

# Detección y cuantificación de Adenovirus Humano en muestras de aguas ambientales

Tesina de grado  
Licenciatura en Bioquímica

Romina Bolón

Tutora: Mabel Berois

Montevideo, 2016

# ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| Resumen.....  | 4  |
| Abreviaturas.....   | 5  |
| 1    Introducción.....  | 6  |
| 1.1    Impactos de la calidad del agua en la salud.....             | 6  |
| 1.1.1    Microorganismos en el agua.....                            | 6  |
| 1.1.2    Virus entéricos en el ambiente.....                        | 8  |
| 1.2    Antecedentes en la región sobre virus entéricos en aguas.... | 10 |
| 1.3    Antecedentes de virus entéricos en Uruguay .....             | 12 |
| 1.4    Adenovirus... ..   | 16 |
| 1.4.1    Introducción al modelo viral.....                          | 16 |
| 1.4.2    Estructura, genoma y proteínas virales... ..               | 20 |
| 1.4.3    Enfermedad, transmisión y epidemiología .....              | 24 |
| 1.5    Vacunas... ..  | 28 |
| 1.6    Detección en el laboratorio.....                             | 29 |
| <br>  |    |
| 2    Objetivos.....   | 31 |
| 2.1    Objetivos generales.....                                     | 31 |
| 2.2    Objetivos específicos .....                                  | 31 |
| 3    Materiales y métodos .....                                     | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Ambiente de estudio y muestreo .....                                 | 32 |
| 3.2 Concentración de las partículas virales .....                        | 35 |
| 3.3 Extracción del ADN viral de las muestras .....                       | 36 |
| 3.4 Obtención de un control de HAdV .....                                | 36 |
| 3.4.1 Extracción de ADN de HAdV a partir de los cultivos celulares ..... | 38 |
| 3.4.2 Puesta a punto PCR a tiempo final para HAdV .....                  | 39 |
| 3.4.3 Clonaje de una secuencia de HAdV .....                             | 39 |
| 3.5 Cuantificación de HAdV por PCR en tiempo real .....                  | 44 |
| <br>   |    |
| 4 Resultados .....   | 46 |
| 4.1 Puesta a punto de la PCR en tiempo real para HAdV .....              | 46 |
| 4.2 Cuantificación de HAdV en muestras de agua de Barros Blancos .....   | 55 |
| <br>   |    |
| 5 Discusión .....  | 62 |
| 6 Conclusión y perspectivas .....  | 70 |
| 7 Bibliografía .....   | 72 |
| 8 Agradecimientos .....  | 86 |

## RESUMEN

---

El agua de baja calidad y las condiciones insalubres son responsables del 90% de las muertes por diarrea en el mundo entero. En países en desarrollo cerca del 50 % de la población tiene infecciones o enfermedades relacionadas a un suministro inadecuado en cuanto a la calidad del agua y al saneamiento. Los Adenovirus Humanos (HAdV) causan infecciones gastrointestinales y son transmitidos principalmente por la vía fecal- oral siendo uno de los virus entéricos más detectados en aguas. Esta alta frecuencia puede ser explicada por su gran resistencia a condiciones físicas y químicas presentes en el ambiente. Los serotipos de HAdV 40 y 41 son la segunda causa de gastroenteritis en niños siendo estos serotipos de importancia a nivel de salud humana y se encuentran frecuentemente en aguas contaminadas.

En el presente trabajo se analizaron muestras de cañadas, pozos, cunetas y tajamares pertenecientes a cuatro microcuencas de la ciudad de Barros Blancos, departamento de Canelones. Se hizo a través de PCR en tiempo real la cual fue puesta a punto en este mismo trabajo para la detección y cuantificación de Adenovirus Humano.

Las muestras fueron tomadas a partir de 16 cuerpos de agua de la ciudad de Barros Blancos durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2011 hallándose un total de 22 que demostraron tener carga viral detectable para HAdV siendo esto un 45,8%. Cabe destacar que es el primer trabajo que realiza la detección y cuantificación de Adenovirus en diversos cuerpos de agua de una ciudad del departamento de Canelones.

# ABREVIATURAS

---

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico           |
| ARN               | Ácido ribonucleico                  |
| ITR               | Repeticiones terminales invertidas  |
| dNTP              | Desoxinucleótido trifosfato         |
| nt                | Nucleótidos                         |
| uL                | Microlitros                         |
| mM                | Milimolar                           |
| ng                | Nanogramo                           |
| µg                | Microgramo                          |
| mg                | Miligramo                           |
| µM                | Micromolar                          |
| mL                | Mililitro                           |
| pb                | Pares de bases                      |
| kb                | Kilobases                           |
| Taq               | Enzima Taq polimerasa               |
| <i>E. Coli</i>    | <i>Escherichia Coli</i>             |
| MPM               | Marcador de peso molecular          |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa |
| TAE               | Buffer Tris, acetato y EDTA         |
| rpm               | Revoluciones por minuto             |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloruro de magnesio                 |
| HAdV              | Adenovirus Humano                   |

# 1.1 IMPACTOS DE LA CALIDAD DEL AGUA EN LA SALUD

---

## 1.1.1 Microorganismos en el agua

Se espera que la población mundial exceda los 9000 millones de habitantes para el año 2050. En cuanto a la población urbana se estima un incremento cercano al doble, pasando de 3400 a 6400 millones para ese mismo año, que será acompañado de un aumento aún más vertiginoso de habitantes en asentamientos o barrios pobres. En una población en continuo crecimiento es indispensable y de vital importancia un buen manejo del agua [Naciones Unidas 2010].

La interacción entre el agua y la salud humana es algo compleja. La salud puede ser afectada por la ingestión de agua contaminada tanto como por comida contaminada por esa agua e incluso por el uso de ésta para higiene personal y recreación.

El agua de baja calidad sumada a condiciones insalubres es responsable del 90% de las muertes por diarrea en el mundo entero. En países en desarrollo cerca del 50% de la población tiene infecciones o enfermedades relacionadas al inadecuado suministro de agua y a la baja calidad sanitaria de la misma. No sorprende que a nivel global, las gastroenteritis son la segunda causa de muertes de niños menores de 5 años (1.2 millones de muertes en el 2012). Los patógenos que causan las enfermedades diarreicas son de origen fecal y son

transmitidos por comida o bebida contaminada así como de forma directa persona-persona [Bartram 2005, Gall 2015]

Los microorganismos patógenos asociados al agua constituyen una gran problemática teniendo en consideración que los mismos pueden ser bacterias, parásitos y virus implicados en numerosas enfermedades que actualmente aquejan a la población mundial.

Los patógenos humanos pueden entrar al ecosistema por descargas de plantas de tratamiento las cuales reducen efectivamente la carga bacteriana indicadora pero no elimina todos los patógenos humanos. Esto sucede porque algunos microorganismos son más resistentes a la desinfección que la bacteria usada como indicadora y que pueden causar infecciones en bajas dosis [Bonilla 2015]. Se ha visto que existe un consenso mundial con respecto a la ausencia de correlación entre la contaminación bacteriana y viral [Ike 2006, Stephen 2007].

Con respecto al agua utilizada para el consumo, su contaminación por virus, bacterias parásitos pueden ocurrir ya sea en la propia fuente de agua o durante transporte del agua desde la fuente hasta el consumidor [Naciones Unidas 2010].

### 1.1.2 Virus entéricos en el ambiente

Los virus entéricos son introducidos en diferentes ambientes acuáticos mediante el vertido de aguas residuales, la fuga de sistemas sépticos, escorrentía urbana y agrícola así como también a través del vertido de aguas residuales de buques (Figura 1) [Wyer 2012]. Diferencias en los mecanismos de transporte de los virus transmitidos por el agua determinan el nivel de supervivencia y ocurrencia



**Figura 1.** Ilustración de las diferentes vías de ingreso de los virus entéricos al ambiente acuático. Extraída de Corsi et al., 2015 [Corsi 2015]

Dentro de los virus que son transmitidos por el agua .se incluyen los Adenovirus, Astrovirus, virus de la Hepatitis A y E, Rotavirus, Norovirus y otros Calicivirus, y los enterovirus como ser Coxsackievirus y Poliovirus. También los virus son excretados de la orina como Polioma y Citomegalovirus. Otros como Influenza y Coronavirus han sido sugeridos como que podrían ser transmitidos por agua pero la evidencia es inconclusa [Gall 2015].

La mayoría de los virus nombrados son asociados a diarrea y otros síntomas también como dolores abdominales, vómitos y fiebre. Algunos pueden causar enfermedades más severas incluyendo entre ellas encefalitis, meningitis, miocarditis cáncer y hepatitis. La hepatitis E puede también causar mortalidad en mujeres embarazadas con una tasa del 25% [Gall 2015].

Los virus entéricos pueden sobrevivir en el ambiente por extensos períodos de tiempo a bajas temperaturas y a distintos pH. Se han reportado casos de virus que han permanecido infectivos tras 130 días en agua de mar, 120 días en agua dulce y aguas residuales, y más de 100 días en el suelo de 20 a 30 °C [Fong 2005].

## 1.2 ANTECEDENTES EN LA REGIÓN SOBRE ADENOVIRUS Y OTROS VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS

---

En cuanto a la detección de virus entéricos en aguas existen diversos trabajos reportados en la región que siguen en desarrollo actualmente. La virología ambiental es una rama que se inició mundialmente hace más de 70 años [Metcalf 1995] y en la región comenzó a estudiarse alrededor de los años 90. Más precisamente en el año 1993 aparece como primer antecedente en la región un trabajo en muestras de desagües de hogares y de arroyos, donde Rotavirus es detectado en un 20,6% y 34,5%, respectivamente, mediante metodologías basadas en inmunofluorescencia indirecta e inmunoenzimáticas [Menhert 1993]

En el año 2008 se publicó un trabajo desarrollado en la ciudad de Manaus en donde se estudiaron aguas superficiales asociadas con la recreación de los habitantes aledaños a estas aguas. En las muestras fueron detectados Rotavirus, así como también Adenovirus humano (HAdV) y Norovirus (NoV) en menores frecuencias, y lo interesante es que en la mayoría de estas aguas la contaminación fecal no estaba demostrada por indicadores bacterianos como los coliformes totales, que es la forma más común de monitoreo [Miagostovich 2008].

También fue publicado en 2012 un trabajo en el Río Arenales en la provincia de Salta, Argentina. Éste tuvo como objetivo establecer una base de datos para caracterizar la calidad del agua e identificar problemas en el tiempo, con el fin

de establecer una estrategia de monitoreo en el futuro. Los puntos de monitoreo fueron todos positivos menos uno, al menos a uno de los virus analizados. El 45% de las muestras fueron positivas para HAdV, el 9% para NoV y 8% para Enterovirus. HAdV fue encontrado en altas concentraciones en varios puntos de monitoreo [Poma 2012].

En otro estudio se determinaron las ocurrencias del Rotavirus del grupo A (RVA), NoV y HAdV en las aguas superficiales de la Laguna Rodrigo Freitas en Rio de Janeiro, Brasil. Se obtuvieron muestras de la laguna y de otros sistemas relacionados como río o playa y estas fueron concentradas por un método de adsorción-elución con una membrana cargada negativamente. RVA fue el más detectado (24.3%), seguido por NoV (18.8%) y HAdV (16.7%). Al medir los parámetros fisicoquímicos se observaron relaciones entre la turbidez y RVA y entre el pH y NoV [Baur 2012]. Los resultados de dicho estudio mediante PCR en tiempo real mostraron un rango de carga viral de  $3,0 \times 10^1$ - $5,5 \times 10^4$  para RVA,  $1,4$ - $3,2 \times 10^2$  para NoV y  $1,2 \times 10^1$ - $1,2 \times 10^3$  para HAdV.

En el año 2014 se publicó un estudio de una región limítrofe entre la Selva Atlántica y una zona urbana de Río de Janeiro, Brasil donde 31 de 108 muestras (29%) resultaron positivas para al menos uno de los virus estudiados con una carga viral de hasta 103 copias genómicas por mililitro (cg/ml). Siendo estas en total 37 detecciones, RVA (n=17), NoV Genogrupo II (n=10) NoV Genogrupo I (n = 3), y HAdV (n = 7) [Miagostovich 2014].

## 1.3 ANTECEDENTES EN URUGUAY DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS

---

En nuestro país los estudios de los virus en el ambiente se iniciaron en años más recientes, a diferencia de lo que ocurrió en los países vecinos.

En el año 2012 se realizó un estudio al sur de nuestro país, más específicamente en la zona este de Montevideo en el cual se analizaron aguas de los vertederos de aguas pluviales, el emisor subacuático de aguas residuales y el arroyo Carrasco en un total de 30 muestras. La detección viral se llevó a cabo mediante PCR a tiempo final y se llegó a resultados interesantes. Por un lado se detectó Norovirus Genogrupo II en el 30% de las muestras y Genogrupo I en un 33%. Mediante PCR en tiempo real se detectó Norovirus Genogrupo II en un 33% y Genogrupo I en un 13.3% dejando en evidencia así un incremento en la sensibilidad de una técnica con respecto a la otra [Alberti 2012].

En otro estudio realizado entre los años 2011 y 2012, se monitoreó la contaminación viral de los grupos RVA, NoV y Astrovirus Humanos (HAstV) de aguas residuales descargadas directamente en el río Uruguay. Se realizaron muestreos durante un año en cuatro ciudades principales: Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos. Se observó una amplia diseminación de virus entéricos en las muestras analizadas con un 80% de positividad, siendo NoV en un 51% el más detectado seguido de RVA con una frecuencia del 49% y HAstV con un 45% [Victoria 2014].

Por otra parte, entre los años 2011 y 2012 se estudió la presencia de tres virus entéricos en aguas recreacionales de cuatro microcuencas del área metropolitana, en la ciudad de Barros Blancos, Canelones. En la zona elegida

para este trabajo, generalmente habitan familias de bajos recursos las cuales no cuentan con un sistema de saneamiento y la alternativa más común es el uso de pozos negros. Sucede que muchas veces éstos colapsan o quedan inutilizables y en muchos casos se recurre a la evacuación directa en el ambiente a través de cunetas o cañadas presentes en la zona. Estas prácticas habituales en la población representan un alto riesgo para las personas que las realizan así como para los que viven o transitan en la cercanía de los focos de contaminación. Como resultado a dicho trabajo se desprende que en 50 (90.1%) de las muestras analizadas se detectó al menos un tipo de virus con alguna de las metodologías utilizadas, Rotavirus fue detectado en 37 (67%) muestras, Norovirus lo fue en 28 (50.1%) y Picobirnavirus en 5 (9%) por PCR a tiempo final. En cuanto a los análisis de las muestras por PCR en tiempo real, lo que respecta a Norovirus, el genogrupo I fue detectado en menor medida que el genogrupo II, mientras que el primero se detectó en 14 (25.5%) muestras con un rango de concentración que oscila entre 10 a 45.4 cg/mL y un promedio de

23.5 cg/mL, el segundo se detectó en 28 (50.1%) muestras con un rango de concentración que oscila entre 10 y 1197.4 cg/mL. Por su parte de los datos de detección y cuantificación de Rotavirus se desprende que se detectaron en 27 (49.1%) muestras con un rango de concentración que oscila entre 2.5 a 494235.5 cg/mL [Gillman 2016].

También en el año 2012 en la cañada del Arroyo Malvín se logró detectar Norovirus genogrupo II por RT-PCR anidada [Bolón 2012]. Más recientemente en el año 2014 se realizó un estudio en muestras de agua en esa misma cañada donde se detectó HAdV en 5 de 9 muestras tomadas de sitios y en condiciones ambientales diferentes. De los resultados obtenidos mediante PCR

en tiempo real se sugiere una cierta asociación entre la carga viral y el nivel sanitario y calidad de la vivienda alrededor del sitio muestreado [Bolón 2013].

Este estudio fue el primero en reportar HAdV a partir de muestras de agua ambiental en Uruguay. Sin embargo la circulación y prevalencia de HAdV en la población ya había sido reportada asociada a afecciones respiratorias.

En el año 2008 se realizó un estudio epidemiológico de HAdV en Montevideo, donde se detectó el virus en el 8.77% de los casos estudiados. Este porcentaje fue acorde a lo esperado donde la prevalencia para HAdV es del 5 al 10% del total de infecciones respiratorias en niños [Hanusz, 2011]. Anterior a este trabajo, en muestras obtenidas entre 1994 y 1998, se detectaron y aislaron adenovirus a partir de 23 muestras de aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones agudas del tracto respiratorio bajo [Frabasile 2005]. Si bien, existen antecedentes de HAdV asociado a enfermedades respiratorias no hay suficiente información sobre la circulación del Adenovirus de tipo entérico,. Una manera muy eficaz de evaluar su presencia y frecuencia es analizando las aguas cercanas a una población vulnerable y de riesgo.

Los antecedentes antes descriptos evidencian la presencia de virus entéricos ampliamente distribuidos en aguas del territorio uruguayo y en particular la detección de HAdV entéricos en la cañada del Arroyo Malvín. Esto, lleva a plantear la hipótesis de que HAdV se encuentre en aguas ambientales de un contexto de similares características como es Barros Blancos, donde ya se han detectado otros tres virus entéricos.

