brasil entre el 2005 y 2008. Pero no en todos los países se ha encontrado tal distribución. Para NV en los países antes mencionados se lo encontró entre 3 y 31 % en el ambiente, en Brasil en un 28% (Prado *et al.*, 2011) mientras que en nuestro estudio NVGII fue de 39%, algo superior a lo detectado en la región. Discriminando por genogrupo de NV, se encontró que NVGII es más frecuentemente identificado en el ambiente que NVGI, lo cual concuerda con la bibliografía, ya que estudios recientes realizados en aguas residuales (Katayama *et al.*, 2008; Kitajima *et al.*, 2011), afirman que la distribución de los genogrupos es mayor para NV GII. Para EV no hay muchos trabajos de virología ambiental en la región. En un trabajo realizado en Brasil (Formiga-Cruz *et al.*, 2005) fueron detectados un 40% de muestras ambientales positivas. Por otro lado, a nivel clínico (Cisterna *et al.*, 2007), en Argentina, se llevó adelante un importante estudio retrospectivo donde se detectó, caracterizó y tipificó EV humanos en 2167 casos de parálisis flácida aguda, meningitis aséptica y encefalitis aguda, desde 1991 hasta 1998. Se identificaron: Echovirus 4 (E4), E9, E30 y E17 a partir de brotes de meningitis; a su vez Coxsackievirus A2 (CAV2), CBV2, CBV5, E7, E11, E19, E24, E29 y enterovirus 71 se recuperaron sólo en casos esporádicos. Tres serotipos diferentes fueron identificados en pacientes con encefalitis: E4, E7 y E24. Se detectaron 28 serotipos de enterovirus no polio en casos de parálisis flácida aguda. Por otro lado, en Japón se realizó un estudio (Katayama *et al.*, 2008) en aguas residuales tratadas y EV fue detectado en un 65% de las muestras, apoyando la idea de que las propiedades fisicoquímicas de los picornavirus les permiten persistir en el ambiente por períodos largos de tiempo e incluso resistir los tratamientos.

Por otro lado, luego de secuenciar los respectivos productos de PCR, se ha puesto en evidencia la necesidad de sub clonar los mismos, ya que podemos analizar la diversidad viral en mayor profundidad.

Recordemos que los resultados obtenidos en este tipo de estudios reflejan la circulación viral en la población y que no siempre coinciden exactamente con los datos y síntomas clínicos, ya que estamos recogiendo virus que son excretados por personas

sintomáticas y asintomáticas o procedentes de poblaciones donde no se documenta a nivel clínico porque muchas veces no se realiza la respectiva consulta médica, esto genera como resultado que las diarreas están en general subdiagnosticadas en el país y en el mundo.

Estos son los primeros resultados que existen en el país y en la región sobre la circulación viral en un Río con un caudal importante, como es este caso. Si bien se encontraron valores acorde y superando los que muestra la bibliografía, hay muchas variables a tener en cuenta al hacer un estudio de las aguas residuales de poblaciones heterogéneas donde, como se sabe (Miagostovich *et al.*, 2008) el tamaño y las condiciones sanitarias (Melo *et al.*, 2005) influyen de manera sustancial. También es importante conocer si la red de colectores tiene una única salida al río colectando el agua residual de toda la población, o existen varios ramales; en otros estudios (Barril *et al.*, 2008; Hejkal *et al.*, 1984) se ha establecido que el volumen de salida influye en los niveles de viremia.

Por otra parte, hay diversos factores que afectan la viabilidad y distribución de los virus entéricos en el ambiente, algunos de ellos son: el PH, la temperatura del agua, la susceptibilidad a la inactivación por radiación UV de luz solar, la unión de los virus a sólidos suspendidos, la presencia de productos químicos, las precipitaciones, el flujo de corriente.

Al analizar detalladamente los puntos de colecta por separado, llama la atención el número de cocirculaciones virales presentes en Paysandú, donde en todos los meses se detectaron por lo menos dos virus diferentes. En suma, de la comparación del número de muestras positivas por zona, Paysandú supera a Salto en la proporción de muestras positivas para NVGI y RVA indicándo un alto grado de contaminación, teniendo en cuenta a su vez que el tamaño poblacional es menor con respecto a Salto. De todas formas, para próximos estudios será de vital importancia conocer en detalle la red de colectores de ambas ciudades y las áreas que cubren, ya que podríamos estar sesgando nuestro muestreo a ramales que no representan el verdadero flujo de aguas residuales de una ciudad tan poblada como Salto, por ejemplo.

A nivel general, las co-circulaciones halladas en los otros puntos, también fueron muy elevadas y hablan de la elevada viremia que está recibiendo el río a diario.

Con respecto a la adhesión de los virus a sólidos suspendidos, en el caso de la ciudad de Bella unión, sus aguas residuales son primero depositadas en una laguna facultativa donde la flora microbiana presente en dicho lugar contribuye a la degradación de la materia orgánica, disminuyendo así los agregados de materia orgánica que llegan al río. Los sedimentos del agua residual, al llegar a un lugar donde el flujo de corriente es

mucho menor, decantan y muchas partículas virales se asocian a ellos; las que se protegen del daño por UV (Fong *et al.*, 2005). Esto podría ser la explicación por la cual en Bella Unión hubo una detección notoriamente baja de todos los virus en relación a los demás punto de colecta. A su vez, tal como fue demostrado previamente (Meschke *et al.*, 1998), los EV son los que mas se adsorben al sedimento, lo cual podría ser la causa por la cual no están presentes y así explicar la ausencia casi total de muestras positivas para EV en Bella Unión.

Es muy importante realizar el monitoreo de los virus en el ambiente porque entre otros aspectos es posible estudiar una mas amplia gama de variantes genéticas que aportan datos sobre la evolución viral; así como determinar la re-emergencia de estirpes peligrosas para la población. Un ejemplo, es la potencial aparición de variantes genéticas de poliovirus del cluster C de coxsackievirus A (Jiang *et al.*, 2007) y su implicancia en un mundo libre de polio. Los virólogos ambientales debemos estar listos para manejar este tipo de amenazas a través de la rápida identificación y caracterización de los nuevos patógenos (Etherington *et al.*, 2006; Ambrose *et al.*, 2006), por ello entendemos que ésta tesis hace importantes aportes en el desarrollo de metodologías que han sido eficientemente utilizadas para la investigación realizada.

No siempre la detección clínica precedió la detección ambiental, y muchas veces los virus encontrados en aguas residuales durante la primavera sirvieron para predecir las cepas que predominarían durante el siguiente verano (Fong *et al.*, 2005).

Al analizar la estacionalidad, no encontramos para todos los virus el mismo patrón. En NV se observó una marcada estacionalidad, lo que concuerda con lo sugerido por previas investigaciones (Kitajima *et al.*, 2011). Como es de esperar, se ha observado una mayor presencia viral en invierno, pero sin embargo, a diferencia de lo reportado por países en los cuales no existen en los meses cálidos zonas de playas o aguas recreacionales de uso común; nuestros estudios revelaron una elevada prevalencia durante los meses de verano. Se observó una marcada estacionalidad en invierno y verano para RVA.

