



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)

ÁREA BIOLOGÍA. SUB-ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE ASTROVIRUS CLÁSICOS Y EMERGENTES
EN AGUAS RESIDUALES DE URUGUAY

Estudiante: ANDRÉS LIZASOAIN CUELHO

Tutor: MATIAS VICTORIA MONTERO

Co-Tutora: MARIZE PEREIRA MIAGOSTOVICH

Marzo de 2015, Salto-Uruguay

A la memoria de mi tía Adiz,
persiste su sonrisa en nuestros corazones.

*“El mundo era tan reciente, que muchas cosas carecían de nombre, y para mencionarlas
había que señalarlas con el dedo”.*

Gabriel García Márquez, “Cien Años de Soledad”, 1967.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi país, por permitirme alcanzar una formación de posgrado en el área en la cual me gradué y por ofrecerme las condiciones necesarias para desarrollar un proyecto de investigación mediante mi inserción en un grupo de investigación en virología de la Universidad de la República. Este grupo, encabezado por el Dr. Rodney Colina me ha transmitido de manera generosa, el entusiasmo por el trabajo riguroso y la pasión por el estudio de la diversidad de los virus ARN, su diseminación en el ambiente y las técnicas moleculares para abordarlos. Fernando López, María José Benítez, Leticia Maya, Luciana Burutarán y Matías Castells, han sido maestros y compañeros insuperables.

Agradezco al Dr. Colina por haberme brindado la libertad necesaria para pensar, crear, experimentar, discutir y equivocarme varias veces, condición sine qua non para aprender. Agradezco su confianza, el trato horizontal y las palabras sinceras en los momentos más importantes de mi vida en estos dos últimos años.

Agradezco también a mi tutor, Dr. Matías Victoria, investigador y docente que con su disciplina, experiencia y dedicación ha incidido de manera notable en mis logros profesionales desde hace ya cuatro años. Así también agradezco a mi co-tutora, Dra. Marize Pereira Miagostovich, que me enseñó a cuidar de las células cómo si cuidara de una mujer y me aventuró en el mundo de la escritura de artículos científicos con cariño y paciencia.

Durante mi formación de posgrado, he realizado cursos de PEDECIBA que me han otorgado herramientas, habilidades y conocimientos imprescindibles en mi labor de investigador, a los docentes y coordinadores de dichos cursos un inmenso agradecimiento

por permitir mi participación en los mismos. Así también debo agradecer a las instituciones extranjeras que me acogieron por breves períodos de tiempo para la realización de cursos de excelentísimo nivel: al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Realizo un especial agradecimiento al Dr. José Paulo Gagliardi Leite, coordinador del proyecto Epidemiología Molecular y Monitoreo Ambiental de Gastroenteritis de Origen Viral, del programa CAPES-UDELAR, e investigador titular del Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental (LVCA) del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro. Su experiencia, dedicación, bondad y alegría lo convirtieron en un ejemplo cercano a seguir.

También agradezco al Dr. Tulio Fumian, al Dr. Eduardo Volotao, a la Dra. Mariela Gómez, a la Dra. Ana Pinto, a la Dra. Aline Zanatta, a la Sra. Francisca Alves, a la Dra. Mónica Simoes, a la MSc. Juliana Andrade, a la MSc. María da Penha Xavier, a la Dra. Silvana Portes, al Lic. Matheus Assis, a la Dra. Carolina Ganime, a la Dra. Adriana de Abreu, a la Dra. Marzia Terezinha Baroni, a la Dra. Tatiana Rose, a la Dra. Tatiana Castro, a la Lic. Janaína Rodríguez, a la Dra. Marcelle Figueira y al Dr. Jesús Rodríguez Díaz, quienes desde el Instituto Oswaldo Cruz de la Fundación Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, estuvieron aconsejándome, ayudándome, asistiéndome, acompañándome, discutiendo mis resultados y me hicieron sentir un carioca más durante mi estadía de tres meses en el LVCA. Hermosos recuerdos tengo con ellos y deseo un vínculo de por vida. Este agradecimiento va de la mano con un sincero agradecimiento hacia CAPES-Brasil, desde donde me otorgaron una

beca de estudiante en modalidad maestría sándwich durante estos tres meses apostando a la formación de recursos humanos para la investigación en nuestra región.

También agradezco al Dr. Gonzalo Bello del Laboratorio de AIDS e Inmunología Molecular del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro y al Dr. Héctor Romero del Laboratorio de Evolución y Organización del Genoma de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, por los comentarios y sugerencias realizadas para darle robustez a los resultados del análisis de coalescencia presentado en esta tesis.

Durante los dos años que llevó realizar mis estudios de posgrado, he contado con una financiación mediante una beca de Posgrado Nacional (POS_NAC_2012_1_8961) otorgada por la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII). Agradezco este apoyo y celebro la existencia de este instrumento para las futuras generaciones. También agradezco al PEDECIBA y a la Universidad de la República, por acogerme en el Programa de Posgrado y permitir que me realizara personal y profesionalmente.