Sumado a esto, la elección de HAdV como modelo viral para este trabajo refiere también a su rol como posible candidato como indicador viral de contaminación fecal humana en aguas. La utilidad de HAdV como indicador

viral de la calidad del agua se atribuye a varias características del mismo. Comenzando por su estabilidad, persistencia, y amplia difusión en una gama de matrices de agua, tales como aguas residuales, ríos y agua potable. Es un virus de detección continua en las aguas residuales, es decir, no tiene una marcada estacionalidad, aunque la aparición estacional se ha indicado en algunos casos. Su alta resistencia a los rayos ultravioleta (UV) es otra característica que lo hace un buen candidato, y que además ha demostrado tener mayor abundancia con relación a otros virus entéricos. Otra ventaja en este sentido es la gran disponibilidad de ensayos de cultivo y herramientas de detección molecular de su genoma ADN. Otra característica que cabe resaltar es que HAdV tiene una alta especificidad de hospedero (contaminación fecal específicamente humana) y a su vez como es característico de los virus no replica fuera del huésped [Rames 2016]

Por todas las razones detalladas es de gran interés seguir investigando las aguas colectadas en la ciudad de Barros Blancos relevando datos de HAdV, que nos permitan analizar, en la manera de lo posible, su potencial como indicador de contaminación fecal en estas aguas.

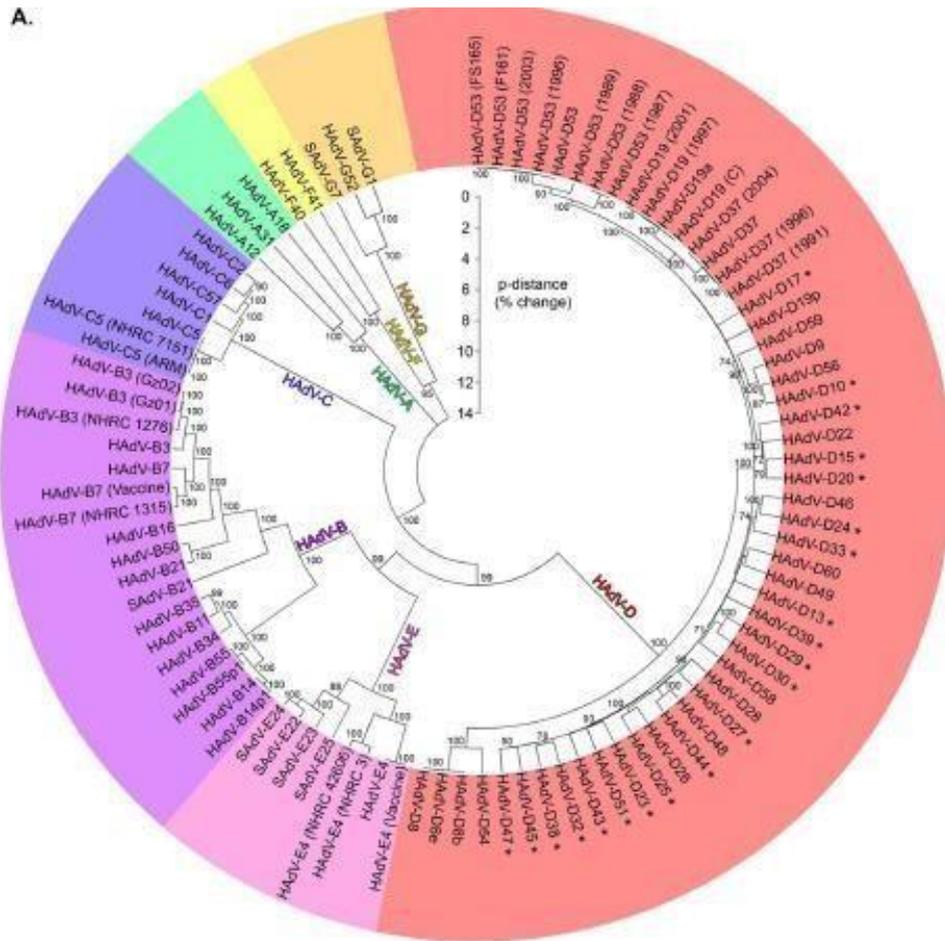
## 1.4 ADENOVIRUS

---

### 1.4.1 Introducción al modelo viral

Adenovirus fue primariamente aislado de humanos e identificado como el agente causante de una enfermedad respiratoria febril entre reclutas militares en los años 50 durante el siglo XX [Hilleman 1954, Rowe 1953]. Posteriormente, en los años 60, Adenovirus fue identificado como el agente causal de un brote que infectó al 80% de los reclutas requiriéndose la hospitalización de un 20% de ellos [Gray 2012]. El nombre de estos virus se debe al sitio donde fueron encontrados, el tejido adenoide [Knipe 2007].

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, y se agrupan en cinco géneros diferentes: *Mastadenovirus* (que infectan humanos y otros mamíferos), *Aviadenovirus* (aislados de aves), *Atadenovirus* (aislados de reptiles, aves, marsupiales y mamíferos), *Siadenovirus* (aislados de reptiles y aves), e *Ichtadenovirus* (aislados de peces) [Madisch 2005]. Dentro del género *Mastadenovirus*, se encuentran los tipos de interés en esta tesis. Éstos corresponden a los *Mastadenovirus* humanos A-G (Figura 2).



**Figura 2** Diversidad de Adenovirus Humano. La imagen muestra el análisis filogenético del genoma de HAdV presentado con un bootstrap de 500 réplicas y construido por neighbor-joining con secuencias completas de todos los tipos de HAdV conocidos. Extraído de Robinson [Robinson 2013].

Estos virus comprenden 52 tipos diferentes clasificados serológicamente, junto a otros 4 genotipos recientemente aceptados como nuevos tipos pero no estudiados aun serológicamente. Se clasifican también en siete especies diferentes (A-G) por propiedades hemaglutinantes (Tabla 1) [Gray 2012].

| Especies | Tipos (serotipos/genotipos)  |
|----------|--|
| A        | 12,18,31, <b>61</b>  |
| B        | 3,7,11,14,16,21,34,35,50, <b>55,66</b>                                   |
| C        | 1,2,5,6 <b>57</b>  |
| D        | 8-10,13,15,17,19,22-30,32,33,36-39,42-49, <b>51,53,54,56,58-60,63-66</b> |
| E        | 4  |
| F        | 40,41  |
| G        | <b>52</b>  |

**Tabla 1. Espectro de adenovirus humanos publicados hasta el momento.** Las especies de HAdV (A-G) y tipos del 1 al 67 son los indicados en la tabla. Desde el 1 al 51 fueron identificados por métodos serológicos, todos los tipos indicados en *itálica y negrita* (tipos 52 al 67) fueron identificados por *secuenciación genómica y análisis computacional*. Extraído de Lion et al 2014. [Lion, 2014]

Todos los adenovirus contienen tres antígenos útiles para el diagnóstico, los cuales son parte de las 3 proteínas de cápside: hexón, pentón y fibra. El principal epítoto ( $\epsilon$ ), consiste de un bucle L1 y otro L2 en la proteína del hexón, los cuales reaccionan con antisuero en ensayos de neutralización [Madisch 2005]. La región protuberante de la fibra del pentón, la cual incluye el determinante tipo-específico tiene propiedades hemaglutinantes las cuales son usadas para los test de inhibición de la hemaglutinación. Hoy en día el método más utilizado es la PCR por ser un ensayo de diagnóstico rápido para infecciones por Adenovirus. También la PCR se usa para el genotipado de HAdV. Incluyendo las PCR tipo específicas y protocolos de multiplex usando cebadores específicos [Madisch 2006]. El amplio uso del sistema de

genotipado fue propuesto y modificado por Li et al. [Li 1996,1986]. La cepa prototipo de Adenovirus es designada “p”, se designan otros tipos de genoma dentro del serotipo de la a hasta la k. Los tipos de genoma podrían ser distinguidos por patrones de restricción con enzimas específicas (ej.: HAdV-7p, HAdV-7p1, etc.) [Li 1996, Erdman 2002]. Usando este sistema al menos fueron identificados 27 tipos de genomas de HAdV-7 [Gerber 2001]. Este sistema ha sido usado para correlacionar tipos genómicos con la distribución geográfica y potencial patogénico.

Las propiedades oncogénicas y la homología del ADN son también usadas para definir subgéneros (especies). Precisamente el genotipado de HAdV es esencial para estudios epidemiológicos y estudios de control de calidad de diagnósticos. El mayor conocimiento sobre diferencias en virulencia y tropismo de órganos de los distintos serotipos de adenovirus ha incrementado el valor de la clasificación de HAdV.

Éste trabajo se enfoca en la detección de los tipos de HAdV 40 y 41 ya que se han reportado con mucha mayor frecuencia que los demás en aguas. Esto se debe a la estrecha relación de estos tipos de HAdV con la sintomatología de la gastroenteritis, y el contacto que se da entre las heces o directamente el contacto del individuo infectado con el agua.

En el mundo, las especies F de HAdV (serotipos 40 y 41) son endémicos y son la segunda causa de gastroenteritis en niños, siendo estos serotipos de importancia a nivel de salud humana.

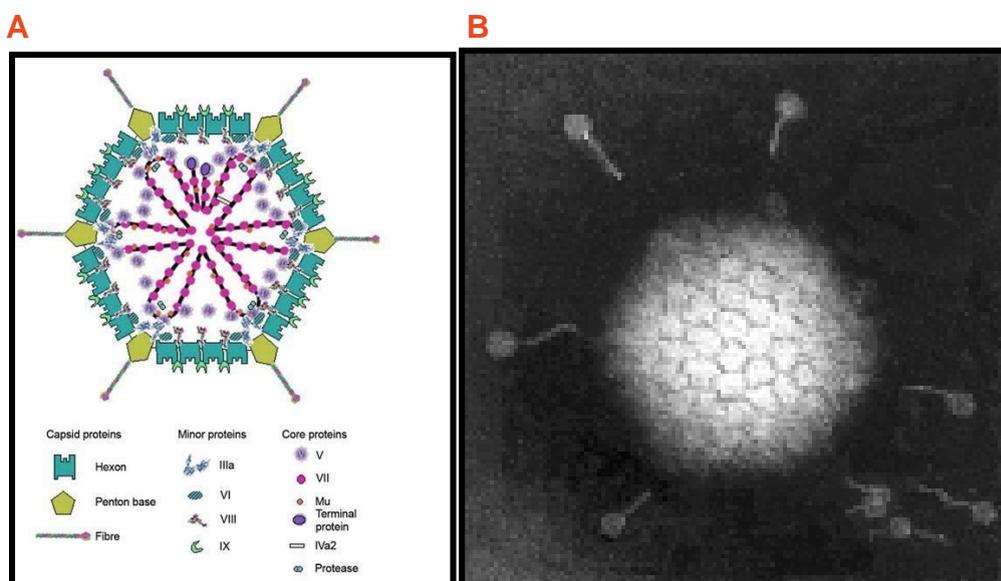
### **1.4.2 Estructura, genoma y proteínas virales**

En cuanto a su estructura Adenovirus se caracteriza por ser un virus no envuelto de estructura icosaédrica con un diámetro de aproximadamente 70-90 nm. Cada partícula contiene una única molécula de ADN lineal doble hebra con una longitud de aproximadamente 36 Kpb y conteniendo unos 40 genes [Knipe 2007].

Contiene una proteína de cápside la cual es formada por 252 capsómeros incluyendo en estos 240 hexones y 12 pentones. Cada pentón consiste en la base y la fibra con una protuberancia terminal que es la que interactúa con los receptores celulares. Los anticuerpos con reactividad cruzada van directo contra los hexones, los cuales contienen el componente antigénico genérico común de todos los adenovirus que afectan mamíferos. Los hexones también contienen sitios serotipo específicos y algunos determinantes antigénicos especie específico que son responsables de la hemaglutinación *in vitro* [Echavarria 2008]

La cápside de Adenovirus (Figura 3) está compuesta de 8 polipéptidos, llamados en orden decreciente de tamaño. El hexón es un trímero de la proteína II ensamblado en una estructura tipo hoja llamada "grupo de nueve", el cual forma las 20 caras del icosaedro. El agrupamiento de la proteína III en grupos de cinco (conocidos como pentones) en los vértices del icosaedro de donde se extienden trímeros de la proteína IV, conocida como fibra que contiene tres dominios: un dominio N-terminal que se une a la base del pentón, un eje central flexible muy importante para la infección y un dominio C-terminal

globular el cual interacciona con el receptor de la célula huésped [Wu 2003]. Estos tres polipéptidos son las principales proteínas de cápside. Esta estructura general es sostenida con cinco proteínas menores de cápside (IIIa, IVa2, VI, VIII, y IX). Con la cápside viral, el ADN se asocia con tres proteínas básicas, VII, V y Mu, las cuales funcionan para neutralizar la carga del ADN permitiendo el empaquetamiento del virión de forma muy compacta. La proteína VII es similar a las protaminas celulares, y es la principal responsable del condensamiento del ADN viral. Una cubierta de proteína V es postulada para cubrir el complejo proteína VII-ADN. Se cree que el clivaje de pre Mu con una proteasa codificada en el virus puede funcionar para relajar la estructura de nucleoproteína del ADN viral antes de su entrada al núcleo [Wong 2013].



**Figura 3 Estructura de Adenovirus.** (a) *Diagrama esquemático de Adenovirus Humano (HAdV) el cual muestra las trece proteínas estructurales de virion [Coughlan 2010]*(b) *Estructura de Adenovirus observada mediante microscopía electrónica con tinción negativa. La cápside revela las típicas 20 caras de forma de triángulo equilátero. Los 252 capsómeros, 12 pentones y 242 hexones arreglados en un patrón de simetría ( $\times 400,000$ )  $T=25$ . Imagen extraída del sitio web de Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town.*

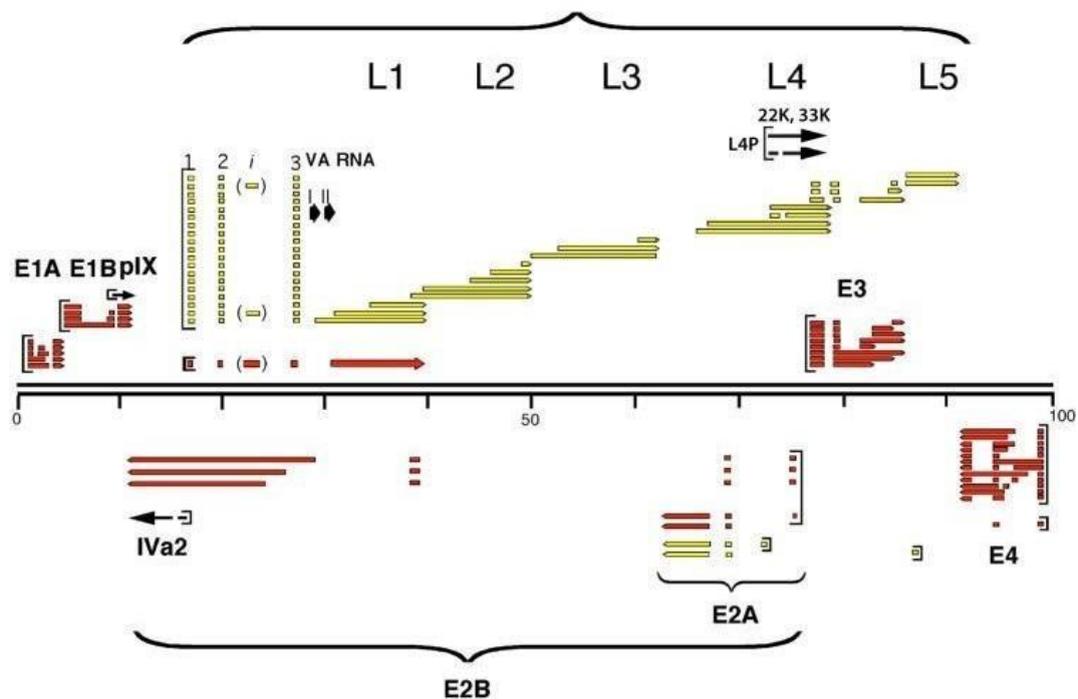


El genoma de HAdV 2 fue el primero en ser completamente secuenciado y éste tanto como el de HAdV5 tiene un largo de aproximadamente 36Kpb y codifica 40 proteínas como se dijo anteriormente [Flint 1999].

Las regiones codificantes del genoma (Figura 4) son designadas tempranas o tardías (*denominadas E o L por su denominación en inglés Early or Late*) dependiendo el momento en que las proteínas son expresadas [Davison 2003]. Las regiones tempranas son llamadas E1, E1B, E2, E3 y E4 las cuales son las primeras regiones transcritas y codifican proteínas involucradas en la activación de la transcripción de otras regiones del genoma viral. A su vez causan una alteración del ambiente celular para promover la producción de viriones. Las proteínas E1A inducen la actividad mitogénica en la célula huésped para estimular la expresión de otros genes virales [Flint 1999]. Las proteínas E2 intervienen en la replicación viral mientras que E3 y E4 alteran la respuesta inmune y la señalización celular respectivamente [Horwitz 2004, Weitzman 2005]. La activación del promotor tardío ,seguido del comienzo de la síntesis de ADN viral permite la expresión de los genes tardíos codificando en comienzo a las proteínas estructurales. Las regiones tardías (L1-L5) son transcritas desde un transcripto que sufre *splicing* alternativo.