Rotavirus, NV y EV son conocidos por su resistencia a varios de los tratamientos en las PTAR (Ansari *et al.*, 1994; Miagostovich *et al.*, 2008). En nuestro modelo de estudio no existe pretratamiento o tratamiento de las aguas residuales con la excepción de Bella Unión. Por lo tanto los resultados obtenidos reflejan de manera muy realistas el grado de contaminación del ambiente y permiten determinar las características filogenéticas de las estirpes circulantes en la población general.

La metodología de PCR en tiempo real fue exitosamente implementada para RVA, NVGI, NVGII y EV.

Para EV fue el método utilizado para analizar las muestras. Dicho protocolo contempla la mayoría de las variantes de EV, por ser la secuencia blanco del genoma viral altamente conservada (5'UTR).

Los análisis para detectar la presencia y el genotipo de RVA funcionaron correctamente, con elevada especificidad y sensibilidad. Los porcentajes de positividad obtenidos en estos estudios están de acuerdo con otros trabajos realizados en la región, o incluso nuestros datos han superado el porcentaje de positividad establecido en otras regiones. Se obtuvo un porcentaje de positividad de 48,5% para RVA, siendo G2 el genotipo predominante con 52% del total de los RVA.

Para Norovirus, al comienzo se utilizaron otras técnicas de PCR que permitieron la amplificación de otras regiones del genoma, por ejemplo el gen de la polimerasa viral (Boxman *et al.*, 2006); la misma no brindó resultados adecuados y por ello no fue la metodología utilizada en éstos estudios. Luego se implementó el método de PCR que amplifica el gen de la cápside viral, lo que permitió aumentar la sensibilidad y especificidad (Kitajima *et al.*, 2010). Ésta región del genoma viral brinda información filogenética que permite distinguir variantes entre cepas del genogrupo II.4, cepas relevantes ya que son predominantes en las asociadas a brotes de gastroenteritis. Si bien en nuestro estudio, sorprendentemente no detectamos este linaje de GII, no podemos adjudicarle la falta de sensibilidad a esta técnica ya que fue especialmente evaluada para detectar variantes dentro de ese tipo (CDC MMWR Recomm Rep. 2011).

Por otro lado, la cuantificación de NV por PCR en tiempo real, se llevo a cabo según la guía del CDC, donde se concluyó que la región adecuada para hacer ensayos de cuantificación es la región C, la cual es la región de unión entre el ORF 1 y el ORF 2, región que no casualmente, es la mas conservada del genoma de Norovirus, con un alto nivel de identidad de secuencia entre cepas de un mismo genogrupo. Sin embargo, también debido a la elevada variabilidad genética del virus, se utilizan dos sondas diferentes una para cada genogrupo I y II respectivamente.

Todas las metodologías utilizadas han sido complementarias y han conducido a resultados muy robustos, ya que cada muestra fue analizada por dos métodos diferentes, con la excepción de EV en el cual solo se detectó por PCR en tiempo real. Para RVA y NV, las muestras han sido testeadas por 2 o 3 técnicas distintas (RVA con PCR multiplex, PCR Iturriza Gómara y qPCR), ya que las PCR cualitativas no amplificaron los mismos fragmentos del genoma que la PCR cuantitativa.

La qPCR no solo reconfirma los casos positivos mediante la amplificación de otras regiones de los genomas de los virus de interés, sino que también nos brinda la carga

viral de esa muestra y éste dato nos permite observar en mayor profundidad el grado de contaminación que se está ejerciendo sobre el ambiente acuático, en la eliminación de aguas residuales sin tratar. A su vez la cuantificación viral nos aproxima a determinar el grado de contaminación de las aguas residuales en las distintas épocas del año y en puntos con características demográficas únicas que hacen también a la viremia detectada en las muestras. Es de destacar que estas aguas residuales llegan directamente al Río Uruguay donde hay zonas de playa habilitadas y donde todos estos virus circulan.

Al observar algunos de los electroferogramas obtenidos para RVA y NV, se pueden visualizar la co-circulación de estirpes virales minoritarias; lo que pone de manifiesto como perspectiva la necesidad de subclonar dichos productos de PCR para luego detectar de manera efectiva todas las estirpes que están presentes en una misma muestra y no solo la mayoritaria, determinando así la diversidad intrínseca de la muestra.

El análisis de la distribución de genotipos obtenidos por la multiplex está de acuerdo a los genotipos más comunes capaces de producir diarrea en humanos, clasificándose un elevado porcentaje de muestra como pertenecientes a G2. Se ha visto que en G1 ocurre una detección menor a lo esperado (Laird *et al.*, 2003). En los casos que al principio fueron indeterminados, luego un gran porcentaje fue perteneciente a G1. También era lo esperado en ambiente, aunque en Brasil se ha detectado G1 con mayor frecuencia que G2 (Araújo *et al.*, 2007) al igual que en Paraguay (Parra and Espínola 2006). Para Argentina, también coincidió con un genotipo esperado ya que según Barril y colaboradores, las cepas de VP7 pertenecen mayoritariamente a G1 y G3 en ambiente. En nuestros estudios, G3 fue establecida por secuenciación y posterior análisis filogenético y no por métodos de genotipaje por PCR.

A su vez trabajos que correlacionan las cepas detectadas en casos clínicos en relación a la ambiente, revelan una estrecha relación entre las cepas detectadas en pacientes y cepas de aguas residuales. Tal es el caso del trabajo de Barril, en Argentina en 2010 y el de Bucardo en Nicaragua 2011. Para VP4 se encontró una distribución entre dos genotipos, P8 y P4 y con menos frecuencia P10 y P11, con 4 y 2% respectivamente. En nuestros estudios y otros realizados en la región (Parra y Espínola 2006), hubo altos porcentajes de muestras indeterminadas para VP4 y VP7, esto puede deberse a que los primers utilizados no tengan en cuenta los polimorfismos presentes en esa zona.

NV posee una alta diversidad genética y se ve reflejada en los árboles filogenéticos realizados en nuestros estudios. El análisis filogenético de las respectivas secuencias para GI y GII, de la región de la cápside, nos permitió establecer con precisión los tipos virales en todas las muestras involucradas en este estudio. Por otro lado, el protocolo

que estamos utilizando es muy reciente y por ende hay pocas secuencias disponibles en el Genbank procedentes de la región. La distribución entre genogrupos de NV está de acuerdo con la bibliografía, ya que fue más abundante NVGII.

G3 es un genotipo usualmente encontrado en caninos. El trabajo de Laird y colaboradores en 2003 (publicó la cepa mejicana que está cercanamente emparentada con la nuestra) demuestra la circulación de esta cepa en un niño evidenciando la potencial ocurrencia de reassortments con segmentos de RV canino. Centrándonos en los linajes que nuestras muestras pertenecen en relación a lo que ocurre con muestras de la región, Parra y Espínola obtuvieron la mayoría de sus muestras dentro del mismo linaje de G1 que las nuestras. Un trabajo mas reciente en Brasil, también obtuvo sus cepas de G1 en el linaje II (Goncalvez *et al.*, 2012).

En el caso de VP4 se encontró una distribución genotípica muy similar a la esperada para la región, teniendo dos muestras pertenecientes al linaje V de P[4] y 4 muestras muy emparentadas entre si que se agrupan con una cepa de estados Unidos, dentro del linaje I de P8. Encontramos una fuerte vinculación entre las cepas de P[4] con las de Brasil, como se puede visualizar en el árbol.

Es muy importante la información obtenida en el presente estudio ya que ha permitido establecer por primera vez las estirpes virales que circulan en el Río Uruguay. De la misma forma este tipo de estudios ha sido de gran utilidad en otros países tales como Nicaragua (Bucardo *et al.*, 2011) quienes tienen la vacuna de RVA en el esquema de vacunación y los estudios post-vacunación han determinado que los genotipos encontrados cambian en sus proporciones notoriamente y se reduce a su vez la circulación de RVA; al mismo tiempo que se detecta un aumento en la circulación de NV.

En relación a esto, nuestro país no cuenta con la vacuna en el esquema de vacunación y si bien nuestros países vecinos están con ella incluida en el esquema (Brasil) o en proceso (Argentina), nuestra cepa G1 (la principal en la vacuna) no agrupo en el mismo linaje que la cepa vacunal.

Para NVGI se detectó la presencia de muestras en 4 linajes diferentes, 3 muestras en GI.4, muy emparentadas con cepas de Brasil del 2008, 3 muestras en el linaje GI.1, mas emparentadas filogenéticamente con una cepa de Méjico. Por otra parte también cercanas a una cepa de Méjico, dos secuencias de este estudio junto con otra de Brasil de 2009 y el prototipo Boxer-USA02 formaron el clúster de GI.8.

Únicamente una muestra formó parte del clúster de GI.3 y compartía parentesco con una cepa de Brasil del 2007 y mas lejanamente con una de Méjico del mismo año. En

NVGI se ve por primera vez en nuestras muestras un parentesco cercano con lo que circula en Méjico, que no es un país tan cercano geográficamente. También se observa un gran parentesco con cepas de Brasil. El linaje GI.3 es esperado en la región, en Brasil el trabajo de Victoria y colaboradores en 2009 detectó NVGI que agruparon principalmente en ese linaje.

En el caso de NVGII tuvimos el sorprendente resultado de la ausencia de NVGII.4, el responsable de la mayoría de los brotes de gastroenteritis causada por NVGII. Este genotipo era el predominante en trabajos de la región (Victoria *et al.*, 2009). Pero, en cambio, encontramos una importante diversidad y es importante destacar que dichas secuencias pertenecen a los primeros 6 meses de muestreo. De los linajes que estuvieron presentes, el GII.13 fue el más representado, con 3 muestras que, en conjunto con una cepa de 2009 de Brasil, forman un grupo monofilético con las nuestras, y agrupan con la prototipo del linaje (FaytviI-USA02) para conformar el linaje GII.13. Cabe destacar que dichas muestras circularon en puntos diferentes y en momentos del año diferentes.

El linaje GII.2 estuvo representado por dos muestras, muy emparentadas entre sí, y cercanas filogenéticamente a cepas de Nicaragua, Brasil y Méjico.

GII.1 tuvo dos muestras que agruparon juntas y relacionadas a una cepa prototipo Hawaii-USA94.

Tuvimos una cepa perteneciente a GII.6 y una al linaje GII.3, cercana filogenéticamente a una cepa de Méjico. En suma, se observó una gran diversidad y similitud con cepas de Brasil, Méjico y Nicaragua. En Brasil hay trabajos previos que han reportado cepas en los linajes GII.1, GII.2, GII.3, GII.6 y GII.13 (Ferreira *et al.*, 2008)

6. Conclusiones y Perspectivas

□ Fue optimizada la metodología de ultracentrifugación para realizar la concentración viral a partir de muestras de aguas residuales.

□ La utilización del fago PP7 como control interno fue adecuada para validar: la concentración viral por la técnica de ultracentrifugación, la extracción de ARN y la respectiva RT-PCR.

□ Fueron estandarizadas las metodologías de detección y cuantificación de RVA, NV. □

Fueron estandarizadas las metodologías cuantificación de EV.

□ Fue observada, por primera vez en el Río Uruguay, una amplia circulación de virus entéricos: RVA, NV y EV, estando presentes en la mayoría de las colectas, principalmente en Paysandú.

□ RVA fue el más prevalente, con 48,5 %, seguido de EV con un 41,6%; de NVGII con un 39,4% y finalmente NV GI con solo 21%.

□ La caracterización molecular de los virus entéricos demostró la presencia de diferentes genotipos para cada uno de los virus estudiados evidenciando la gran variabilidad genética de estos virus y su amplia circulación en muestras de aguas residuales.

- Durante la presente tesis, también se puso a punto otra técnica de concentración viral, denominada “floculación” con la profesora Marize Miagostovich, del laboratorio de Virología Comparada del Instituto Oswaldo Cruz, de la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil. Cabe destacar que si bien no fue utilizada en el marco de ésta tesis, será una técnica muy útil para el procesamiento de futuras muestras ambientales de nuestro laboratorio.

□ Como perspectiva, se plantea completar la secuenciación de todas las muestras a fin de completar el estudio anual previamente establecido.

□ Se desarrollará en el futuro en nuestro laboratorio la técnica de ICC-PCR, que nos permitirá establecer la viabilidad viral.

7- Bibliografía

- Aaby P, Sommerfelt H. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin. Microbiol.* 2000 Jan.,38(1):264-7.
- Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Nov 1.,156(1):107-11.
- Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Oct.,60(10):3704-10.
- Ackermann WW, Fujioka RS, Kurtz HB. Cationic modulation of the inactivation of poliovirus by heat. *Arch Environ Health.* 1970 Sep.,21(3):377-81.
- Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses.. *J Infect Dis.* 2000 May.,181 Suppl 2:S336-48.
- Apostol LN, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, Saito M, Omura T, Oshitani H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes.* 2012 Jun 29.
- Arvelo W, Sosa SM, Juliao P, López MR, Estevéz A, López B, Morales-Betoulle ME, González M, Gregoricus NA, Hall AJ, Vinje J, Parashar U, Lindblade KA. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J Clin Virol.* 2012 Sep.,55(1):8-11.
- Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 19.,102(29):10327-32.
- Ball JM, Mitchell DM, Gibbons TF, Parr RD. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. *Viral Immunol.* 2005.,18(1):27-40.
- Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol.* 2010 Jul.,82(7):1277-81.
- Bauer S, Gottesman G, Sirota L, Litmanovitz I, Ashkenazi S, Levi I. Severe Coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril. *Eur J Pediatr.* 2002 Sep.,161(9):491-3.
- Berois M, Libersou S, Russi J, Arbiza J, Cohen J. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. *J Med Virol.* 2003 Nov.,71(3):456-62.
- Bilcke J, Van Damme P, Van Ranst M, Hens N, Aerts M, Beutels P. Estimating the incidence of symptomatic rotavirus infections: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2009 Jun 26.,4(6):e6060.
- Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1983 Jul 14.,309(2):72-6.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* 1974 Feb 2.,1(7849):149-51.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973 Dec 8.,2(7841):1281-3.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C., Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010 Jun 5.;375(9730):1969-87.