Hay también cuatro productos intermedios/finales de la infección incluyendo la proteína estructural IX y IVa2 la cual ayuda al empaquetamiento del ADN viral en los viriones inmaduros [Christensen 2008]. Existen además dos productos de ARN no codificantes, denominados ARN VA (*de su denominación en inglés Viral Associated*) I y II que inhiben la activación de la respuesta por el

interferón, impiden el procesamiento de micro ARN celulares, y pueden influir en la expresión de genes del hospedero [O'Malley 1986, Aparicio 2006]. Localizados en el final del genoma hay repetidos terminales de 100pb llamados ITRs los cuales actúan como origen de replicación con la secuencia de empaquetamiento de 200 pb posicionada cerca del ITR de la izquierda. Este arreglo que tiene el genoma es común a la mayoría de las especies de Adenovirus (Ad) [Davison 2003].



**Figura 4** Representación esquemática del genoma de HAdV 5 y los transcritos virales que expresa. Los transcritos tempranos se muestran en rojo y los tardíos son marcados en amarillo. Los genes intermedios son indicados con las flechas negras. Extraído de Biasiotto 2015 [Biasiotto 2015].

### **1.4.3 Enfermedad, transmisión y epidemiología.**

Los Adenovirus son virus que causan principalmente infecciones respiratorias, conjuntivitis, infecciones genitourinarias y gastroenteritis [Knipe 2013, Lin 2004, Dalmas 2003]. Éstos tienen una gran capacidad infectiva siendo posible contraer la enfermedad con tan solo cinco partículas virales [Saha 2014]. A nivel humano los principales afectados por éste virus son los niños menores de dos años, provocando infecciones agudas del tracto respiratorio bajo. En el caso de gastroenteritis por los HAdV 40 y 41 la diarrea se caracteriza por ser acuosa, usualmente asociada a fiebre y puede durar de 1 a 2 semanas [Gray 2012]. Pueden ocurrir fatalidades como resultado de deshidratación en niños pequeños [Filho 2007, Madisch 2006]. Las epidemias por HAdV 40 y 41 han sido reportadas en escuelas y hospitales [Goncalvez 2010, Mattner 2008]. En pacientes inmunocomprometidos (receptores de órganos principalmente) una diseminación fatal del virus puede ocurrir, aunque de todas formas no es lo más común [Slatter 2005, Mattner 2008].

La transmisión se realiza a través del contacto directo de persona- persona con aerosoles, a través de, fómites o secreciones respiratorias, a través de las manos, vía fecal-oral, o agua contaminada. También se ha visto como agente de infecciones nosocomiales [Algorta 2008]. No hay reservorio animal para éste virus y pocos modelos animales pueden reproducir la enfermedad humana [Echavarría 2008]. Con respecto a la estacionalidad de estos virus, adenovirus se ha aislado a lo largo de todo el año siguiendo un patrón no estacional

[Rodríguez 2013], sin embargo en otros estudios se han visto picos en primavera y verano [Villa 2009, Salas-Chavez 2005].

Adenovirus es encontrado frecuentemente en el suero de pacientes inmunocomprometidos y estos virus pueden persistir de forma latente luego de la infección. En estos casos la reactivación del virus puede darse de forma asintomática o causando enfermedad; algunos ejemplos son faringitis, conjuntivitis, neumonía, cistitis hemorrágica, colitis, hepatitis o encefalitis. Una creciente incidencia de infecciones de Adenovirus ha sido observada en pacientes trasplantados de médula con una mortalidad en un rango tan alto como de un 25% [Echavarría 2001] (Tabla 2).

| Síndromes clínicos        | Especies de HAdV | Tipos conocidos     | Población de riesgo   |
|---------------------------|------------------|---------------------|---|
| Respiratorio endémico     | B,C              | 1,2,3,5,6,7         | Niños e infantes  |
| Respiratorio epidémico    | B,C,D            | 5,7,55,56           | Niños   |
| Respiratoria aguda        | B,E              | 3,4,7,14,21         | Reclutas militares  |
| Fiebre faringoconjuntival | B,C,E            | 1,3,4,7,14          | Escolares y adolescentes  |
| Queratoconjuntivitis      | B,D              | 8,11,19,37,53,54,56 | Todas las edades  |
| Cistitis hemorrágica      | B                | 11,21,34,35         | Pacientes inmunocomprometidos y niños                               |
| Gastroenteritis           | F,G              | 40,41,52            | Niños, pacientes inmunocomprometidos                                |
| Otros síndromes           | A,B,C,D,E        | 2,4,7,12,19,32,37   | Niños, adultos  |
| Inmunodeficiencia         | B,D              | 34,35,43-49         | Pacientes trasplantados, con inmunodeficiencia y pacientes con SIDA |

**Tabla 2.** Síndromes clínicos asociados con infecciones por Adenovirus en el hombre. Extraída de Gray 2012 [Gray 2012]

HAdV suele ser uno de los virus entéricos más detectado en aguas y esta alta frecuencia puede ser explicada por su gran resistencia a condiciones físicas y químicas presentes en el ambiente, y que varios tipos de HAdV son excretados en las heces [Qui 2009, Sauerbrei 2009, De Abreu 2012]. Debido a estas características, HAdV ha sido descrito junto con JC poliomavirus como posible indicador de contaminación viral humana [Bofill-Mas 2006, Wyer 2012]. Un indicador viral de este tipo tendría un valor predictivo de efectos en los individuos que usan esta agua para propósitos recreativos [Wyer 2012].

Los Adenovirus son responsables del 3% de las infecciones en la población en general y del 7% de las fiebres, mientras que en los niños representa el 5% de las infecciones y el 10% de las fiebres [Fox 1969]. Se han reportado niveles de alta mortalidad, vinculada fundamentalmente a brotes intrahospitalarios, estando implicado en 4% a 10% de casos de neumonía virales, 2% a 10% de bronquiolitis y 3% a 9% de laringitis [Barrios 2009]. Se sabe también que el AdV es responsable de infecciones endémicas durante todo el año [Dalmas 2003] y se asocian tradicionalmente con infecciones respiratorias, oculares y gastroenteritis, mayoritariamente en niños [Echavarria 2008].

En nuestro país existen pocos estudios epidemiológicos moleculares. Los mismos abarcan el período comprendido entre 1991 y 1998. [Frabasile 2005].

Globalmente los serotipos 1 al 5, el 7, 21 y 41 son los más asociados a enfermedades humanas (Tabla 2). Los distintos serotipos muestran diferentes tropismos de tejido y se correlacionan con las manifestaciones clínicas de la infección [Zheng 2008, Kajon 2010]. Si hablamos de niños,

los HAdVs más comunes son del 1 al 7 y el 11 [Lee 2010]

En adultos los serotipos implicados en infecciones respiratorias incluyen a las subespecies B1( HAdv-3,7,11,16 y 21) especies C(HAdV-1,2,5 y 6) y algunas E(HAdV-4) [Moura 2007, Louie 2008, Houg 2010].

Los serotipos predominantes difieren según países o regiones y a su vez cambian en el correr del tiempo [Li 1996, Kajon 1992]. En Latinoamérica predominaba la cepa HAdV 7-b pero a mediados de los 80 una nueva cepa emergió en Argentina, Brasil y Chile (HAdV-7h) y más adelante en el tiempo fue remplazada por HAdV-7b nuevamente [Moura 2007, Kajon 1992]. HAdV 4 fue aislado de 1 solo paciente en Brasil (0,6%). En Argentina y Uruguay, HAdV 7 fue responsable del 62,4% de infecciones respiratorias por Adenovirus en niños entre los años 1991 a 1994, seguido de serotipos C (HAdV 1, 2 y 5). [Moura 2007].

## 1.5 VACUNAS

---

El uso de vacunas a virus vivo para enfermedades respiratorias agudas a partir de HAdV7 fue investigada y la administración oral fue reportada por inducir altos niveles de anticuerpos en 1960. Se demostró que algunos Adenovirus infectan el tracto intestinal pero no producen síntomas en adultos. Esto llevo a la administración del virus como una vacuna en una capsula recubierta la cual produce una infección intestinal asintomática y anticuerpos neutralizantes. Se probó en voluntarios humanos incluyendo la administración de vacunas de HAdV 7 y HAdV 4 individualmente y simultaneas [Gray2012].

Ambas vacunas fueron licenciadas por la FDA en 1980 y producida por Laboratorios Wyeth. Este dejó de producirla en 1996 y el stock fue terminado en el 1999. Estas vacunas fueron indicadas para los reclutas militares quienes mostraban ser de alto riesgo de contraer enfermedades respiratorias agudas, especialmente por los serotipos indicados en las vacunas. La duración de la inmunidad de las vacunas y la duración de anticuerpos en sangre no se han estudiado.

En el 2001, siete años después de que se dejaran de hacer las vacunas, los laboratorios Barr (ahora Teva) ganan un contrato para volver a introducir la vacuna. Esto sucede a causa de la muerte de dos reclutas no inmunizados. Teva gana la licencia para producir la vacuna HAdV 7 y HAdV 4 en marzo del 2011. La vacuna es la misma utilizada por Wyeth [Gray 2012].

## 1.6 DETECCIÓN EN EL LABORATORIO

---

Los métodos convencionales para el diagnóstico de infecciones por Adenovirus incluyen inmuno-fluorescencia, PCR cualitativa tanto como el uso de cultivos celulares, la cual es la técnica de oro para estos virus. Sin embargo puede tomar hasta 3 semanas para que desarrolle un efecto citopático y algunos tipos de HAdV son complicados a la hora de trabajar ya que tienen un crecimiento lento e inefectivo requiriendo líneas celulares específicas para su aislamiento [Madisch 2005]. Los Adenovirus entéricos, tipos 40 y 41 posee limitaciones para propagarse en cultivo celular y esto dificulta la detección y cuantificación en aguas ambientales [Ogorzaly 2013]. El desarrollo de la PCR cualitativa provee una mejora en la rapidez, sensibilidad y confiabilidad de los diagnósticos de las infecciones localizadas por HAdV como el ojo, tracto intestinal y el tracto respiratorio alto y bajo [Allard 1990, Pring-Akerblom 1994, Echavarria 1998].

La baja frecuencia de homología de los HAdV complica el desarrollo de una PCR cuantitativa genérica porque son requeridas al menos tres secuencias conservadas (dos para la unión de los cebadores y uno para la sonda) con una ventana de al menos unos cientos de pares de bases del genoma de Adenovirus [Madisch 2005]

Los métodos destinados a la detección de virus en aguas contaminadas, comenzaron a desarrollarse hace más de medio siglo atrás. Asuntos de salud humana, principalmente en torno a la circulación de Poliovirus, motivaron la evolución en técnicas de detección y dieron comienzo a la virología ambiental [Metcalf 1995].

Una técnica muy utilizada es la PCR a tiempo final en la que la mayoría de los cebadores utilizados referenciados en otros trabajos se dirigen a la proteína del hexón de HAdV como blanco, al igual que los utilizados en el presente trabajo [Hernroth 2002, Heim 2003]. Se ha visto que funciona muy bien a la hora de detectar los tipos entéricos de HAdV en aguas los cuales son el 40 y el 41 como se dijo anteriormente.

En este trabajo se llevó a cabo la puesta a punto de un protocolo de detección por PCR cuantitativa, la cual es una de las técnicas más utilizadas hoy en día mundialmente para el análisis de aguas en el ambiente.

## 2 OBJETIVOS

---

### **2.1** Objetivos generales:

Esta tesina pretende relevar la presencia de Adenovirus Humano en cuatro microcuencas de la Ciudad de Barros Blancos a partir de efluentes sanitarios y cursos de agua usados con fines recreacionales y productivos.

### **2.2** Objetivos específicos:

1. Poner a punto una técnica de PCR en tiempo real para la detección de Adenovirus humano.
2. Caracterizar en forma cuantitativa Adenovirus Humano en muestras de diversos cuerpos de agua de la Ciudad de Barros Blancos
3. Realizar el análisis de los resultados obtenidos con datos de pluviosidad, temperatura y a su vez comparar con datos bacteriológicos ya registrados.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Ambiente de estudio y muestreo

Barros Blancos es una localidad del departamento de Canelones, ubicada dentro del Área Metropolitana de Montevideo y que se extiende a lo largo de la ruta 8 desde el kilómetro 22 hasta el 29.

El área de estudio abarca la parte sureste de Barros Blancos y corresponde al ámbito geográfico de los hogares de los alumnos de la Escuela N° 187, incluyendo sus áreas recreativas y de tránsito. Los principales centros poblados de la zona son Villa Carmen, Villa Universitaria, Paso Escobar, Bella Vista Chico y Bella Vista de Carrasco [CEUTA 2013].

Si nos referimos a las características geográficas de la zona a estudiar, podemos decir que el relieve es relativamente plano con ondulaciones suaves y pequeñas cañadas de caudal irregular que generalmente circulan en valles anchos, mal definidos y de drenaje deficiente con presencia de numerosos humedales naturales [CEUTA 2013].

El diagnóstico, en el cual participaron distintos integrantes locales, realizado en una primera etapa de la investigación, permitió identificar las cañadas, tajamares y pozos más frecuentados por la población, principalmente por los niños en verano para su recreación o baños. Esos cuerpos de agua pueden ser contaminados por efluentes de pozos negros que circulan en las cunetas que a su vez desembocan en la red hidrográfica local. Otra fuente de contaminación pueden ser los excrementos de animales y materias fecales humanas que se acumulan cerca de viviendas carentes de baño y que son susceptibles de ser

arrastrados por la escorrentía superficial en episodios de lluvias intensas. [CEUTA 2013].

Esta información se combinó junto a una inspección sanitaria para determinar las posibles fuentes de contaminación fecal de origen animal y los puntos donde se vierten aguas servidas (provenientes de cunetas) en los cuerpos de agua.

Se estudiaron los 8 principales lugares de baños identificados en la etapa de diagnóstico, así como 3 cunetas y 2 cañadas cercanas.

A continuación se describen esos lugares ordenados según las 4 principales microcuencas a las que pertenecen (Figura 5)

**1) Microcuenca del tajamar “El Coronel”:** El tajamar “El Coronel” (*sitio 1*)  
La cuneta en avenida José María García (*sitio 2*),

**2) Microcuenca del tajamar Caputo :** El tajamar Caputo (*sitios 3 a 5*)

Con el propósito de entender mejor la relación entre la contaminación fecal del tajamar y la de las 2 cañadas que lo alimentan, se tomaron muestras de éstas (que se identifican como cañadas A y B) en sus respectivas intersecciones con el camino Paso Escobar (*sitio 6 y 7*)

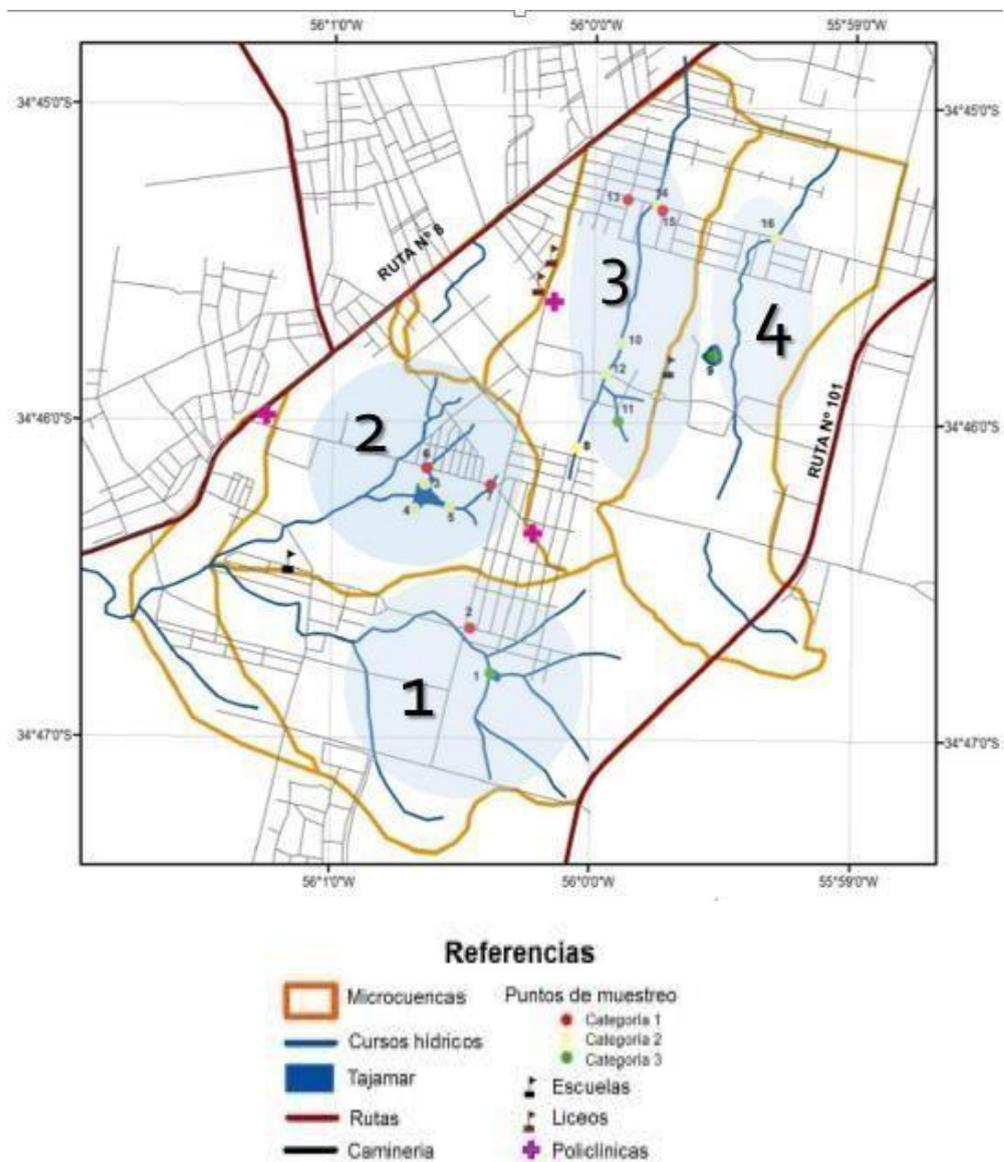
**3) Microcuenca de la cañada C:**

- En el Puente de la calle Tala (*sitio 8*)
- El pozo de la Ladrillera (*sitio 11*)
- Puente de la calle 19 de Junio (*sitio 12*)
- El pozo de los Bomberos (*sitio 10*)

- Camino República ( sitio 14)
- Las cunetas en la calle Maldonado y Calle Cabildo ( sitios 13 y 15)

#### 4) Microcuenca de la cañada D:

- Puente sobre la cañada D (sitio 16)
- Cantera de los Militares ( sitio 9)



**Figura 5** Mapa de la zona de estudio. Se detallan las principales fuentes de agua y los puntos de muestreo. Extraída y modificada de CEUTA, 2013 [CEUTA, 2013].