Blutt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Jan.;23(1):39-43.

Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gómez JA. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol*. 2001 Sep.;65(1):190-8.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, Gallay A, Vaillant V, de Valk H, Chikhi-Brachet R, Flahaut A, Pothier P, Kohli E. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep.;43(9):4659-64.

Borchardt MA, Spencer SK, Kieke BJ, Lambertini E, Loge FJ. Viruses in Non-Disinfected Drinking Water from Municipal Wells and Community Incidence of Acute Gastrointestinal Illness. *Environ Health Perspect*. 2012 May 31.

Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*. 1998 Sep.;1(3):191-6.

Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J. Virol*. 1999 Dec.;73(12):9969-75. Erratum in: *J Virol*. 2000 Dec.;74(24):12003.

Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, Nordgren J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One*. 2011.;6(10):e25962. Epub 2011 Oct 7.

Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jul.;11(7):1079-85.

Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol*. 2007 Dec.;88(Pt 12):3347-59. Caillou S, Castagnaro N, Naval M. Sewage sludges: application of a technique for recovering Enterovirus. *Rev Argent Microbiol*. 1998 Apr-Jun.;30(2):96-9.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, Girones R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods*. 2008 Nov.;153(2):79-83.

Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, de Lima MO, Sardi SI. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol*. 2008.;153(6):1125-9.

Cao D, Barro M, Hoshino Y. Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *J Virol*. 2008 Jun.;82(12):6073-7.

Carlson JA, Middleton PJ, Szymanski MT, Huber J, Petric M. Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child*. 1978 May.;132(5):477-9.

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*. 2005.;98(6):1354-80.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM, Leite JP. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Jan.,30(1 Suppl):S35-41.

Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Oct.,23(10 Suppl):S168-72.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus activity—United States, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007 Aug 24.,56(33):842-6.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Progress toward interruption of wild poliovirus transmission--worldwide, January 2010-March 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011 May 13.,60(18):582-6.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on vaccine-derived polioviruses--worldwide, July 2009-March 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011 Jul 1.,60(25):846-50.

CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res*. 2008 May.,42(10-11):2618-28.

Chambon M, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H. Comparative sensitivity of the echovirus type 25 JV-4 prototype strain and two recent isolates to glutaraldehyde at low concentrations. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Feb.,60(2):387-92.

Chandran A, Fitzwater S, Zhen A, Santosham M. Prevention of rotavirus Chao DY, Wei JY, Chang WF, Wang J, Wang LC. Detection of multiple genotypes of calicivirus infection in asymptomatic Swine in taiwan. *Zoonoses Public Health*.2012 Sep.,59(6):434-44.

Characterization of enterovirus isolates from patients with heart muscle disease in a selenium-deficient area of China. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct.,38(10):3538-43.

Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2006 Nov.,80(21):10372-81.

Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V, Korotkova E, Dragunsky E, Agol VI,Chumakov K. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5.,100(16):9398-403.

Christy C, Madore HP, Pichichero ME, Gala C, Pincus P, Vosefski D, Hoshino Y, Kapikian A, Dolin R. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1988 Sep.,7(9):645-50.

Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Sep-Oct.,87(5):445-9.

Cisterna DM, Palacios G, Rivero K, Girard D, Lema C, Freire MC. Epidemiology of enterovirus associated with neurologic diseases. *Medicina (B Aires)*.2007.,67(2):113-9.

Cloete TE, Da Silva E, Nel LH. Removal of waterborne human enteric viruses and coliphages with oxidized coal. *Curr Microbiol*. 1998 Jul.,37(1):23-7.

Combelas N, Holmblat B, Joffret ML, Colbère-Garapin F, Delpeyroux F. Concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *J Virol*. 1993 Nov.,67(11):6625-32.

Cortese MM, Parashar UD., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2009 Feb 6.,58(RR-2):1-25. Erratum in: MMWR Recomm Rep. 2010 Aug 27.,59(33):1074.

Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, Hernández JM, Pérez G, Vázquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol. 1990 May.,131(5):886-904.

Daley JK, Gechman LA, Skipworth J, Rall GF. Poliovirus replication and spread in primary neuron cultures. Virology. 2005 Sep 15.,340(1):10-20.

Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. Science. 1948 Jul 16.,108(2794):61-2.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. J. Clin.Microbiol. 1994 Jul.,32(7):1820-2.

Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. Lancet. 1975 Feb 1.,1(7901):242-6.

Dayan GH, Rodríguez R, Vinjé J, Vásconez N, Cáceres V, Gregoricus N, Sobsey M, Landaverde M. Assessment of areas at increased risk for poliovirus circulation in Ecuador. Epidemiol Infect. 2004 Oct.,132(5):787-95.

de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Bartelds AI, van Duynhoven YT. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. Emerg Infect Dis. 2001 Jan-Feb.,7(1):82-91.

Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. Arch Virol Suppl.1996.,12:37-51. determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Aug.,78(8):4887-91.

Diario El Argentino (Guauguaychú Argentina)2012:
<http://www.diarioelargentino.com.ar/noticias/101873/gorla-no-hay-un-virus-sino-que-estamos-ante-las-diarreas-estacionales>

Diario El País (Uruguay)2012: <http://www.elpais.com.uy/120119/ultmo-619558/ultimo-momento/meteorologia-advierde-por-altas-temperaturas/>

Diario El telégrafo (Paysandú) enero 2011:
<http://www.eltelegrafo.com/index.php?id=41311&seccion=locales&fechaedicion=2011-02-24>

Díaz T J, Solari G V, Cáceres C O, Mena A J, Baeza P S, Muñoz U X, O'Ryan G M, Galeno A H, Maldonado B A, Mamani M N. Outbreaks of acute gastroenteritis in Antofagasta Region: Chile 2010. Rev Chilena Infectol. 2012 Feb.,29(1):19-25.

Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. MMWR Recomm Rep. 2011 Mar 4.,60(RR-3):1-18.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1972.,140:578-583.

Domingo E, Baranowski E, Nuñez JI, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S, Molina N, Sobrino F. Quasispecies and molecular evolution of viruses. *Rev Sci Tech*. 2000 Apr.,19(1):55-63.

Dong Y, Kim J, Lewis GD. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *J Appl Microbiol*. 2010 Mar.,108(3):800-9.

Dorval BL, Chow M, Klibanov AM. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Mar 31.,159(3):1177-83.

Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, da Costa EV, da Silva EE. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol*. 2006 Jan.,78(1):98-104.

Drebot MA, Campbell JJ, Lee SH. A genotypic characterization of enteroviral antigenic variants isolated in eastern Canada. *Virus Res*. 1999 Feb.,59(2):131-40.

EPA2005:http://water.epa.gov/polwaste/nps/upload/2005_4_29_nps_Ag_Runoff_Fact_Sheet.pdf
Protecting Water Quality From AGRICULTURAL RUNOFF.

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Oct.,19(5):467-74.

Etherington GJ, Dicks J, Roberts IN. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus *Norovirus*. *Virology*. 2006 Feb 5.,345(1):88-95.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*. 2002 Jul 1.,186(1):1-7.

Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of *Caliciviridae*. *J Virol*. 2008 Jun.,82(11):5408-16.

Fenwick A. Waterborne infectious diseases--could they be consigned to history. *Science*. 2006 Aug 25.,313(5790):1077-81. Erratum in: *Science*. 2006 Sep 29.,313(5795):1887.

Fernandez ML, Lindesmith LC, Baric RS, Moe CL. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Oct.,77(19):6884-8.

Fields *Virology*, 5th edition edn. Knipe, David M., Howley, Peter M. (eds), 2007, pp 1917-1974. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol*. 2011 Mar.,19(3):136-44.

Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. 1973 Dec 29.,2(7844):1497.

Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006 Apr 5.,24(15):2718-31.

Furman LM, Maaty WS, Petersen LK, Ettayebi K, Hardy ME, Bothner B. Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection. *Virol J*. 2009 Sep 10.,6:139.

Fuselli S, De Felice M, Morlino R, Turrio-Baldassarri L. A Three Year Study on 14 VOCs at One Site in Rome: Levels, Seasonal Variations, Indoor / Outdoor Ratio and Temporal Trends. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Oct. 2010, 7, 3792-3803.

Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, Eglin R, Gray JJ, Brown DW. Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001. *J Clin Microbiol.* 2004 Apr.,42(4):1396-401.

Gallimore CI, Lewis D, Taylor C, Cant A, Gennery A, Gray JJ. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol.*2004 Jun.,30(2):196-204.

Garbarg-Chenon A, Bricout F, Nicolas JC. Serological characterization of human reassortant rotaviruses. *J Virol.* 1986 Aug.,59(2):510-3.

Gault E, Schnepf N, Poncet D, Servant A, Teran S, Garbarg-Chenon A. A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. *J Virol.* 2001 Aug.,75(16):7305-14.

Gentry J, Vinjé J, Guadagnoli D, Lipp EK. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Sep.,75(17):5474-80.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, BhanMK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chainreaction. *J. Clin.Microbiol.* 1992 Jun.,30(6):1365-73.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.*2005 Sep 1.,192 Suppl 1:S146-59.

Gibson KE, Schwab KJ. Detection of bacterial indicators and human and bovine enteric viruses in surface water and groundwater sources potentially impacted by animal and human wastes in Lower Yakima Valley, Washington. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jan.,77(1):355-62.

Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B, Gentsch JR. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 2006 Jul 22.,368(9532):323-32.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009 Oct 29.,361(18):1776-85.

Gombold JL, Ramig RF. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J Virol.* 1986 Jan.,57(1):110-6.

Gomes KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol.* 2007 Nov.,79(11):1703-9.

González MM, Sarmiento L, Castaño JC, Giraldo AM, Salazar A, Muñoz NJ.[Detecting poliovirus in wastewater from Armenia, Colombia]. *Rev Salud Publica(Bogota).* 2006 May.,8 Suppl 1:13-23.

González RA, Torres-Vega MA, López S, Arias CF. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol.* 1998.,143(5):981-96. Erratum in: *Arch Virol* 1998.,143(10):2064.

Gray JJ, Kirkwood C, Page N, Iturriza-Gómara M. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeablestrains. *J. Clin.Virol.* 2008 Aug.,42(4):368-73.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 2000 May.,181 Suppl 2:S322-30.

Griffin DW, Gibson CJ 3rd, Lipp EK, Riley K, Paul JH 3rd, Rose JB. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida

Keys. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Sep.,65(9):4118-25. Erratum in: *Appl Environ Microbiol* 2000 Feb.,66(2):876.

Günther H, Otto P, Heilmann P. Diarrhea in young calves. 6. Determination of the pathogenicity of a bovine coronavirus and an unidentified icosahedral virus. *Arch Exp Veterinarmed.* 1984 Sep.,38(5):781-92.

Günther H, Otto P. Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80) A new diarrhea pathogen in calves. *Arch Exp Veterinarmed.* 1987 Nov.,41(6):934-8.

Hansman G.S, Jiang X.J, Green K.Y *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology* 2010 Caister Academic Press.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2005 May.,71(5):2403-11.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Sci Technol.* 2006.,54(11-12):301-8.

Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr.,70(4):2154-60.

Hardy ME, Kramer SF, Treanor JJ, Estes MK. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch Virol.* 1997.,142(7):1469-79.

Harvala H, Sharp CP, Ngole EM, Delaporte E, Peeters M, Simmonds P. Detection and genetic characterization of enteroviruses circulating among wild populations of chimpanzees in Cameroon: relationship with human and simian enteroviruses. *J Virol.* 2011 May.,85(9):4480-6.

Heine J. *Beobachtungen über Lahmungszustände der untern Extremitäten und deren Behandlung.* Stuttgart, Germany: Kohler., 1840.

Hewitt J, Bell D, Simmons GC, Rivera-Aban M, Wolf S, Greening GE. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Dec.,73(24):7853-7.

Hilfenhaus J, Nowak T. Inactivation of hepatitis A virus by pasteurization and elimination of picornaviruses during manufacture of factor VIII concentrate. *Vox Sang.* 1994.,67 Suppl 1:62-6.

Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol.* 2010 May.,6(5):279-89.

Hoebe CJ, Vennema H, de Roda Husman AM, van Duynhoven YT. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis.* 2004 Feb 15.,189(4):699-705.

Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science.* 1985 Sep 27.,229(4720):1358-65.

Hörman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, von Bonsdorff CH, Torvela N, Heikinheimo A, Hänninen ML. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jan.,70(1):87-95.

- Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desselberger U. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology*. 1985 May.,143(1):88-103.
- Hundley F, McIntyre M, Clark B, Beards G, Wood D, Chrystie I, Desselberger U. Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J Virol*. 1987 Nov.,61(11):3365-72.
- Hyypiä T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol*. 1997 Jan.,78 (Pt 1):1-11.Review.
- INE 2004: www.ine.gub.uy/.../uruguayencifras2004/... Instituto Nacional de Estadística.
- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol*. 2004 Feb.,85(Pt 2):391-8.
- Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis*. 2002 May 15.,34(10):1351-61.
- Johnson RP, Povey RC. Feline calicivirus infection in kittens borne by cats persistently infected with the virus. *Res Vet Sci*. 1984 Jul.,37(1):114-9.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. ClinMicrobiol*. 2003 Apr.,41(4):1548-57.
- Kapikian AZ, Cline WL, Kim HW, Kalica AR, Wyatt RG, Vankirk DH, Chanock RM,James HD Jr, Vaughn AL. Antigenic relationships among five reovirus-like (RVL)agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1976 Sep.,152(4):535-9.
- Kapikian AZ, Gerin JL, Wyatt RG, Thornhill TS, Chanock RM. Density in cesium chloride of the 27 nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis: determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973 Mar.,142(3):874-7.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972 Nov.,10(5):1075-81.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Black RE, Greenberg HB, Flores J, Kalica AR, Hoshino Y, Chanock RM. Studies in volunteers with human rotaviruses. *Dev Biol Stand*. 1983.,53:209-18.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, Greenberg HB, Chanock RM. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis*. 1983 Jan.,147(1):95-106.
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis*. 1982 Aug.,146(2):190-7. Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*. 2010 Mar.,2(3):748-81.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Mar.,68(3):1033-9.
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, Gary GW, Hoff JC. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 1985 Aug.,50(2):261-4.

Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA. Circulating vaccinerived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ.* 2004 Jan.,82(1):16-23.

Kilgore PE, Belay ED, Hamlin DM, Noel JS, Humphrey CD, Gary HE Jr, Ando T, Kim MS, Racaniello VR. Enterovirus 70 receptor utilization is controlled by capsid residues that also regulate host range and cytopathogenicity. *J Virol.* 2007 Aug.,81(16):8648-55.

Kimura H, Nitami K, Mizuguchi A. Descriptive epidemiology for two outbreak cases of norovirus gastroenteritis in an elementary school. *Nihon Koshu Eisei Zasshi.* 2012 Feb.,59(2):101-11.

Kinnunen L, Huovilainen A, Pöyry T, Hovi T. Rapid molecular evolution of wild type 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J Gen Virol.* 1990 Feb.,71 (Pt 2):317-24.

Kirkwood CD, Streitberg R. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol.* 2008 Nov.,43(3):346-8.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. (2010) Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environmental Science and Technology*, 44(18), Setiembre, p.7116-7122.

Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature.* 1981 Jun 18.,291(5816):547-53.

Ko G, Jiang ZD, Okhuysen PC, DuPont HL. Fecal cytokines and markers of intestinal inflammation in international travelers with diarrhea due to Noroviruses. *J Med Virol.* 2006 Jun.,78(6):825-8.

Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Feb 1.,88(3):951-5.

Kojima K, Taniguchi K, Kawagishi-Kobayashi M, Matsuno S, Urasawa S. Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Res.* 2000 Apr.,67(2):163-71.

Kopecka H, Brown B, Pallansch M. Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res.* 1995 Oct.,38(2-3):125-36.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ.*2003.,81(3):197-204.

Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, Vainio K, Jackson V, Pothier P, Koch J, Schreier E, Böttiger BE, Koopmans M.,Food-borne viruses in Europe network. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 2006 Dec 14.,11(12).

Lazarow PB. Viruses exploiting peroxisomes. *Curr Opin Microbiol.* 2011 Aug.,14(4):458-69.

Lewin S, Norman R, Nannan N, Thomas E, Bradshaw D., South African Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Estimating the burden of disease attributable to unsafe water and lack of sanitation and hygiene in South Africa in 2000. *S Afr Med J.* 2007 Aug.,97(8 Pt 2):755-62.

L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G, Simard C. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes.* 2009 Aug.,39(1):66-75.

- Li D, Gu AZ, He M, Shi HC, Yang W. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Res.* 2009 Jul.,43(13):3261-9. Epub 2009 Apr 10.
- Li D, Gu AZ, Zeng S, Yang W, He M, Shi H. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. *J Environ Sci (China)*. 2011.,23(10):1691-8.
- Li JW, Wang XW, Rui QY, Song N, Zhang FG, Ou YC, Chao FH. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods*. 1998 Sep.,74(1):99-108.
- Liu BL, Lambden PR, Günther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol*. 1999 Jan.,73(1):819-25.
- Liu G, Kahan SM, Jia Y, Karst SM. Primary high-dose murine norovirus 1 infection fails to protect from secondary challenge with homologous virus. *J Virol*. 2009 Jul.,83(13):6963-8.
- Lodder WJ, Vinjé J, van De Heide R, de Roda Husman AM, Leenen EJ, Koopmans MP. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Dec.,65(12):5624-7.
- Lodder-Verschoor F, de Roda Husman AM, van den Berg HH, Stein A, van Pelt-Heerschap HM, van der Poel WH. Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. *J Food Prot*. 2005 Sep.,68(9):1853-9.
- Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol*. 2003 Oct.,77(19):10423-31.
- Ma JF, Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Nov.,60(11):4203-6.
- Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27.,140(3-4):246-55.
- Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, Decaro N, Elia G, Greco G, Corrente M, Desario C, Arista S, Banyai K, Koopmans M, Buonavoglia C. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul.,13(7):1071-3.
- Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, Desario C, Cavalli A, Corrente M, Camero M, Germinario CA, Bányai K, Di Martino B, Marsilio F, Carmichael LE, Buonavoglia C. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug.,14(8):1306-8.
- Matthijnsens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol*. 2009 Dec.,4(10):1303-16.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008 Apr.,82(7):3204-19.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011 Aug.,156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008.,153(8):1621-9.

Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreño V, Martella V, Bányai K, Garaicoechea L, Palombo EA, Novo L, Zeller M, Arista S, Gerna G, Rahman M, Van Ranst M. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J Virol.* 2009 Apr.,83(7):2917-29.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, De Vos S, De Leener K, Ciarlet M, Buonavoglia C, Van Ranst M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol.* 2006 Apr.,80(8):3801-10.

Matthijnssens J, Rahman M, Van Ranst M. Loop model: mechanism to explain partial gene duplications in segmented dsRNA viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 3.,340(1):140-4.

Matthijnssens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, Hoshino Y, Mertens PP, Carner GR, McNeal M, Sestak K, Van Ranst M, Patton JT. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol.* 2010 Feb.,84(4):2013-26.
Maunula L, Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol.* 2002 Dec.,76(23):11793-800.
May.,82(9):4429-40.

Medin O. Ueber eine Epidemie von spinaler Kinkerlahmung. *Verh X Int Med Kongr.* 1891.

Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Jan.,59(1):140-3.

Melnick JL, Shaw EW, Curnen EC. A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949 Jul.,71(3):344-9.

Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* 1989 Mar 10.,56(5):855-65.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silva LA, Leite JP. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jan.,74(2):375-82.

Mochizuki M. Different stabilities to bile among feline calicivirus strains of respiratory and enteric origin. *Vet Microbiol.* 1992 Jun 1.,N31(2-3):297-302.

Monroe SS, Kludt PE, Rosenthal DS, Freeman J, Glass RI. A university outbreak of gastroenteritis due to a small round-structured virus. Application of molecular diagnostics to identify the etiologic agent and patterns of transmission. *J Infect Dis.* 1996 Apr.,173(4):787-93.