Para estimar el grado aproximado de contaminación fecal de las muestras de agua, se elaboró una categorización *a priori* de los cuerpos de agua estudiados, en base a los mapas de densidad de población y la inspección sanitaria realizada en la zona (Tabla 3) [CEUTA 2013].

| Categoría | Descripción  | Nivel de contaminación |
|-----------|--|------------------------|
| 3         | Cuerpo de agua sin aportes significativos de aguas servidas    | Bajo                   |
| 2         | Cuerpo de agua con aportes significativos de aguas servidas    | Medio                  |
| 1         | Cuneta o cañada donde predominan los aportes de aguas servidas | Alto                   |

**Tabla 3.** Categorización de los cuerpos de agua estudiados. Extraído de CEUTA 2013 con modificaciones [CEUTA, 2013].

### **3.2** Concentrados de partículas virales:

La primera etapa del procesamiento es la concentración de las partículas virales presentes en las muestras de agua ya que las mismas pueden encontrarse en bajas cantidades como para ser detectadas. Se utilizó el método de concentración basado en ultracentrifugación, de Pina y cols. [Pina 1998] y adaptado por Bofill-Mas y colaboradores [Bofill-Mas 2000]. Se parte de una muestra inicial de 42 mL y se llega a un volumen final de 300  $\mu$ L.

Cabe aclarar que los muestreos y la concentración viral fueron realizados previamente en el grupo dentro del laboratorio de Virología de Facultad de Ciencias.

### **3.3. Extracción del ADN viral de las muestras**

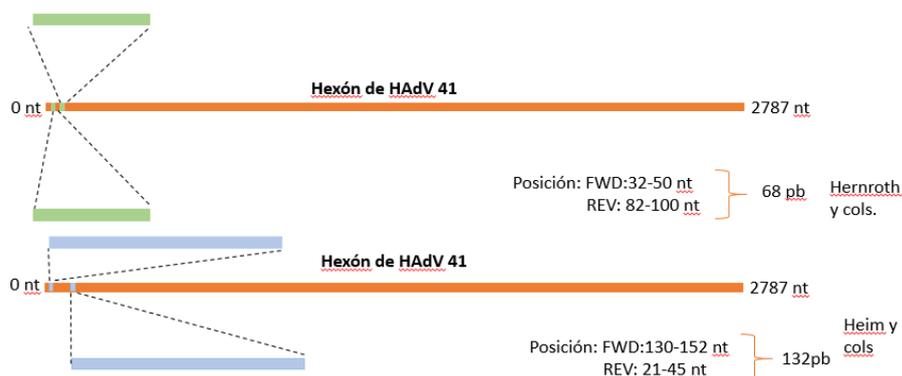
El ADN viral fue extraído a partir la muestra concentrada en partículas virales mediante la utilización del kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®), siguiendo las recomendaciones del fabricante con modificaciones. Primero se agregaron 20µl de proteasa Qiagen a 100 mL del concentrado de partículas virales obtenidas del paso anterior. Posterior a eso se añadió 200 µL de buffer AL a la muestra y se mezcló por vortex 15 segundos. Luego se incubó por 10 minutos a 56 °C. Después se añadieron 200 µL de etanol absoluto a la muestra y se mezcló nuevamente por vortex. Cuidadosamente se agregó la mezcla del paso anterior a la columna mini QIamp, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se descartó el filtrado. Luego se realizaron lavados con 500 µl de buffer AW1, se centrifugando a 8000 rpm por un minuto. Luego de descartar el filtrado, se realizó el mismo paso pero esta vez con el buffer AW2 y centrifugando a velocidad máxima (14000 rpm) por 3 minutos. Finalmente se añadieron 50 µL de buffer AE, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se realizó un segundo paso de elución con 200 µL de buffer AE. Finalmente se almacenaron los eluidos a -80°C.

### **3.4 Obtención del plásmido control de Adenovirus Humano para la puesta a punto de los ensayos de PCR cuantitativa**

Primeramente en esta etapa de trabajo, se realizó una revisión bibliográfica a fin de analizar las distintas técnicas de PCR en tiempo real para la detección de HAdV en aguas.

Tras la búsqueda, la reiteración de citas bibliográficas de algunos trabajos y buenos resultados obtenidos, se tomaron en cuenta dos principales juegos de

cebadores descritos por Hernroth y colaboradores [Hernroth 2002] y Heim y colaboradores [Heim 2003]. Se procedió a realizar un alineamiento de las cuatro secuencias (2 pares de cebadores) contra una secuencia del gen que codifica para la proteína del Hexón de HAdV del serotipo F tipo 41 (Código de acceso AB330122). En la figura 6 se muestra un esquema para visualizar la posición de los cebadores en el largo del gen del hexón.



**Figura 6.** Esquema del gen del Hexón de HAdV y los dos juegos de cebadores elegidos (Hernroth y Heim) indicando el largo de la región que abarcan en pares de bases (pb) a un lado de la imagen

Finalmente se decidió utilizar el juego de cebadores descrito por Heim y cols [Heim 2003] así como los cebadores propuestos por Henroth y cols. [Hernroth 2002] (Tabla 4).

Cabe aclarar que los cebadores descritos por Heim y cols. También amplifican en tipo 51 de los HAdV.

| Nombre               | Secuencia nucleotídica                      | Autor            | Tamaño de amplicón |
|----------------------|---|------------------|--------------------|
| Primer Forward (AQ1) | 5'-GCC-ACG-GTG-GGG-<br>TTT-CTA-AAC-TT-3'    | Heim y cols.     | 132 pb             |
| Primer Reverse (AQ2) | 5'-GCC-CCA-GTG-GTC-<br>TTA-CATGCA-CAT-C-3'  | Heim y cols.     |                    |
| Ad Forward           | 5'-C(AT)T ACA TGC ACA<br>TC(GT) C(CG)G G-3' | Hernroth y cols. | 68 pb              |
| Ad Reverse           | 5'-C(AG)C GGGC(GA)A<br>A(CT)T GCA CCA G-3'  | Hernroth y cols. |                    |

**Tabla 4.** Descripción de los cebadores utilizados para el clonaje del plásmido control, y detección de las muestras por PCR en tiempo real.

### 3.4.1 Mantenimiento de línea celular Hep-2 e infección de la misma con una cepa de Adenovirus humano proveniente de la colección presente en la Sección Virología.

Se realizaron infecciones de células Hep-2 con una cepa de HAdV. Dicha cepa fue aislada previamente a partir de una muestra clínica y conforma parte del archivo de cepas del laboratorio. La infección viral fue realizada a una multiplicidad de infección (MOI) menor a 1. Se incubó a 37 °C durante 48 horas coincidentes con la aparición del efecto citopático característico de Adenovirus. Se cosecharon las células infectadas y se centrifugó a 1200 rpm, obteniéndose dos fracciones: sobrenadante y un sedimento celular. Se realizaron dos ensayos independientes de producción de Adenovirus en paralelo.

### **3.4.2 Extracción de ADN genómico de Adenovirus a partir de células infectadas**

Se empleó un sistema comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®) para la extracción del ADN viral a partir de las cosechas de sobrenadante y de células sedimentadas siguiendo las indicaciones del fabricante como se detalló en el ítem anterior. A diferencia que con los concentrados virales, en este caso se utilizó un volumen inicial de 400 µl de sobrenadante celular y 80 µl de pellet. Por éste motivo los volúmenes de etanol absoluto y buffer AL varían.

Se visualizó la presencia de ADN genómico viral extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a: 120 Volts por 25 min, en Buffer TAE 1X. Para la visualización del ADN fue utilizado el agente intercalante de ácidos nucleicos (SYBR® Safe DNA gel stain, Invitrogen). En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) para auxiliar en la identificación del tamaño de las bandas esperadas.

Se determinó la concentración del ADN viral mediante espectrofotometría empleando un equipo de medición por Nanodrop (2000 Spectrophotometer. Thermo Scientific) y mediante estimación por visualización en gel de agarosa utilizando un marcador de peso molecular de referencia.

### 3.4.3 Puesta a punto de la detección del ADN de Adenovirus mediante PCR a tiempo final.

Para confirmar la presencia del ADN genómico en las muestras se realizó la puesta a punto de una PCR a tiempo final empleando dos juegos de cebadores, de los cuales uno se va a emplear en la PCR cuantitativa. Éstos están basados en el trabajo de Heim y colaboradores [Heim 2003] y el otro par en el de Hernroth y cols. [Hernroth 2002] y fueron detallados en la Tabla 4. El protocolo utilizado es el descrito a continuación:

Mix para 1 reacción (volumen final de 50  $\mu$ L):

| Reactivos             | Volúmenes     | Conc. iniciales | Conc. a vol. Final 50 ul |
|-----------------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| MgCl <sub>2</sub>     | 4,0 $\mu$ l   | 25 mM           | 2mM                      |
| Cebadores (AQ1 y AQ2) | 2,0 $\mu$ l   | 10 $\mu$ M      | 0,4 $\mu$ M              |
| Buffer                | 5,0 $\mu$ l   | 10X             | 1X                       |
| dNTPs                 | 1,0 $\mu$ l   | 10 mM           | 0,2 mM                   |
| Enzima Taq Polimerasa | 0,25 $\mu$ l  | 5U/ $\mu$ l     | 1,25 unidades            |
| Molde de ADN          | 5,0 $\mu$ l   | -               | -                        |
| H <sub>2</sub> O      | 30,75 $\mu$ l | -               | -                        |

**Ciclado: 95°C 1 min, [95°C 15s, 60°C 1 min, 72°C 30s] 40 ciclos, 72°C 10 min.**

Se realizó el mismo protocolo para ambos juegos de cebadores por separado. Se ensayaron diluciones 1/50 y 1/100 de la extracción del ADN con los dos juegos de cebadores. Se visualizó dicho resultado mediante electroforesis como fue descrito anteriormente son la salvedad de que el gel de agarosa fue al 1,5%,

#### 3.4.4 Clonaje del producto amplificado en un vector Pgem T easy

Se seleccionó el producto amplificado por PCR a partir de los cebadores descritos por Heim y cols. [Heim 2003] para utilizar como inserto en el paso de clonaje.

Previamente se realizó la purificación del producto de PCR a partir del gel de agarosa con un kit comercial (Zymoclean Gel DNA recovery kit. Zymoresearch. Epigenetics) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se midió por Nanodrop la concentración del ADN purificado, el cual se utilizó como inserto. Se verificó su concentración por visualización por electroforesis en gel de agarosa y se estimó su concentración por comparación de intensidad con el marcador de peso molecular de referencia.

Posteriormente se procedió a la ligación del inserto purificado de 132 pb en el plásmido provisto por el kit comercial Pgem T Easy Vector Systems de Promega. La reacción se llevó a cabo manteniendo una relación de tres moléculas de inserto por una de vector. La cantidad de inserto a incorporar para 50 ng de vector en la reacción fue calculado de la siguiente manera:

$$\frac{50ng \text{ vector} \times 0,132 \text{ kb inserto}}{3,015 \text{ kb vector}} \times 3 = 15 \text{ ng inserto}$$

Se siguieron las instrucciones del fabricante con modificaciones en las cantidades de componentes de la reacción que se detallan a continuación:

| Componente de reacción  | Volúmenes                  | Conc. iniciales | Conc a vol. final 5µl |
|---|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Buffer de Ligación , T4 ADN ligasa  | 2,5                        | 2X              | 1X                    |
| Vector: Pgem T Easy Vector  | 0,5                        | 50 ng/µl        | 5ng/µl                |
| Inserto: Producto de PCR (6,5 ng/ul)  | 1µl ( dil 1/3)<br>(5ng/µl) | 5ng/µl          | 1ng/µl                |
| Ligasa de ADN T4  | 0,5µl                      | 3 U/µl          | 0,3 ng/µl             |
| Agua libre de nucleasas suficiente para <u>volumen final</u> de: <b>5ul</b> | (0,5 µl de H2O)            | -               | -                     |

Se utilizaron 2 µl de la ligación para transformar 50 µl de bacterias DH5alfa electrocompetentes. Se mezclaron por pequeños golpes y se traspasaron los 52 µl a la cuba de electroporación de forma ágil y bajo mechero. Se colocó la cuba en hielo 1 minuto y posteriormente se colocó la cuba en el aparato Gene Pulser XCell (BioRad) y se procedió a someter la muestra a un pulso eléctrico. Terminado el pulso, se extrajo inmediatamente la cuba y se agregó 1mL de medio SOC. Se resuspendió la mezcla y la transfirió a un tubo de 1,5 mL, para su incubación en agitación (200 rpm) a 37°C, durante 1 hora y 30 minutos.

Posteriormente se sembraron diferentes volúmenes del cultivo transformado en placas de agar LB con 1M IPTG /40mg/mL Xgal/100 mg/mL ampicilina, como forma de seleccionar las bacterias que contienen el plásmido incorporado que lleva un gen de resistencia al antibiótico mencionado.

Además de esta selección, este sistema contiene un gen reportero que debido a la inserción del ADN foráneo en ese sitio se interrumpe su marco de lectura. En *E. coli*, el operón lac es requerido para el metabolismo de la lactosa. Si hay lactosa en el medio, o IPTG actúa inactivando al represor lacZ e induce la síntesis de enzimas como la  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza la lactosa. Muchos vectores plasmídicos portan la secuencia del fragmento  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa. La cepa usada expresa el fragmento  $\Omega$  de la enzima como episoma. Las cepas que sean transformadas con el plásmido podrá sintetizar la  $\beta$ -galactosidasa por  $\alpha$ -complementación. La actividad enzimática se evidencia usando X-gal como sustrato cromogénico que se convierte en color azul. Si el inserto se ubica en el gen del plásmido que codifica  $\alpha$  se interrumpe y se genera una enzima no funcional que no usa X-gal, quedando la colonia blanca. Éstas serán nuestras colonias de interés. Se sembraron placas con 100  $\mu$ l de cultivo bacterias transformadas y se incubaron a 37°C, durante toda la noche. Posteriormente se picaron las colonias blancas y se pusieron a crecer en medio LB líquida con ampicilina (100 mg/mL), a fin de seguir manteniendo la selección de las colonias con plásmido e inserta.

El próximo paso a seguir fue la realización de la extracción y purificación del plásmido. Se utilizó un kit comercial (GeneJet Plasmid Mini prep Company, Thermo Scientific) y se siguieron las indicaciones del fabricante. . Se comenzó el procedimiento resuspendiendo el pellet de bacterias en 250  $\mu$ l de solución de resuspensión. Posterior a esto se transfirió la suspensión de células a un tubo de 1,5 mL y se vortexeó hasta que ésta quedó homogénea. Luego se añadió 250  $\mu$ l de solución de lisis y se mezcló por inversión el tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución se volvió viscosa. Posteriormente se agregaron 350  $\mu$ l de

solución neutralizante y se mezcló por inversión varias veces. Luego se centrifugó la mezcla para obtener el debris celular y el ADN. Se transfirió el sobrenadante a la columna por decantado o pipeteo evitando transferir el precipitado. Se centrifugó por 1 minuto y se descartó el líquido, luego se colocó la columna en el mismo tubo. Se añadieron 500  $\mu$ l de solución de lavado a la columna y se centrifugó 30-60 segundos, se descartó el líquido. Se colocó la columna en el mismo tubo y se repitió el procedimiento usando otros 500  $\mu$ l de la solución de lavado. Después de esto se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL y se añadieron 50  $\mu$ l de buffer de elución en el centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y luego se centrifugó por 2 min. Finalmente se guardó el ADN puro a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para corroborar la presencia del inserto en el plásmido purificado se realizó una PCR a tiempo final utilizando los cebadores diseñados por Heim y cols. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente modificando el volumen de muestra de ADN, la cual en esta oportunidad fue 1  $\mu$ l de una dilución 1/100 del plásmido purificado.

Seguido a esto, se seleccionaron dos plásmidos purificados con las mejores concentraciones (medidas por nanodrop y confirmadas por cuantificación por gel) y se enviaron a secuenciar (Servicio Macrogen, Korea) para su confirmación final.