Moore M. Centers for Disease Control. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis.* 1982 Jul.,146(1):103-8.

Morillo SG, Timenetsky Mdo C. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras.* 2011 Jul-Aug.,57(4):453-8.

Mueller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, Barril PA, Morel V, Balanant J, Bocacao J, Hewitt J, Gessner BD, Delpeyroux F, Nates SV. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Mar.,75(5):1395-401.

Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol.* 2007 Apr.,81(7):3251-63.

Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997 May 3.,349(9061):1269-76.

Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 2008.,153(5):957-60.

Natoni A, Kass GE, Carter MJ, Roberts LO. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *J Gen Virol.* 2006 Feb.,87(Pt 2):357-61.

Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharya R, Vinje J, Kobayashi N, Sarkar MC, Bhattacharya MK, Krishnan T. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. *Virology.* 2008 Jul 20.,377(1):117-23.

Norder, H., L. Bjerregaard, and L. O. Magnius. 2001. Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J. Med. Virol.* 63:35-44. Nov.,60(11):4203-6.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 1999 May,37(5):1288-93

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol.* 2004 Jan.,78(2):855-67.

Ofit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis.* 1996 Sep.,174 Suppl 1:S59-64.

Ogra PL, Karzon DT. Formation and function of poliovirus antibody in different tissues. *Prog Med Virol* 1971.,13:156-193.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2010 Jun.,7(6):2620-37.

Oliver SL, Batten CA, Deng Y, Elschner M, Otto P, Charpilienne A, Clarke IN, Bridger JC, Lambden PR. Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar.,44(3):992-8.

OMS. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/08.17, 2009. www.who.int/vaccines-documents/

O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994 Mar.,169(3):504-11.

OSE 2010: www.ose.com.uy/

Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *J Virol.* 2011 Nov.,85(22):12013-21.

Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y, Roussa E, Schreiber R, Cook DI, Kunzelmann K. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na⁺ absorption. *Pflugers Arch.* 2011 May.,461(5):579-89.

Pallansch MA. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30(E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec.,37(12):3928-33.

Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel Norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. *PLoS One.* 2010 Jul 16.,5(7):11599-605.

Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1.,200 Suppl 1:S9- S15.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006 Feb.,12(2):304-6.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003 May.,9(5):565-72.

Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, Taylor DN, Figueroa D, Gilman RH, Glass RI. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis.* 2004 Sep 15.,190(6):1088-92.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009 Jan.,44(1):1-8.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug.,14(8):1224-31.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012 Jan.,13(68):85-97.

Pedley S, Hundley F, Chrystie I, McCrae MA, Desselberger U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J Gen Virol.* 1984 Jul.,65 (Pt 7):1141-50.

Peng T, Li Y, Yang Y, Niu C, Morgan-Capner P, Archard LC, Zhang H., Perez, W., Decia, M., Guzzo, F, Montano, A. Gastroenteritis aguda en lactantes: Admisión en el Centro Hospitalario Pereira Rossell 2006-2007. *Arch. Pediatr. Urug.* 2011, vol.82, n.1, pp. 4-9. ISSN 0004-0584.

Perry JW, Taube S, Wobus CE. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus Res.* 2009 Jul.,13(1):125-9.

Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJ, Kapoor A, Barro N, O'Ryan M, Kapusinszky B,Wang C, Delwart E. Acute diarrhea in West-African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol.* 2012 Aug 1.

Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WE, Ushijima H. Viral gastroenteritis and genetic characterization of recombinant norovirus circulating in Eastern Russia. *Clin Lab.* 2006.,52(5-6):247-53.

Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004 Jul.,15(3):155-68.

Pina, S.; Jofre, J.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H.; Girones, R. (1998) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), Noviembre, p.4485-4488.

Povey RC, Wardley RC, Jessen H. Feline picornavirus infection: the in vivo carrier state. *Vet Rec.* 1973 Mar 3.,92(9):224-9.

Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. *Environ Health Perspect.* 2002 May.,110(5):537-42.

Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006 Jan 5.,344(1):9-16.

Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, Gaskell RM. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Vet Microbiol.* 2006 Oct 5.,117(1):14-8.

Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses.* 2011 Aug.,3(8):1460-84.

Rajal, V.B.; McSwain, B.S.; Thompson, D.E.; Leutenegger, C.M.; Kildare, B.J.; Wuertz, S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41(7), Abril, p.1411-1422.

Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell.* 1990 Oct 19.,63(2):353-62.

Reves RR, Hossain MM, Midthun K, Kapikian AZ, Naguib T, Zaki AM, DuPont HL. An observational study of naturally acquired immunity to rotaviral diarrhea in a cohort of 363 Egyptian children. Calculation of risk for second episodes using age-specific person-years of observation. *Am J Epidemiol.* 1989 Nov.,130(5):981-8.

Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2008.,192:117-58.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Mar.,103(2):201-6.

Ribeiro, L., Burjel, L., Thomas, C.E., Sosa, C. Electroferotipos e incidencia de rotavirus en la ciudad de Paysandú, Uruguay. *Acta bioquím. clín. latinoam.*,33(4):525-8, dic. 1999

Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DS, Miagostovich MP, Simões CM, Barardi CR. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J Appl Microbiol.* 2010 Dec.,109(6):1979-87.

Robbins FC, Enders JF, Weller TH, Florentino GL. Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis. *Am J Hyg.* 1951 Sep.,54(2):286-93.

Roberts LO, Al-Molawi N, Carter MJ, Kass GE. Apoptosis in cultured cells infected with feline calicivirus. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec.,1010:587-90.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002 Aug 1.,35(3):246-53.

Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, Wyatt RG, Parrott RH. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J Pediatr.* 1977 Aug.,91(2):188-93.

Rotbart HA, editor. *Human enterovirus infections.* Washington, DC: ASM Press., 1995. p. 113-33.

Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckenoghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M., Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006 Jan 5.,354(1):11-22.

Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 1990.,22(3):259-67.

Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus LA. Improved detection of human enteric viruses in foods by RTPCR. *J Virol Methods.* 2002 Feb.,100(1-2):57-69.

Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Sep.,20(9):849-53.

Sambrook J. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 3ra edición. ISBN 0-87969-577-3 2001.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005 Jan-Feb.,15(1):29-56.

Santosham M, Chandran A, Fitzwater S, Fischer-Walker C, Baqui AH, Black R. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *Lancet.* 2010 Jul 3.,376(9734):63-7.

Santosham M, Yolken RH, Quiroz E, Dillman L, Oro G, Reeves WC, Sack RB. Detection of rotavirus in respiratory secretions of children with pneumonia. *J Pediatr.* 1983 Oct.,103(4):583-5.

Schlindwein AD, Rigotto C, Simões CM, Barardi CR. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol.* 2010.,61(2):537-44.

Schnagl RD, Barton N, Patrikis M, Tizzard J, Erlich J, Morey F. Prevalence and genomic variation of Norwalk-like viruses in central Australia in 1995-1997. *Acta Virol.* 2000 Oct.,44(5):265-71.