### **3.5 Cuantificación de HAdV por PCR en tiempo real**

La PCR cuantitativa implementada se basó en el protocolo descrito por Heim y colaboradores [Heim 2003] modificado a la química de detección por SYBR® Green PCR Master Mix siguiendo las indicaciones del fabricante, en un termociclador StepOne/StepOne Plus Applied Biosystems®. Un volumen de 2,5 µL de ADN (control o muestra) fueron añadidos al mix de reacción, el cual contenía 12,5 µL de 2X SensiMix (concentración final de 1X), 0,5 µL de una solución 10 µM de cebadores sentido y antisentido AQ1 y AQ2 (Tabla 4). Para cada reacción se agregó el volumen de agua esteril libre de nucleasas necesario para llevar la reacción a un volumen final de 25 µL.

Cuando se añade colorante SYBR Green a una muestra nucleotídica, se une de forma inmediata a todo el ADN de doble cadena presente en la muestra. Durante la PCR cuantitativa, la ADN polimerasa amplifica la secuencia que crea los productos de la reacción. SYBR Green se une entonces a cada nueva copia de ADN de doble cadena. El resultado es un aumento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR producido. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de ADN inicial.

Para realizar una cuantificación relativa de las muestras a estudiar se realizó para cada ensayo una curva estándar empleando el plásmido control que contenía el inserto del secuencia blanco de Adenovirus. Para cada ensayo, se calculó el coeficiente de linealidad y la pendiente de cada curva. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y se incluyeron controles negativos en cada experimento.

Finalmente se procedió a realizar el análisis de los datos arrojados por el software utilizado, y a partir de los Ct, curva de Melting adjudicar muestras

positivas o negativas, y cuantificar el ADN interpolando desde la curva estándar obtenida.

Previo a la interpolación fue necesario un cálculo de las copias genómicas en cada dilución usada para la curva de calibración, así como también los logaritmos de estos valores.

## 4. RESULTADOS

---

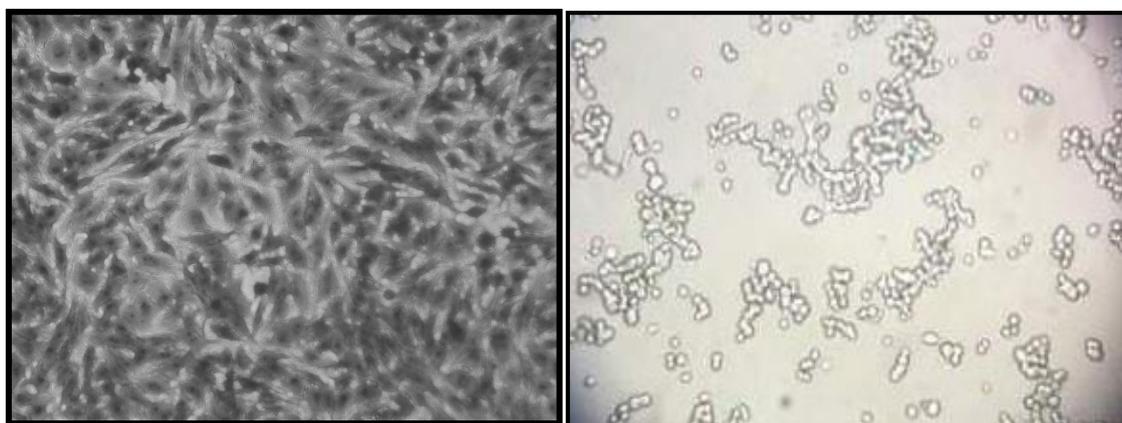
Para cumplir con los objetivos planteados, donde se propuso poner a punto una PCR en tiempo real para Adenovirus Humano, se comenzó por la generación de un control para la curva de calibración del ensayo la cual va a ser posteriormente utilizada en la etapa de detección y cuantificación de dicho virus en las 48 muestras de aguas de Barros Blancos. Estas 48 son la suma de 3 muestreos de 16 cuerpos de agua, los cuales fueron obtenidos en los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2011.

### **4.1** Puesta a punto de la PCR en tiempo real para Adenovirus Humano

Para la puesta a punto se llevaron a cabo varios pasos comenzando por la obtención de ADN viral control a partir de una línea celular Hep-2 infectada con una cepa de HAdV. Éste ADN fue necesario como matriz para amplificar una

secuencia del genoma el cual sería nuestro blanco de detección en los ensayos posteriores. Este fragmento fue luego clonado en un plásmido para ser empleado como control en la curva de calibración. Para ello, se necesitó poner a punto una PCR a tiempo final con el fin de amplificar dicho fragmento, llevando consigo la elección de los cebadores adecuados. Luego de tener el plásmido clonado se midió su concentración y se verificó por secuenciación la existencia del inserto en el mismo. Una vez confirmado el plásmido con el inserto, se procedió a realizar las diluciones seriadas con el mismo para la curva estándar de la PCR en tiempo real.

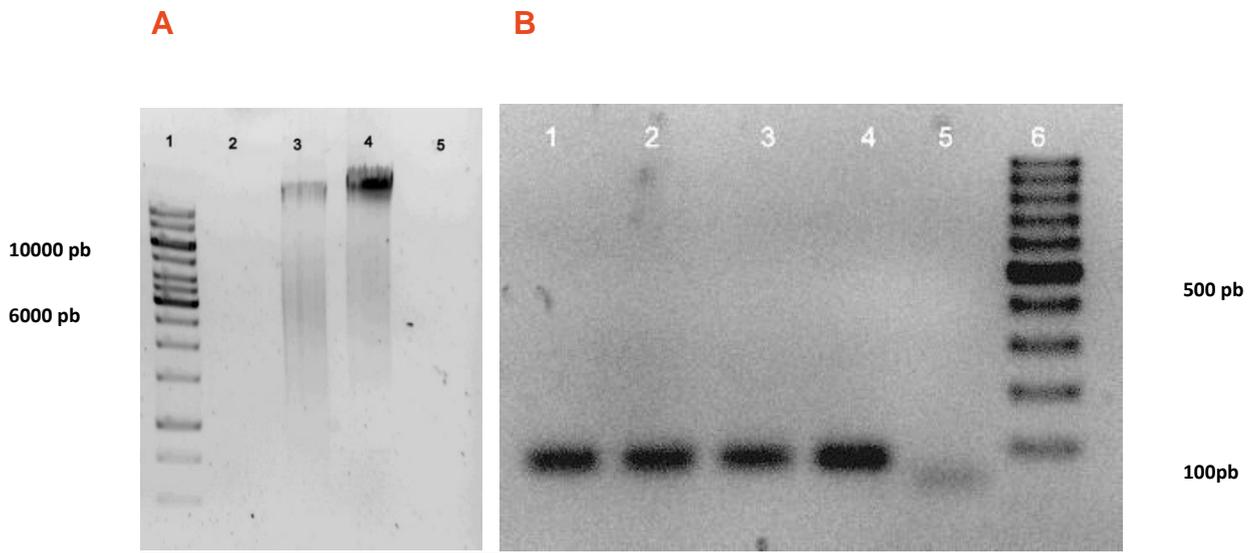
En la figura 7, se muestra un tapiz de células Hep-2 48 horas post- infección con una cepa de HAdV. En ella se observa el efecto citopático característico del virus el cual se describe por aglomeración de células en “racimos” donde las células infectadas adquieren forma redondeada agrupándose entre ellas. Se concluye que se logró una infección exitosa de las células Hep-2



**Figura 7.** Células Hep-2 sin infectar (izquierda) y las mismas mostrando efecto citopático característico de la infección con Adenovirus a las 48 horas post-infección. Magnificación 40 x.

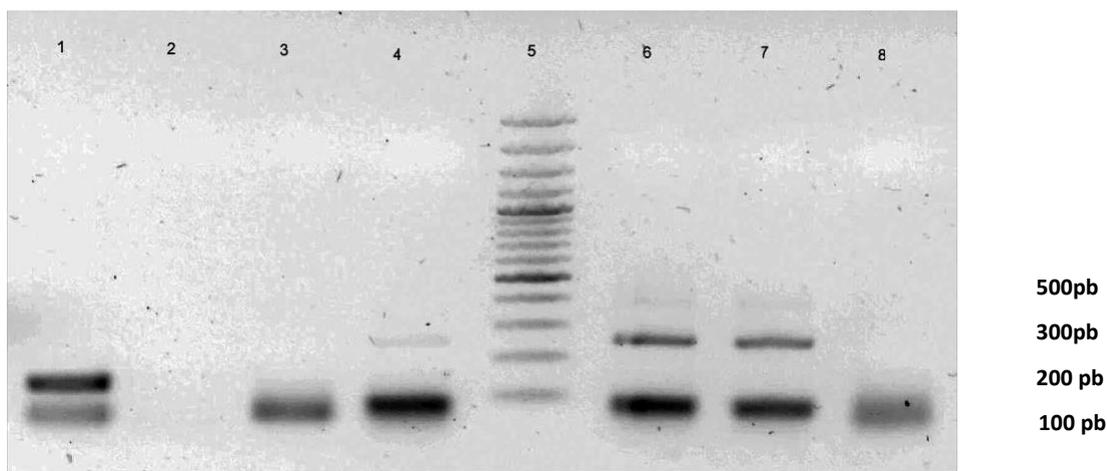
La extracción del ADN genómico a partir de las células Hep-2 infectadas, permitió corroborar la existencia del genoma de HAdV en las mismas. Esto fue visualizado en el gel de agarosa como una banda a la altura mayor a 10 kb del marcador de peso molecular lo cual es coherente con el tamaño de genoma de Adenovirus que ronda unas 36000 pb (Figura 8 A). Por más que la banda a esta altura nos da un indicio de que estamos frente a HAdV (junto al ECP), no podemos afirmarlo hasta hacer una PCR con cebadores específicos. Se realizaron extracciones de ADN a partir de dos ensayos independientes de infección viral en células Hep-2 tomando la fracción del sobrenadante del cultivo o la fracción celular. Como se observa en el análisis en gel de agarosa de las extracciones, el segundo ensayo de infección fue en el que se obtuvo mayor rendimiento (Figura 8 A, carril 4). En las otras dos fracciones correspondientes a los sobrenadantes celulares (carriles 2 y 5 respectivamente), no se observó una banda definida, por lo que nos indica que no hay suficiente cantidad de ADN.

Posterior a esto se realizó una PCR a tiempo final para verificar si las cuatro fracciones celulares contenían ADN de HAdV. Para ello se utilizaron los cebadores descritos por Hernroth 2005. Se puede visualizar que en la banda correspondiente a la amplificación de la extracción que se obtuvo mayor rendimiento (Fig. 8 B, carril 4) es la más intensa por lo que se decidió seguir trabajando con ésta muestra.



**Figura 8** Análisis del genoma de Adenovirus extraído a partir de células Hep-2 infectadas. A: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de extracción de ADN, realizado partir del sobrenadante del cultivo (carril 2 y 5) o del tapiz celular (carril 3 y 4) B: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación por PCR a partir de las extracciones de ADN, ya sea de sobrenadante de cultivos (carril 1 y 2) o del tapiz celular (carril 3 y 4) Carril 5: Control negativo Carril 6: MPM 100 pb. En los carriles 1 al 4 se puede observar el producto de amplificación de 68 pares de bases, obtenido con los cebadores AdF u AdR [Hernroth 2005].

A partir de la extracción del ADN viral seleccionada se procedió a realizar una PCR a tiempo final para amplificar una región correspondiente a la proteína del hexón de HAdV, en 2 diluciones diferentes para cada juego de cebadores. De esta forma se logró realizar un análisis primario para la amplificación del genoma por los dos protocolos de PCR diferentes (Tabla 4) (Figura 9).



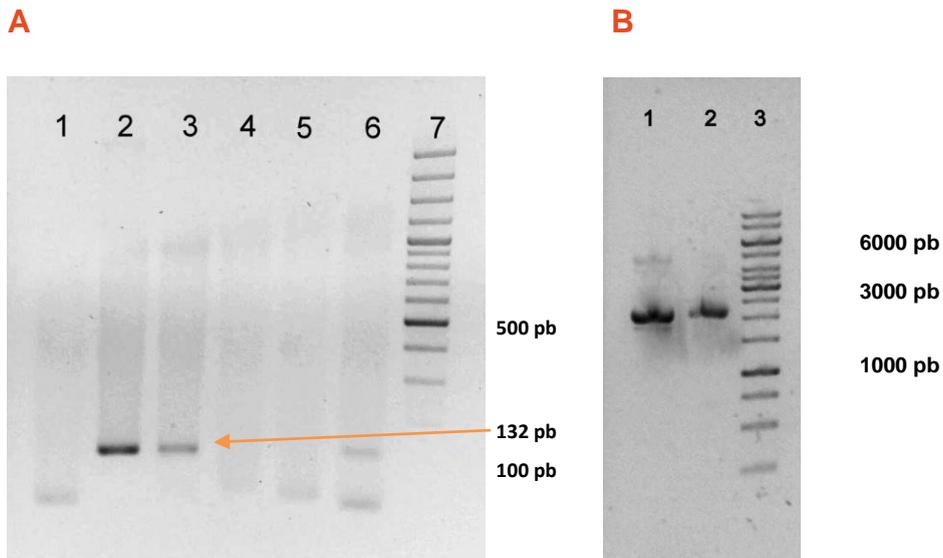
**Figura 9** Análisis del genoma de Adenovirus con dos juegos de cebadores diferentes PCR de dilución 1/50 y 1/100 de ADN genómico de HAdV con cebadores Heim (Carril 1 y 2) Control negativo de PCR con cebadores Heim (Carril 3); PCR de diluciones 1/50 y 1/100 de ADN genómico de HAdV con cebadores Hernroth (Carril 4 y 6 Carril) 5: MPM; Carril 7: Repetición de carril 6; Carril 8: Control negativo de PCR con cebadores Hernroth

En este gel de agarosa al 2% se observó la amplificación del extracto del genoma de Adenovirus con los dos juegos de cebadores; a utilizar en esta tesis (Tabla 4). Los tamaños esperados para el fragmento amplificado descrito por Heim y cols. es de 132 pb y para el de Hernroth y cols. es de 68 pb. Se observa una amplificación inespecífica a la altura de 250 pb y 300 con los segundos cebadores nombrados. En los carriles 3 y 8 se visualizan sin banda las cargas de los controles negativos de ambas PCR.

Se decidió continuar trabajando con los cebadores de Heim y cols. basándonos en la amplificación específica de un fragmento de 132 pb como era de esperar. A su vez el rango de pares de bases que abarca, contiene al definido por los cebadores descritos por Hernroth y cols. Y es una ventaja a la hora de pensar en futuros ensayos con el clón que contiene esta secuencia de HAdV.

Luego de obtenido el fragmento de ADN amplificado se procedió a clonar el mismo en un vector Pgem T Easy a través de un kit comercial, como fue detallado en materiales y métodos (3.4.4). Mediante PCR se confirmó la presencia del inserto correspondiente a la secuencia de HAdV en el plásmido Pgem T Easy. En la figura 10 A se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se corrobora el inserto de HAdV en tres colonias de las seis colonias ( 2, 3 y 6) y en la parte B se muestran el producto de la purificación del plásmido para dos de ellas (2 y 3 carriles 1 y 2 respectivamente). .

Se observa una banda de un tamaño aproximado mayor a 3000 pb lo cual es coherente con el tamaño esperado del plásmido (3015 pb) más el tamaño del inserto (132pb). Se visualizan las tres conformaciones del ADN por lo que podemos decir que el plásmido si está presente en la extracción. Se estimó por comparación con el marcador de peso molecular su concentración y a su vez la misma se midió por Nanodrop. Las concentraciones obtenidas para ambos plásmidos fue de 450 ng/ul 230 ng/ul (muestra del carril 1 y 2 respectivamente) correspondiente a las colonias 2 y 3



**Figura 10** Análisis de los plásmidos purificados (a) productos de PCR a partir de los plásmidos presente en seis colonias blancas obtenidas (carriles de 1 a 6). Marcador de peso molecular 100pb en el carril 7. (b) Análisis de plásmido purificado a partir de las muestras de los carriles 2 y 3 (gel a)

Posterior a esto se procedió a la secuenciación del clón obtenido y así verificar que efectivamente contenía el inserto de HAdV. En la figura 11 se muestra el alineamiento en el programa *Bioedit* de los cebadores utilizados (Heim y cols) junto al electroferograma de una de las secuencias obtenidas de los clones que muestra la calidad de la secuencia obtenida y nos permitió afirmar que el plásmido contiene el inserto de 132 pb amplificado del genoma de HAdV.

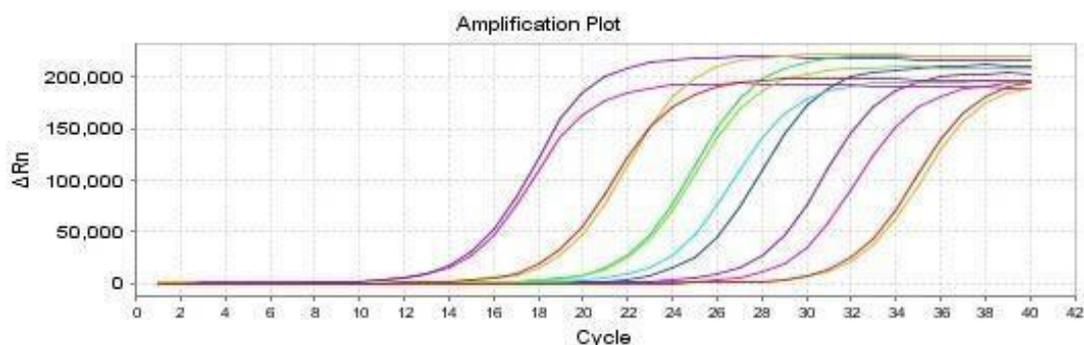


Cuando se utiliza Sybr Green, al ser un agente intercalante de cualquier ADN doble hebra, es necesario diferenciar el producto que queremos detectar de los falsos positivos. Se ha visto que dependiendo de la especie que se quiera detectar y los cebadores utilizados hay un pico de temperatura característico, el cual nos permite identificar si nos encontramos frente al producto amplificado de la especie que buscamos, a ésta la llamamos temperatura de *melting*. En el caso de Adenovirus Humano con los cebadores descritos por Heim y cols. el pico de temperatura de *melting* se encuentra en 86°C aproximadamente (Figura 12 D)

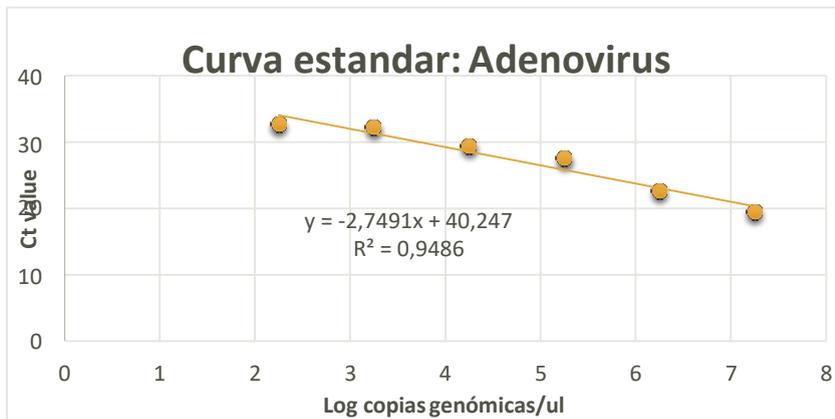
**A**

| Curva Adenovirus Plásmido |          |             |          |        |         |  |
|---------------------------|----------|-------------|----------|--------|---------|--|
| [] copy/uL                |          |             | Ct value |        |         |  |
| A                         | B        |             | A        | B      | prom    |  |
| 1,75E+07                  | 1,75E+07 | 7,243038049 | 19,297   | 19,491 | 19,394  |  |
| 1,75E+06                  | 1,75E+06 | 6,243038049 | 22,005   | 23,076 | 22,5405 |  |
| 1,75E+05                  | 1,75E+05 | 5,243038049 | 27,297   | 27,477 | 27,387  |  |
| 1,75E+04                  | 1,75E+04 | 4,243038049 | 29,192   | 29,416 | 29,304  |  |
| 1,75E+03                  | 1,75E+03 | 3,243038049 | 31,592   | 32,621 | 32,1065 |  |
| 1,75E+02                  | 1,75E+02 | 2,243038049 | 32,579   | 32,45  | 32,5145 |  |

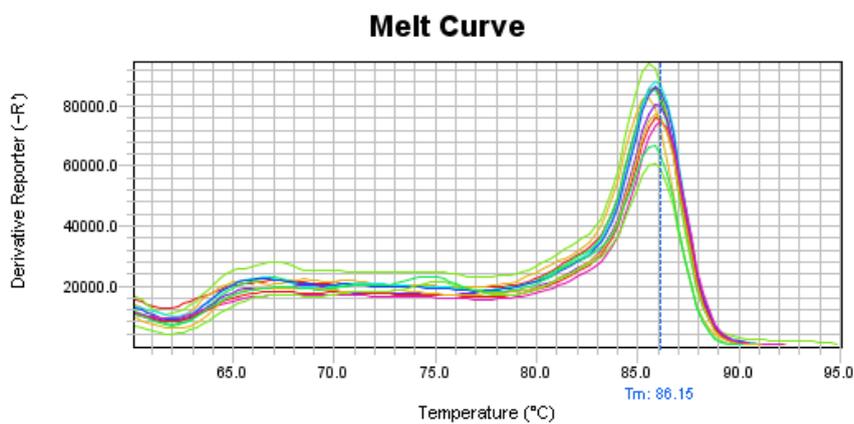
**B**



C



D



**Figura 12** Estandarización de la curva de amplificación por PCR cuantitativa del genoma viral. A: Valores de concentración y Ct. calculados para las diluciones seriadas en la estandarización de la PCR cuantitativa para Adenovirus Humano. B: amplificación de las diluciones seriadas, por duplicado, de ADN plasmídico con un inserto de 132 pb del gen del hexón de Adenovirus ( $10^7$  a  $10^2$ ) copias genómicas/ $\mu$ l). C: curva de calibración obtenida al graficar la cantidad de copias genómicas/ $\mu$ l promedio de los estándares en función de los valores de Ct. Se muestra la ecuación de la recta y el valor de R2. D: Melt Curve de las seis diluciones utilizadas para la curva estándar.

## 4.2 Cuantificación de Adenovirus Humano en muestras de agua de Barros

### Blancos

Luego de haber estandarizado el ensayo, a través de la construcción de la curva estándar, se procedió a realizar los ensayos de cuantificación y detección en las 48 muestras de agua. Todas las corridas de PCR en tiempo real fueron realizadas por duplicado tanto para las muestras como para el control negativo.

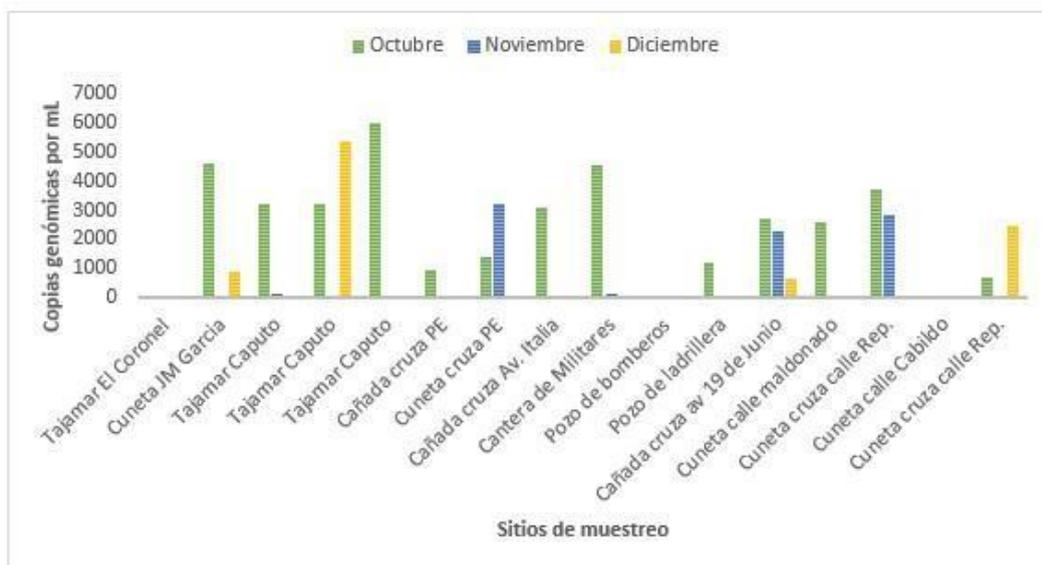
En el primer ensayo de PCR en tiempo real correspondiente al primer muestreo de aguas en el mes de octubre de 2011 se lograron detectar 13 muestras positivas de las 16 totales. Esta cantidad corresponde a un 81.2% del total. En el ensayo correspondiente al muestreo de noviembre de 2011 se lograron detectar 5/16 muestras positivas correspondiente a un 31.2 %. Finalmente en el muestreo de diciembre de 2011 se obtuvieron 4/16 muestras positivas, siendo un 25% del total (Tabla 5).

Finalmente si nos enfocamos en las 48 muestras procesadas, fueron un total de 22 las que demostraron tener carga viral correspondiente a HAdV, siendo un porcentaje del 45,8%.

| Sitios de muestreo | Adenovirus Humano (cg/mL) M1 | Adenovirus Humano (cg/mL) M2 | Adenovirus Humano (cg/mL) M3 |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1                  | -                            | -                            | -                            |
| 2                  | 4,67E+03                     | -                            | 8,70E+02                     |
| 3                  | 3,23E+03                     | 1,48E+02                     | -                            |
| 4                  | 3,23E+03                     | -                            | 5.360                        |
| 5                  | 6,00E+03                     | -                            | -                            |
| 6                  | 9,29E+02                     | -                            | -                            |
| 7                  | 1,41E+03                     | 3,23E+03                     | -                            |
| 8                  | 3,09E+03                     | -                            | -                            |
| 9                  | 4,57E+03                     | 1,55E+02                     | -                            |
| 10                 | -                            | -                            | -                            |
| 11                 | 1,18E+03                     | -                            | -                            |
| 12                 | 2,73E+03                     | 2,29E+03                     | 6,59E+02                     |
| 13                 | 2.570                        | -                            | -                            |
| 14                 | 3,71E+03                     | 2,82E+03                     | -                            |
| 15                 | -                            | -                            | -                            |
| 16                 | 6,88E+02                     | -                            | 2,45E+03                     |

**Tabla 5.** Resultados de la cuantificación por PCR en tiempo real de las muestras de agua correspondientes a los 16 puntos de muestreo elegidos en los meses de octubre noviembre y diciembre del 2011

Se realizó un gráfico de barras con el fin de comparar la carga viral de los cuerpos de agua en los tres diferentes meses de los muestreos. Esto conlleva una diferencia de temperatura, condiciones pluviométricas y otras condiciones fisicoquímicas del agua las cuales pueden contribuir ya sea al aumento o disminución de la cantidad de virus en el agua. En la mayoría de los casos se ve un aumento de carga viral y a su vez de número de positivos detectados en el mes de octubre (menos cálido) con respecto a noviembre y diciembre (Figura 13)

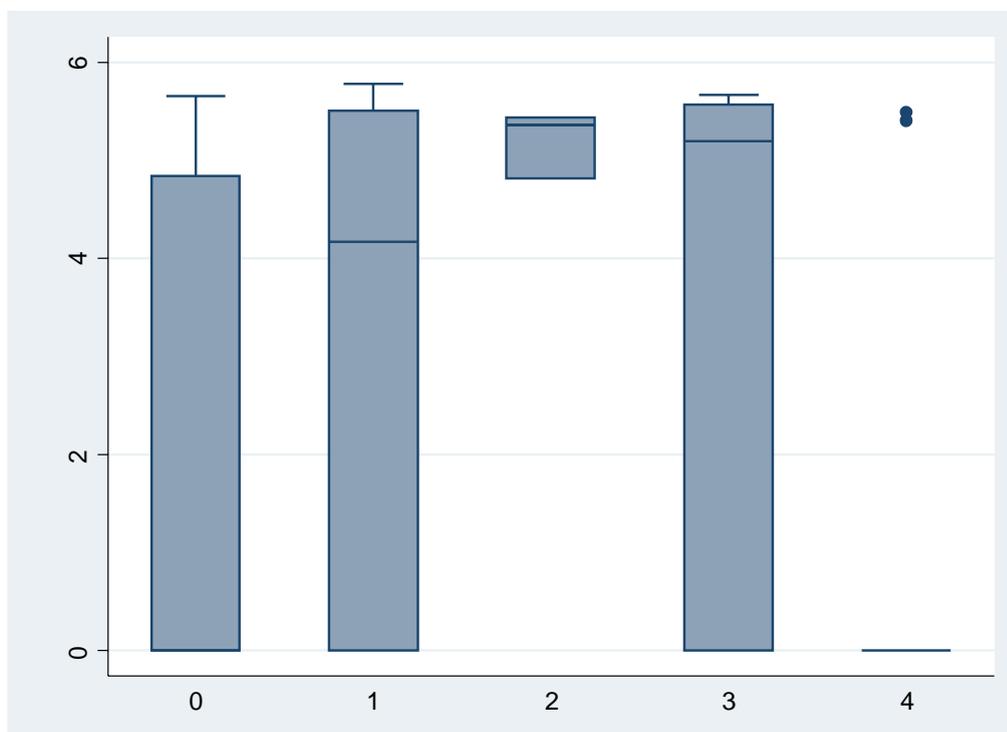


**Figura 13.** Cuantificación del genoma viral de Adenovirus por PCR en tiempo real, según los puntos y fechas de muestreo. Gráfico de barras que muestra las diferentes cargas virales en copias genómicas por mililitro de HAdV por sitio de muestreo y periodo de de toma de muestras (octubre noviembre y diciembre). Arriba se indica el color que describe cada mes.

Con el objetivo de estudiar el efecto de factores ambientales en la presencia de Adenovirus Humano en este punto se analizará la relación de la densidad poblacional, la temperatura, las precipitaciones y los indicadores microbiológicos en la presencia de Adenovirus Humano

En la figura 14 se muestran los gráficos de caja (Box Plot) donde se observa las cg/100 ml que se pudo medir con respecto a las 5 categorías de densidad poblacional. Éstos rangos y categorizaciones fueron realizados en un trabajo previo [CEUTA, 2013]. Los HAdV se distribuyeron de forma aleatoria, y no se puede corresponder con la variable de densidad de población. Así mismo se

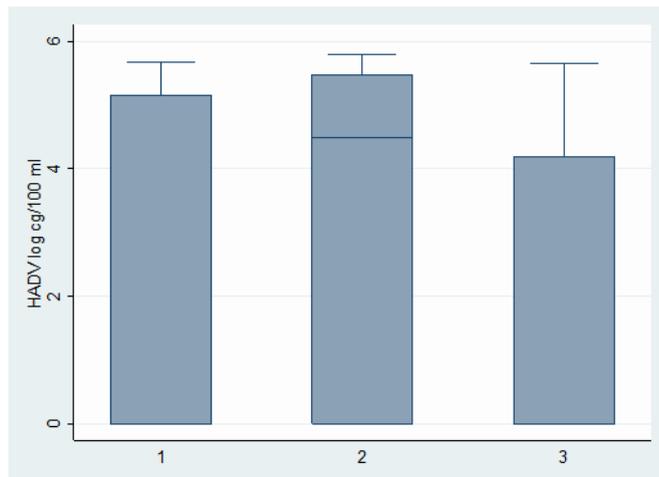
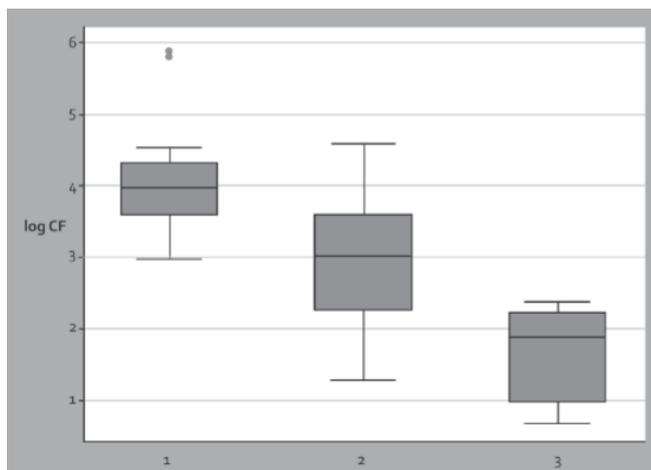
denota que los valores de copias genómicas rondaron los mismos valores para todas las categorías independiente de la cantidad de positivos.



**Figura 14** Gráfica mostrando los datos de cuantificación de copias genómicas de HAdV comparado con los distintos niveles de densidad poblacional en los cuales se encontraba cada sitio de muestreo. Los números del 0 al 5 corresponden: 0: de 0,1 a 10 hab/ha. 1: de 10 a 25 hab/ha 2: de 25 a 50 hab/ha. 3: de 50 a 75 hab/ha. 4: mas de 75 hab/ha

En la Figura 15, se observan los gráficos de caja para los datos bacteriológicos presentados en el libro “Diagnóstico socio ambiental orientado al estudio de la parasitosis intestinales y zoonosis” [CEUTA 2013] y para los datos de cuantificación de copias genómicas de Adenovirus Humano.. En la Figura 15 A se muestra la gráfica de Adenovirus Humano donde se observa una distribución sin mostrar una tendencia clara de la carga viral con respecto a las tres categorías. Mientras que en la Figura 15 B se muestra el descenso en la

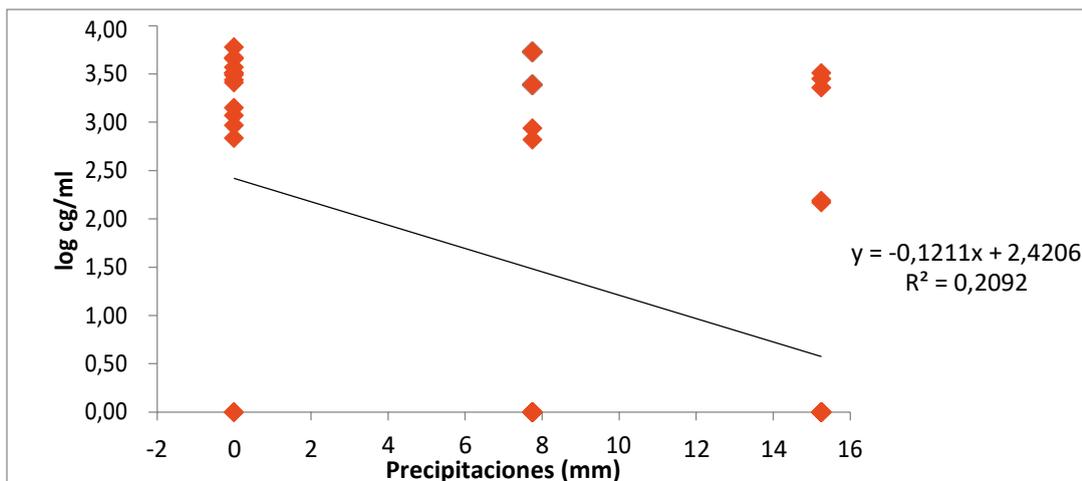
concentración de Coliformes Fecales (CF) utilizado como indicador microbiológico de contaminación fecal, donde se ve que concuerda con las categorías de nivel de contaminación fecal de los sitios de muestreo

**A****B**

**Figura 15:** Gráfico de cajas mostrando datos de cuantificación de copias genómicas de HAdV por categoría (detalladas en Tabla 3) (A). Los datos bacteriológicos en CF (B), fueron extraídos de CEUTA, 2013 [CEUTA, 2013].