Schnepf N, Deback C, Dehee A, Gault E, Parez N, Garbarg-Chenon A. Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol.* 2008 Apr.,82(7):3689-96.

Shen Q, Zhang W, Yang S, Chen Y, Shan T, Cui L, Hua X. Genomic organization and recombination analysis of human norovirus identified from China. *Mol Biol Rep.* 2012 Feb.,39(2):1275-81.

Shen S, Burke B, Desselberger U. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *J Virol.* 1994 Mar.,68(3):1682-8.

Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007 Sep.,81(18):9932-41.

- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009 Sep 1.,200(5):802-12.
- Simmonds MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, Gentsch JR, Smits SL, Rahman M, Schapendonk CM, van Leeuwen M, Faruque AS, Haagmans BL, Endtz HP, Osterhaus AD. Calicivirus from novel Recovirus genogroup in human diarrhea, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jul.,18(7):1192-5.
- Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* 2003 Jul.,94(1):1-10.
- Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol.* 2008 Feb.,82(4):1777-86.
- Stanway G., 2005. Family Picornaviridae, p. 757-778 Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A., Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Studdert MJ, Martin MC, Peterson JE. Viral diseases of the respiratory tract of cats: isolation and properties of viruses tentatively classified as picornaviruses. *Am J Vet Res.* 1970 Oct.,31(10):1723-32.
- Subekti DS, Tjaniadi P, Lesmana M, McArdle J, Iskandriati D, Budiarsa IN, Walujo P, Suparto IH, Winoto I, Campbell JR, Porter KR, Sajuthi D, Ansari AA, Oyofa BA. Experimental infection of *Macaca nemestrina* with a Toronto Norwalk-like virus of epidemic viral gastroenteritis. *J Med Virol.* 2002 Mar.,66(3):400-6.
- Symes SJ, Gunesekere IC, Marshall JA, Wright PJ. Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination. *Arch Virol.* 2007.,152(6):1075-86.
- Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol.* 2009 Feb.,44(2):161-3.
- Tambini G, Andrus JK, Marques E, Boshell J, Pallansch M, de Quadros CA, Kew O. Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community wastewater. *J Infect Dis.* 1993 Dec.,168(6):1510-4.
- 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.
- Tate, J.E.; Burton, A.H.; Boschi-Pinto, C.; Steele, A.D.; Duque, J.; Parashar, U.D.; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. (2012) 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(2), Febrero, p.136-141.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Jul 29.,356(1411):983-9.
- Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008 Aug.,80(8):1468-76.

Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol.* 2001 Jun.,39(6):2134-9.

Troy SB, Ferreyra-Reyes L, Huang C, Mahmud N, Lee YJ, Canizales-Quintero S, Flaster H, Báez-Saldaña R, García-García L, Maldonado Y. Use of a novel real-time PCR assay to detect oral polio vaccine shedding and reversion in stool and sewage samples after a Mexican national immunization day. *J. Clin. Microbiol.* 2011 May., 49(5):1777-83.

Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology.* 2008 Oct 25.,380(2):344-53.

Tu ET, Nguyen T, Lee P, Bull RA, Musto J, Hansman G, White PA, Rawlinson WD, McIver CJ. Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jul.,13(7):1128-30.

Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 2007 Apr.,41(7):1411-22.

Vardy J, Love AJ, Dignon N. Outbreak of acute gastroenteritis among emergency department staff. *Emerg Med J.* 2007 Oct.,24(10):699-702.

Vecchia A, Fleck J, Comerlato J, Kluge M, Bergamaschi B, Da Silva J, Da Luz R, Teixeira T, Garbinatto G, Oliveira D, Zanin J, Van der Sand S, Frazzon A, Franco A, Roehe P, Spilki F. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Braz J Biol.* 2012 May.,72(2):323-9.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996 Oct 3.,335(14):1022-8.

Velázquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Mar.,28(3 Suppl):S54-6.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Jul.,26(7):602-6.

Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010 Mar.,8(1):158-65.

Victoria M, Miagostovich MP, Ferreira MS, Vieira CB, Fioretti JM, Leite JP, Colina R, Cristina J. Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep.,9(5):927-32.

Victoria M, Rigotto C, Moresco V, de Abreu Corrêa A, Kolesnikovas C, Leite JP, Miagostovich MP, Barardi CR. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *J Appl Microbiol.* 2010 Jul.,109(1):231-8.

Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul.,38(7):2595-601.

Wang F, Han J, Yeung D, Semin D, Cheetham J. Effect of column temperature on enantioseparation of dihydropyrimidinones using alcohol solvated Chiralpak AS and AS-H columns. *J Sep Sci.* 2008 Apr.,31(6-7):1027-33.

Ward CD, Flanagan JB. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J Virol.* 1992 Jun.,66(6):3784-93.

Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol.* 1988 Feb.,62(2):558-62.

Ward JM, Wobus CE, Thackray LB, Erexson CR, Faucette LJ, Belliot G, Barron EL, Sosnovtsev SV, Green KY. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol.* 2006.,34(6):708-15.

Ward RL, Bernstein DI. Lack of correlation between serum rotavirus antibody titers and protection following vaccination with reassortant RRV vaccines. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Vaccine.* 1995 Sep.,13(13):1226-32.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis.* 1996 Sep.,174 Suppl 1:S51-8.

Waters A, Coughlan S, Hall WW. Characterisation of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. *Virology.* 2007 Jun 20.,363(1):11-4.

Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, Schneider T, Zidek W, van der Giet M. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Mar.,24(3):1051-3.

WHO 2011: www.who.int/water_sanitation.../index.html Guidelines for drinking-water quality - 4th edition.

WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012 Feb.,12(2):136-41.

Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI. Are noroviruses emerging? *Emerg Infect Dis.* 2005 May.,11(5):735-7.

Williams CH, Kajander T, Hyypiä T, Jackson T, Sheppard D, Stanway G. Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. *J Virol.* 2004 Jul.,78(13):6967-73.

Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Mar.,76(5):1388-94.

Wolf S, Reetz J, Otto P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol.* 2011 Jul.,156(7):1143-50.

Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, Scholes P, Savill M, Greening GE. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol.* 2009 Jan 1.,133(1-2):184-9.

Woode GN, Bridger JC. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol.* 1978 Nov.,11(4):441-52.

Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol.* 1999 Oct.,80 (Pt 10):2535-43.

Yang K, LeJeune J, Alsdorf D, Lu B, Shum CK, Liang S. Global distribution of outbreaks of water-associated infectious diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012.,6(2):e1483.

Young DC, Sharp DG. Partial reactivation of chlorine-treated echovirus. *Appl Environ Microbiol.* 1979 Apr.,37(4):766-73.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J. Virol. Methods.* 2008 Nov.,153(2):238-40.

Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu Q, Liang XR, Ng MH. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol.* 1991 May.,34(1):29-37.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006 Mar 15.,346(2):312-23.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, Azimi P, Jiang X, Matson DO. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol.* 2005 Apr.,5(3):281-90.