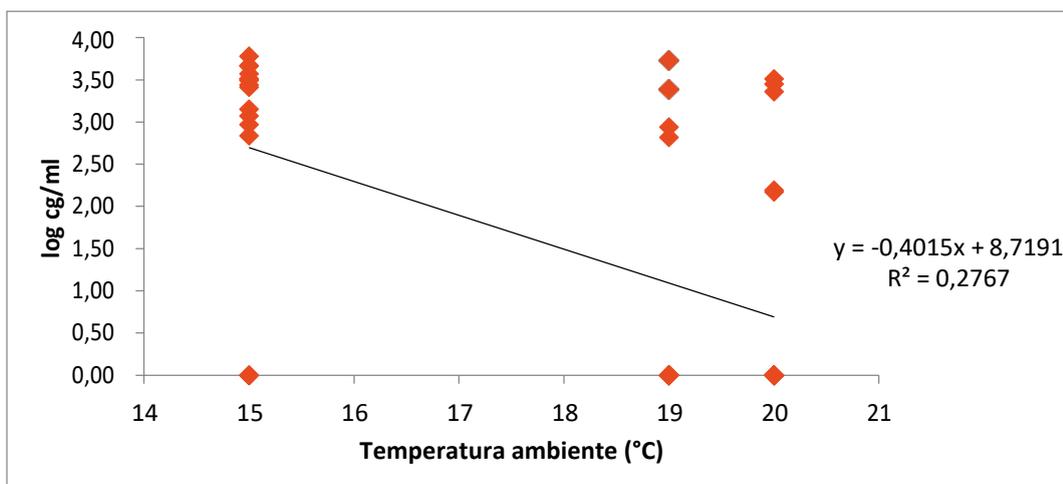
Posteriormente se quiso determinar si dos factores ambientales como son la temperatura y la pluviosidad marcaban alguna tendencia en relación a la cuantificación viral observada en los tres muestreos diferentes.

Se realizaron para ello gráficos donde se comparó la cuantificación de copias genómicas de HAdV con el promedio de precipitaciones y temperatura de los dos días previos a la toma de muestra, siendo los valores medidos 0 ml y 15°C para el primer muestreo, 15.5 ml y 20°C para el segundo y 7.8 ml y 19°C para el tercer muestreo. La figura 16 muestra una leve tendencia de la disminución en la cuantificación viral de HAdV a medida que aumentan las precipitaciones, lo que es acompañado con una recta de pendiente negativa. Por su parte los ceros, o sitios para los cuales no hubo detección tienen un peso importante en esta pendiente.



**Figura 16.** *Cuantificación viral por muestreo en función de las precipitaciones. Gráficas del logaritmo de copias genómicas virales en función de la precipitación promedio en los dos días previos al día de muestreo para Adenovirus humano*

A sí mismo en la figura 17 se observa la tendencia de la cuantificación viral con respecto a la temperatura. En la gráfica se observa una leve tendencia a la disminución de copias genómicas virales a medida que aumenta la temperatura acompañada de una recta con pendiente negativa. La mayoría de los puntos se ubican casi que en la misma línea aunque se observa una leve tendencia, sin embargo teniendo en cuenta también los sitios que dieron negativos para HAdV (ceros) incrementa el valor de la pendiente cuando realizamos la linealización del gráfico.



**Figura 17.** Cuantificación viral por muestreo en función de temperatura. Gráficas del logaritmo de copias genómicas virales en función de la temperatura promedio en los dos días previos al día de muestreo para Adenovirus Humano.

## 5. DISCUSIÓN

---

La presencia de uno de los principales virus responsables de gastroenteritis en aguas urbanas nos da evidencia que estos virus circulan relativamente en alta frecuencia a través de la población de la ciudad de Barros Blancos aledaña a los sitios de muestreo, y a estos cursos de agua en general. Esta información podría darnos una alerta del riesgo de enfermedades humanas asociadas a aguas contaminadas dentro de la ciudad de Barros Blancos. Los resultados de éste trabajo sumado a los obtenidos en análisis previos de estos mismos cuerpos de agua, indican que existe una alta carga viral presente, siendo potencialmente peligroso para la población ya que es probable el ingreso de las partículas virales por las distintas vías de transmisión, ya sea por la baja sanidad presente en la zona, poca higiene personal, deposición de las excretas en o cerca del curso de agua, además del uso recreacional que muchos niños le dan a estas cunetas cañadas y tajamares. Muchos estudios muestran la enfermedad por diarreas virales debido a la transmisión por aguas contaminadas, incluyendo su ingesta durante los baños de recreación. La detección y caracterización de HAdV en aguas del ambiente podrían ser datos potencialmente útiles para estudios epidemiológicos.

En este estudio se eligió realizar la puesta a punto y luego su uso para el procesamiento de las muestras, la técnica de PCR en tiempo real. La misma se caracteriza por ser rápida debido a la reducción de los tiempos de ciclado y sensible en la detección la cual se realiza mediante marcadores fluorogénicos.. La reducción en el tamaño del amplicón es generalmente recomendada por los

creadores de los ensayos comerciales de PCR en tiempo real. Este factor puede jugar un rol en la velocidad sin embargo se ha visto que disminuyendo el tamaño del producto no impacta directamente en la eficiencia de la PCR [Mackay 2002]. En este trabajo se eligieron dos juegos de cebadores en una primera instancia, los cuales según una búsqueda bibliográfica se encontraban mayormente citados por artículos donde se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para Adenovirus Humano. Se adaptó en esta oportunidad el protocolo descrito por estos autores a la tecnología Sybr Green, ya que ellos tenían estandarizada la técnica para su uso con sonda TaqMan. Por más que en trabajos anteriores de nuestro grupo ya se habían utilizado los cebadores de Hernroth y cols [Bolón 2012] obteniendo amplificación, hubo problemas de contaminación con los mismos. Otra razón por la cual descartamos a estos cebadores fue por la obtención de un amplificado inespecífico observado en la Figura 9, donde además de la banda esperada de 68 pb observamos una cerca de los 250 pb, lo cual podría interferir en el correcto desarrollo del experimento. De todas formas como ya se aclaró previamente, el clonado del plásmido Pgem T- Easy fue realizado en base a un inserto amplificado previamente con los cebadores descritos por Heim y cols, de un tamaño de 132 pb conteniendo en su secuencia a los descritos por Hernroth y cols. Por esta razón el clón podría utilizarse eventualmente como control en un ensayo usando cualquiera de los dos juegos.

Se hicieron varias pruebas para determinar el rango de la curva de calibración para la PCR en tiempo real y se conservaron 6 diluciones que abarcan un número adecuado de copias genómicas a los efectos de las necesidades del ensayo y que fue corroborada la correcta amplificación de todas. Este rango se describe desde  $1,75 \times 10^7$  a  $1,75 \times 10^2$  cg/ul. En cada uno de los análisis de muestras por PCR en tiempo real se realizó una curva independiente, por

duplicado con el fin de interpolar los valores de log de copias genómicas con la ecuación de la recta generada como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 12. Se observa que los últimos dos puntos de la curva tienen valores de Ct muy similares (Figura 12 A), lo que se visualiza en la curva como dos líneas casi superpuestas (Figura 12 B). Esto nos lleva a pensar que aquí estaría el límite de detección del ensayo, no pudiendo detectar niveles más bajos de copias genómicas. A través de los correspondientes cálculos se obtuvieron los valores de copias genómicas/ml de las muestras positivas para Adenovirus Humano. Para designar a una muestra positiva se tuvo en cuenta el número de Ct que el equipo nos arrojó para cada muestra, el cual debió ser menor al del control negativo y a su vez tener un pico de *melting* correspondiente a 86 °C aproximadamente, temperatura correspondiente al Adenovirus control con estos cebadores (Figura 12 D). En alguna oportunidad el control negativo dio un Ct muy similar a algunas muestras pero la temperatura correspondiente al pico de la curva de *melting* era distinto y alejada de 86°C.

Se ha visto que HAdV ha sido encontrado en rangos de detección entre el 2,8 al 90% en el mundo (Europa 13.6 –90 %, Asia 2.8– 63.9 %, África 5.3–44 %, Australia 9–66 %) En América, el cual es el continente de nuestro interés los rangos van del 15,7-85% [Chi-Wei 2015], estando dentro de éste porcentaje nuestros resultados los cuales dieron para los 3 muestreos independientes (81,2%, 31,2% y 25%) y para todas las muestras juntas (45,8%),

Las concentraciones durante los tres muestreos estuvieron dentro del rango de  $1,48 \times 10^2$  a  $6,00 \times 10^6$  cg/L. En estudios anteriores reportados, las

concentraciones de HAdV en aguas de río se enmarcaron en un amplio rango desde 10 a  $7,2 \times 10^6$  cg/L en el mundo. Los resultados de este trabajo cuantifican dentro del rango reportado en estudios anteriores. [Chi-Wei 2015]

Como primer estudio se realizó un gráfico de cajas para observar si existía una correspondencia entre la densidad poblacional de cada sitio de muestreo con la cantidad de copias genómicas de HAdV encontradas en los mismos. Se observa que no hay una tendencia clara con respecto a la densidad poblacional ya que los valores de copias genómicas no se correlacionan con ésta variable de ninguna forma (Figura 14). Sin embargo la cantidad de positivos si varía, viéndose solo 1 en la categoría 5, la cual corresponde al valor de mayor densidad de población. Es un resultado que no concuerda con lo esperado ya que estamos trabajando con un virus de huésped humano, y debería verse en mayor cantidad en zonas de mayor densidad.

Las muestras fueron tomadas en fechas lo suficiente espaciadas como para medir la posible influencia de factores estacionales como pueden serlo los cambios de temperatura, propiedades fisicoquímicas del agua, variaciones del caudal de las cañadas, y el desarrollo de la vegetación que las rodea.

Uno de los muestreos fue realizado en las 24 horas posteriores a una precipitación que produjera escorrentía superficial. El propósito era determinar si lluvias que producen escorrentía superficial generan mayores niveles de contaminación fecal en los cuerpos de agua. Lo que se observa en los gráficos realizados a partir de los datos de precipitaciones y de carga viral (Figura 16), muestra que hubo un comportamiento similar en los tres muestreos, considerando los diferentes niveles pluviométricos medidos en cada día. Antes del primer muestreo existió un período de ausencia de lluvia. Previo al

segundo, ocurrieron lluvias de gran intensidad dentro de las 24 horas antes de tomar la muestra, y por último ocurrieron lluvias de leve intensidad 10 días previos al tercer muestreo. En las primeras dos fechas de muestreo se obtuvieron concentraciones similares de HAdV, y la tercer fecha se ve un leve descenso de las mismas.

En comparación a los CF podemos decir que no se correlacionan los resultados obtenidos, ya que en ese caso se observó un aumento de los mismos con las precipitaciones más abundantes [CEUTA 2013]. Adicionalmente, se ha visto en estudios anteriores que las mayores concentraciones de copias genómicas de HAdV se han encontrado en períodos de escasas precipitaciones. Estos datos sugieren que no sólo el flujo superficial y subterráneo de contaminantes, inducida por las fuertes lluvias, se relaciona con aumentar la carga viral en el agua aunque también se ha visto es necesario un previo periodo de sequía para observar dicho efecto [Rodrigues 2015].

Por otra parte nos propusimos observar en otro gráfico la relación de la carga viral con la temperatura. En cuanto a la detección y cantidad de HAdV, ésta fue más alta en el mes de octubre con un valor de 81.2% de positivas y una cantidad máxima de  $6,00 \times 10^3$  cg/mL seguido de noviembre con un 31.2 % y un máximo de  $2,82 \times 10^3$  cg/mL y luego diciembre con un 25% de positivas y un pico de  $2,45 \times 10^3$  cg/mL.

Con esta variable se observó también una leve tendencia a la baja de positivos y a su vez de copias genómicas (Figura 17). Esto indicaría que a mayor temperatura hay una menor carga viral. Esto es coherente si lo vemos desde el punto de vista de la estructura de HAdV, ya que como se mencionó

anteriormente es sin envoltura, y de genoma ADN por lo que su naturaleza lo hace ser más resistente a diferentes condiciones ambientales como lo es la radiación UV. Al aumentar la temperatura, no se ven cambios importantes en la carga viral aunque si una leve tendencia a la disminución.

Esto nos indica que el aumento de la temperatura podría ser un factor influyente en la baja de positivos y de la concentración de los mismos en el agua. Esto mismo ha sido reportado por otros trabajos previos [Tani 1995, Choi 2005]. De todas formas es necesario realizar un muestreo más amplio, donde se pueda ver una diferencia significativa en la temperatura para poder comparar mejor las variables.

En cuanto a las muestras positivas para HAdV, cabe destacar que hubo un punto de muestreo, el sitio 12, perteneciente a la cañada que cruza la Av. 19 de junio, que fue positivo en los 3 muestreos. A su vez fue positivo para otros virus PBV en el primer muestreo y para NoV en el primero y segundo [Gillman, 2016]. Sumado a esto se logró detectar una muestra de Hepatitis E en el mismo sitio, y cabe destacar que fue el único. [Mirazo, proyecto FMV\_3\_2013\_1\_100843]. Este punto corresponde a una cañada donde el agua es poco profunda para que los niños se puedan bañar. Ellos lo hacen en pozos ubicados aguas arriba del puente, los cuales son de difícil acceso, por lo que la toma de muestra se realizó en el mismo puente. Este punto fue categorizado en el trabajo previo [CEUTA 2013] como categoría 2 (Tabla 3), lo que significa que fue descrito como un cuerpo de agua con aportes significativos de aguas servidas y tiene un nivel de contaminación medio.

La presencia de los patógenos virales depende del estado sanitario de la población ya que a diferencia de los indicadores bacterianos, tiene que haber individuos o animales infectados en el sitio de muestreo o en la microcuenca que lo alimenta para que haya presencia de estos virus en las aguas.

Se realizaron comparaciones de la carga viral de HAdV con respecto a las tres categorías propuestas según el diagnóstico socio ambiental realizado en el estudio previo en la ciudad de Barros Blancos [CEUTA 2013]. Las categorías fueron descritas según el nivel de aguas servidas que alimentaban a cada sitio de muestreo siendo la 1 la que describe más aportes de contaminación y la 3 la que menos aportes recibe. Así mismo en el trabajo mencionado, se realizó una comparación con indicadores bacterianos mostrando los resultados en un gráfico de cajas, en el cual se ve claramente el descenso de CF desde la categoría 1 a la 3 (Figura 15A). Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio, se ve que no hay una correspondencia clara de la carga viral con respecto a las categorías asignadas a las aguas de cada sitio de muestreo, por lo que podríamos suponer, comparando con el gráfico de CF, que no hay una correlación en cuanto a la presencia de indicadores CF y HAdV (Figura 15 B), el cual como se ha dicho antes, ha sido propuesto como candidato para indicador viral de contaminación fecal humana. Esto mismo ya fue evidenciado por otros autores en estudios de contaminación microbiológica de diferentes tipos de aguas, afirmando que no existe una correlación exacta entre los niveles de contaminación bacteriana (coliformes totales y fecales) y viral [Pusch 2005].

Cabe resaltar que los resultados de este estudio concuerdan con estudios previos de HAdV donde fue encontrado con alta prevalencia en agua

contaminada con materia fecal tanto humana como animal [Fong 2005, Hundesa 2009, Bolón 2012, Bolón 2013].

La presencia de altas concentraciones de HAdV encontradas en los distintos cuerpos de aguas en la ciudad de Barros Blancos sugiere un potencial riesgo para el humano. Estos resultados sumados a los reportados previamente para estas aguas son una información sumamente relevante para la concientización, y toma de cuidados pertinentes ya sea en el adecuado depósito de excretas y residuos como la correcta transmisión de la información a los niños que suelen utilizar estas aguas como zona de baño y recreación.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

- Se logró generar un plásmido recombinante conteniendo una secuencia del gen codificante para la proteína de cápside (Hexón) de HAdV, el cual servirá como estándar en futuros ensayos de cuantificación de HAdV por PCR en tiempo real.
- Se logró poner a punto un ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de Adenovirus Humano a partir de muestras ambientales.
- Se detectó la presencia de Adenovirus Humano en cuerpos de agua pertenecientes a varios sitios de la ciudad de Barros Blancos. Fueron positivas 22/48 muestras pertenecientes a los tres muestreos realizados.
- No se encontró una correspondencia entre las detecciones virales y los resultados bacteriológicos reportados para los mismos cuerpos de aguas afirmando que no existe una correlación exacta entre los niveles de contaminación bacteriana.
- La cantidad de detecciones y a su vez la cantidad de copias genómicas en las muestras evidencian una disminución de ambas en los meses más cálidos y con picos en temperaturas más bajas.
- Se encontró un sitio donde las muestras de agua además de ser positivas para HAdV en los tres muestreos, se encontraron otros virus como lo son PBV, NV y HEV

- Sería interesante realizar una amplificación de una secuencia de mayor tamaño y a su vez de una región informativa desde el punto de vista filogenético, así poder realizar un análisis de las secuencias obtenidas.
- Sería adecuado sumar etapas de muestreo para ver cuán significativo a nivel estadístico son los resultados descritos en esta tesis .
- Estos datos serían de gran aporte si se realizara un estudio similar con muestras clínicas de la ciudad de Barros Blancos.
- Se podría realizar una infección de células Hep-2 con los concentrados de las aguas para determinar si el genoma viral que se ha detectado se corresponde o no dentro de partículas infectivas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Alberti, A.** Detección molecular y variabilidad genética de Norovirus en pacientes y en aguas residuales del Uruguay. Tesis de maestría, 2012. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay
- Algorta, G. et al.** Virus Respiratorios, in Temas de Bacteriología y Virología Médica, D.d.B.y.V.-I.d. Higiene, Editor. 2008, Oficina del Libro FEFMUR. Montevideo, Uruguay.519-521
- Allard, A. et al.** Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. Journal of Clinical Microbiology 1990. 28. 2659–2667.
- Anthony, C. et al.** Molecular Epidemiology of Norovirus in Outbreaks of Gastroenteritis in Southwest Germany from 2001 to 2004. Journal of clinical microbiology, Apr. 2006, 1262–1267
- Aparicio, O. et al.** Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. J. Virol. 2006, 80, 1376–1384.
- Barrios, P. et al.** Infecciones intrahospitalarias por adenovirus en niños asistidos en el Centro Hospitalario Pereira Rossell, 2001-2006. 2009. Rev Med Urug.
- Bartram, J. et al.** Focusing on improved water and sanitation for health. 2005 Lancet 365(9461).810–812

**Biasiotto, R. et al.** Regulation of Human Adenovirus Alternative RNA Splicing by the Adenoviral L4-33K and L4-22K Proteins. Ed. Akila Mayeda. International Journal of Molecular Sciences 16.2 2015. 2893–2912.

**Bofill-Mas, S. et al.** Documenting the Epidemiologic Patterns of Polyomaviruses in Human Populations by Studying Their Presence in Urban Sewage. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1), 238–245.

**Bofill-Mas, S. et al.** Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. Appl Environ Microbiol 2006 72, 7894–7896.

**Bolón, R. et al.** Detección y cuantificación de Adenovirus Humano en el arroyo Malvin Norte. 2013 PAIE-CSIC.

**Bolón, R. et al.** Detección de virus entéricos en la cañada de Malvin. 2012 Curso de Introducción a la biología II.

**Bonilla, J. et al.** Quantification of Protozoa and Viruses from Small Water Volumes. Ed. Samuel Dorevitch. International Journal of Environmental Research and Public Health 12.7, 2015 7118–7132.

**Choi, S. et al.** Real-time PCR quantification of human adenoviruses in Urban River syndicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol 2005, 71.7426–7433

**Christensen, J.B et al.** Presence of the adenovirus IVa2 protein at a single vertex of the mature virion. J. Virol. 2008, 82, 9086–9093.

**CEUTA, UdelaR, IM.** Diagnóstico socioambiental orientado al estudio de las parasitosis intestinales y zoonosis. una experiencia de investigación

participativa en un contexto de alta vulnerabilidad social en Ciudad Barros Blancos, Canelones, Uruguay. 2013. CEUTA, Montevideo.

**Corsi, S.R. et al.** Human and Bovine Viruses and Bacteria at Three Great Lakes Beaches. Environmental Variable Associations and Health Risk. *Environmental science & technology*, 2015, vol. 50, no 2, p. 987-995.

**Coughlan, L. et al.** Tropism-Modification Strategies for Targeted Gene Delivery Using Adenoviral Vectors. *Viruses*. 2010.2 (10).2290-2355.

**Dalmas, S. et al.** Infección respiratoria aguda baja por adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años. *Arch Pediatr Urug*, 2003. 74(1).15-21.

**Davison, A.J. et al.** Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 2003, 84, 2895–2908.

**de Abreu, Correa, A. et al.** Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78, 6450–6457

**Echavarria, M. et al.** Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21(4). 704-715.

**Echavarria, M. et al.** Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* 2001. 358. 384–85

**Echavarria, M. et al.** PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Clinical Microbiology* 1998. 36. 3323–3326

**Enriquez, C.E. et al.** Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Res.* 2012. 29, 2548–2553.

**Erdman, D.D. et al.** Molecular Epidemiology of Adenovirus Type 7 in the United States, 1966–2000. *Emerging Infectious Diseases*. 2002.8 (3).269-277.

**Frabasile, S.et al.** Genotyping of Uruguayan Human adenovirus isolates collected between 1994 and 1998. *Acta Virol*, 2005. 49(2).129-132.

**Ferguson, C. et al.** Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2003, 33 (3), 299–361

**Filho, E.P. et al.** Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol* 2007. 56(Pt 3).313–319

**Flint, J.** Organization of the adenoviral genome. In *Adenoviruses. Basic Biology to Gene Therapy*. Seth, P., Ed. R.G. Landes Company. Austin, TX, USA, 1999. 17–30.

**Fong, T.T. et al.** Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments, health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. 69(2).357-71.

**Fox, J.P. et al.** The virus watch program. a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections. virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. *Am J Epidemiol*, 1969. 89(1).25-50.

**Gall, A. et al.** "Waterborne Viruses. A Barrier to Safe Drinking Water." Ed. Katherine R. Spindler. 2015. PLoS Pathogens 11.6.

**Garnett, C.T. et al.** Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002.76(21).10608–10616

**Gerber, S.I et al.** Outbreak of adenovirus genome type 7d2 infection in a pediatric chronic-care facility and tertiary-care hospital. *Clin Infect Dis* 2001.32 (5).694–700

**Gillman, L.** Virus entéricos en aguas de uso recreacional en un contexto de escasa cobertura de saneamiento en Barros Blancos, Canelones, Uruguay. Tesis de maestría, 2016. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay

**Goncalves, G. et al.** Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. *Epidemiol Infect* 2010 Dec 15.1–4

**Gray, G.C.,** Adenovirus vaccines. Section two Licensed vaccines, sexta edición. 2012

**Hanusz, N.** Detección de Adenovirus respiratorios y análisis de su circulación durante el año 2008 en Montevideo. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR. 2011.

**Heim, A. et al.** Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J. Med. Virol.* 2003, 70. 228–239.

**Hernroth, B. E. et al,** Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus*

edulis. the First Scandinavian Report . Applied and Environmental Microbiology, Sept 2002.4523–4533.

**Hilleman, M. R. et al.** Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. 1954. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85.183–188.

**Horwitz, M.S. et al.** Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. J. Gene Med. 2004, 6 (Suppl. S1), S172–S183.

**Houng, H.S. et al.** Genome sequences of human adenovirus 14 isolates from mild respiratory cases and a fatal pneumonia, isolated during 2006–2007 epidemics in North America. Respir Res 2010.11.116

**Huang, M.L. et al.** Development of multiplexed realtime quantitative polymerase chain reaction assay for detecting human adenoviruses. Diagn Microbiol Infect Dis 2008.62, 263–271.

**Huang, Z.M. et al.** Prevalence, quantification, and typing of human adenoviruses detected in river water in Taiwan. Environ Sci Pollut Res Int. 2014.

**Hundesha, A. et al.** Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. J Virol Methods. 2009 Jun.158 (1-2).130-5.

**Knipe, D.M., et al.,** Fields -Virology. Sixth edition 2013, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA

**Kajon, A.E. et al.** Molecular epidemiology of adenoviruses associated with acute lower respiratory disease of children in Buenos Aires, Argentina (1984–1988). *J Med Virol* 1992.36(4).292–297

**Kajon, A.E. et al.** Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *J Infect Dis* 2010. 202(1).93–103

**Lee, J. et al.** Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991–2007). *J Med Virol* 2010.82(4).624–631

**Lekana-Douki, S.E. et al.** Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. 2015. *International Journal of Infectious Diseases*.

**Li, Q.G. et al.** Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing. *J Med Virol* 1996.49(3).170–177

**Li Q.G. et al.** Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. *J Virol* 1986. 60(1).331–335

**Lin, K. et al.** A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan. the reemergence of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol*. 2004. 73, 274–279.

**Lion, T. et al.** Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul. 27(3). 441–462.

**Louie, J.K. et al.** Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14. a new respiratory threat? *Clin Infect Dis* 2008.46(3).421–425

**Mackay, I. et al.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 2002. 30(6), 1292–1305.

**Madisch, I. et al.** A Molecular identification of adenovirus sequences. a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol* 2006.78(9).1210–1217

**Madisch, I. et al.** Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. *Journal of Virology*, Dec. 2005,15265–15276.

**Mandell, G. et al.** *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth ed. Philadelphia, PA. Elsevier Churchill Livingstone. 2005.1835–1841

**Mattner, F. et al.** An adenovirus type F41 outbreak in a pediatric bone marrow transplant unit. analysis of clinical impact and preventive strategies. *Pediatr Infect Dis J* 2008.27(5).419–424

**Mehnert, D.U. et al.** Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993.59 (1).140-143.

**Metcalf, T.G. et al.** Environmental virology. from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 1995, 49, p.461-87

**Mirazo, S. et al.** Relevamiento, identificación y caracterización molecular del virus de la hepatitis E (HEV) en aguas residuales y recreacionales en

Montevideo y Canelones. –2013. Proyecto de investigación Aplicada Fondo Maria Viñas - Jóvenes Investigadores. FMV\_3\_2013\_1\_100843.

**Miagostovich, M.P. et al.** Molecular detection and characterization of Gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(2).375-82.

**Miagostovich, M.P. et al.** Assessment of water quality in a border region between the Atlantic forest and an urbanised area in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Environ Virol.* 2014 Jun.6(2).110-5.

**Moura, P.O. et al.** Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 2007, vol. 79, no2,174-181.

**Naciones Unidas.** Asamblea General, El derecho humano al agua y el saneamiento., vol. 660. Paris, 2010, pp. 1–3.

**Nemerow, G.R. et al.** Insights into Adenovirus Host Cell Interactions from Structural Studies. *Virology* 384.2 2009. 380–388.

**O'Malley, R.P. et al.** A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI. *Cell* 1986, 44, 391–400

**Ogorzaly, L. et al.** Development of a quantitative immunocapture real-time PCR assay for detecting structurally intact adenoviral particles in water. *Journal of Virological Methods*, 2013, vol. 194, no 1,235-241.

**Piedra, P.A. et al.** Incidence and prevalence of neutralizing antibodies to the common adenoviruses in children

**Pina, Sonia et al.** "Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses." *Applied and Environmental Microbiology* 64.9,1998: 3376–3382.

**Poma, H.R. et al.** Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Science of the Total Environment*, 2012. 433.98-109

**Pring-Akerblom, P et al.** Type- and group-specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. *Research in Virology* 1994. 145. 25–35.

with cystic fibrosis. implication for gene therapy with adenovirus vectors. *Pediatrics* 1998.101(6).1013–1019

**Pusch, D. et al.** Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge by cell culture and real-time RT-PCR using paramagnetic capturing. 2005 Sep.3 (3).313-240

**Qi, H.M. et al.** Molecular epidemiology of human adenovirus diarrhea among infants and young children in Lanzhou from July 2005 to June 2008. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2009 .47, 922–925.

**Rames, E. et al.** Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.* 2016 Jun 1.96.308-26.

**Robinson CM et al.** Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep.* 2013;3:1812

**Rodrigues, M.T. et al.** Human adenovirus spread, rainfalls, and the occurrence of gastroenteritis cases in a Brazilian basin. *Environ Monit Assess.* 2015 Nov.187 (11).720

**Rodríguez, C. et al.** Infección por Virus Sincitial respiratorio y por adenovirus en una población de niños colombianos menores de 3 años hospitalizados por infección respiratoria aguda baja. *Rev.Medica.Sanitas*,2013  
16 (2). 16-24

**Rowe, W.P. et al.** Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953. 84. 570–573

**Saha, B.et al.**The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion. *Viruses* 6.9 2014. 3563–3583.

**Salas-Chaves, P. et al.** Variación estacional de infecciones respiratorias virales en niños hospitalizados. *Revista mexicana de pediatría* .Vol. 72, Núm. 1 Ene.-Feb. 2005 pp 5-8

**Sauerbrei, A. et al.** Testing thermal resistance of viruses. 2009. *Arch Virol* 154, 115–119.

**Setegn, S.G. et al.** Sustainability of Integrated Water Resources Management, cap.15. 2015. Springer International Publishing Switzerland.

**Silva, H.D. et al.** Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker? *Food Environ.* 2011.3, 138–140.

**Slatter, M.A. et al.** Adenovirus type F subtype 41 causing disseminated disease following bone marrow transplantation for immunodeficiency. *J Clin Microbiol* 2005.43(3).1462–1464

**Stephen, B. et al.** Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology*, 2007, vol. 18, no 1, 27-35.

**Takiff, H.E. et al.** Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet* 1981. 832–834.

**Tani, N. et al.** Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in Urban Riverwater. *Microbiol Immunol.* 1995, 39.577–580

**Tao, CW. et al.** Seasonal difference of human adenoviruses in a subtropical river basin based on 1-year monthly survey. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, vol. 23, no 3, 2928-2936

**Verheyen, J. et al.** Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinkingwater sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75, 2798–2801.

**Victoria, M. et al.** Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.* 2014 Jun.6 (2).116-24.

**Vieira, CB. et al.** Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012. 107(6).778-784.

**Villa Bajo, L.** Incidencia e importancia clínica de las infecciones respiratorias virales en una población infantil. Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, España. 2009. Tesis.

**Weitzman, M.D. et al.** Function of adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front. Biosci.* 2005, 10, 1106-1117.

**Wong, C.M. et al.** The Role of Chromatin in Adenoviral Vector Function

Viruses. 2013 Jun. 5(6). 1500–1515.

**Wu, E. et al.** Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol*, 2003. 77(13).7225-35.

**Wyer, M.D. et al.** Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water Res.* 2012 46, 4130–4141.

**Wyn-Jones, A.P., et.al.** Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. 2011 *Water Res.* 45, 1025–1038.

**Zheng, X. et al.** Identification of adenoviruses in specimens from high-risk pediatric stem cell transplant recipients and controls. *J Clin Microbiol* 2008. 46(1).317–320

## 8. AGRADDECIMIENTOS

---

Ha llegado el momento de agradecer a todas esas personas que estuvieron acompañándome en este largo trayecto y que aportaron a mi formación como persona y como profesional. Cada uno de ellos formó parte de las varias etapas que me tocó atravesar, ninguna menos importante en el correr de estos años.

Quiero agradecer a mi gran amiga de la vida, Elo porque a pesar de tener idas y venidas siempre estuviste para mi en todos estos años preocupándote y deseándome éxito en cada examen o etapa de la carrera.

Luego a mi gran amiga de facultad, May, la primera y la que hasta el día de hoy conservo, gracias por tus risas, por tu aguante, por ser mi dúo dinámico en esos primeros años y estudiar hasta que las velas ardan a la par.

A Seba, mi gran amigo, el que conoce muchas cosas de mi que nadie más, y me entiende a pesar de mis locuras. El que piensa en mi de acá a Australia y se que haría todo por mi bien.

A las chicas que me hicieron un lugarcito en su grupo y en su corazón, que hoy en día son mucho más que mis compañeras, sino que mis mejores amigas, me alegra inmensamente haberlas encontrado, y no quiero perderlas nunca queridas GLENDAS. Gracias por TODO lo que ya saben.

Ahora a toda la Sección Virología que hicieron los días de trabajo más divertidos y siempre estuvieron para ayudar ya sea con una mano en el

laboratorio o con un consejo, o una respuesta. Le agradezco a mi tutora Mabel Berois por tomarse su tiempo y dedicación a la corrección de mi tesina y confiar en mi para realizar este trabajo. Luego a Juan Arbiza por abrirme las puertas de su laboratorio y por hacer que el ambiente siempre pudiera ser el mejor, con sus chistes y buena onda.

A Nati y a Santi por siempre estar para darme una mano y también ser dos oídos para contarles mis cosas, y siempre que pudieron me aconsejaron de la mejor forma.

A los chicos del CIN Alvaro y Martin por siempre molestarse para estar cuando usaba el equipo de Real Time, y ayudarme en cualquier cosa que necesitara.

A todas las pequeñas/os del laboratorio, y en especial a 3 personitas superespeciales; Dario, Otto y Luma, sin quienes mi pasantía no hubiera sido ni un cuarto de lo divertida q fue, quienes SIEMPRE estuvieron, desde los mates, compartir mesada, charlas en cultivo, salidas, almuerzos y miles de chats. Los adoro VLPs.

Finalmente le agradezco a la persona que además de darme la vida, fue la que hizo que esta vida fuera la mejor que pudiese haber tenido, porque me diste todas las herramientas, porque no sabría cómo se podría ser mejor madre que vos. Sos mi ejemplo a seguir, y gracias por siempre creer en mi, a pesar de todo lo que pasamos siempre estuviste al firme. Este título de lo dedico a vos y quiero que lo sientas como tuyo, sin vos nada de esto sería posible.

No me olvidé de mi segunda madre, nunca me olvido de vos. Te extraño y se que de alguna forma este mensaje te va a llegar, no alcanzaste a ver este

momento pero te puedo asegurar que tu apoyo lo sentí hasta el final. Gracias  
tai.