En Regional Norte, existe un cúmulo de soñadores empedernidos, investigadores que han ido llegando con sus líneas de investigación bajo el brazo, para quedarse y ampliarlas, o cambiarlas... otros ya estaban trabajando en el norte desde hacía años cuando se me ocurrió llegar. Estos investigadores comparten, discuten, preguntan, irrumpen en el laboratorio en medio de un experimento y lo hacen más interesante. Muchos de ellos no tienen nada que ver con mi línea de investigación, pero no podría trabajar sin ellos: Dr. Julio Da Luz, MSc Ana Soler, Dr. Luis Carvalho, MSc. Oscar Irabuena, Ing. Pablo Gamazo, Lic. Sonia Hornos, Dr. Alejandro Noboa, Dr. José Vieitez, Dr. Manuel Venzal. Mi agradecimiento a todos ellos

por ser parte de este proceso tan lindo y complicado de descentralización de la investigación en nuestro país.

De la mano, va el agradecimiento a la Comisión Coordinadora del Interior de la Universidad de la República, responsable del Programa Polos de Desarrollo Universitario, en el cual se enmarca el Laboratorio de Virología Molecular de la Regional Norte, en el cual realicé mis estudios.

Agradezco a la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE) quien coparticipó en el proyecto CSIC I+D 2010 en el cual fueron estudiadas las muestras de agua residual de las plantas de tratamiento localizadas en Melo y Treinta y Tres.

Especialmente agradezco al Dr. Juan Arbiza y a la Dra. Mabel Berois (Sección Virología Facultad de Ciencias), a la Dra. Viviana Mbayed (Cátedra de Virología, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad de Buenos Aires) y a la Dra. Claudia Piccini (Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable) por aceptar ser parte del tribunal evaluador de esta tesis.

Nada de lo que hago tiene sentido si no es compartido con mi familia y amigos, a ellos un profundo agradecimiento por apoyarme de manera constante, por brindarme la posibilidad de crecer dedicándome a lo que me apasiona y por entenderme en esta etapa de la vida en la cual prácticamente la dedicación al estudio es total.

Especialmente en este agradecimiento, quiero abrazar a Sofía, porque su comprensión, cariño, paciencia, dulzura, confianza y amor, han hecho de la distancia, las horas sin vernos,

y la incertidumbre de tener a su lado un hombre biólogo, mera anécdota en un mundo hermoso que hemos construido juntos, en el cual seguimos soñando y esforzándonos para que crezca. Esta tesis ha sido un esfuerzo compartido con ella, no podía ser de otra manera.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Virus entéricos y su transmisión hídrica | 1 |
| 1.2. ASTROVIRUS | 4 |
| 1.2.1. Historia | 4 |
| 1.2.2. Clasificación | 5 |
| 1.2.3. Estructura del genoma y sus proteínas | 8 |
| 1.2.4. Estructura y ensamble del virión | 12 |
| 1.2.5. Ciclo replicativo | 13 |
| 1.2.6. Patogénesis y manifestaciones clínicas | 17 |
| 1.2.7. Transmisión y Epidemiología | 18 |
| 1.2.8. Epidemiología molecular | 20 |
| 1.2.9. Evolución molecular | 21 |
| 1.2.10. Prevención y Tratamiento | 24 |
| 1.2.11. Diagnóstico | 25 |
| 1.2.12. Presencia de HAstV en aguas ambientales | 26 |
| 2. RELEVANCIA | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| 3.1. Objetivo general | 31 |
| 3.2. Objetivos específicos | 31 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 4.1. Diseño y caracterización de la colecta de muestras | 32 |
| 4.2. Concentración viral | 34 |
| 4.3. Control interno | 35 |
| 4.4. Extracción del ácido nucleico y síntesis del ADN copia (ADNc) | 35 |
| 4.5. Detección del control interno (fago PP7) | 36 |
| 4.6. Detección por RT-PCR de HAstV clásicos | 36 |
| 4.7. Detección de HAstV emergentes por RT-PCR | 37 |
| 4.8. Detección de HAstV MLB-1 mediante RT-PCR | 37 |
| 4.9. Cuantificación de HAstV clásicos mediante PCR en tiempo real | 37 |
| 4.10. Electroforesis y visualización de los productos de PCR | 38 |
| 4.11. Purificación y secuenciación de los productos de PCR | 39 |
| 4.12. Análisis Bioinformático de las secuencias de ADN de Astrovirus | 39 |
| 4.12.1. Edición, alineamiento de secuencias y construcción de matrices de identidad | 39 |
| 4.12.2. Análisis filogenéticos y de coalescencia | 40 |
| 5. RESULTADOS | 42 |
| 5.1. Monitoreo y cuantificación de HAstV clásicos en las ciudades localizadas en la región oeste de Uruguay | 42 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. Monitoreo y cuantificación de HAstV clásicos en las PTAR de Melo y Treinta y Tres | 43 |
| 5.3. Dinámica de los HAstV clásicos durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales en las PTAR de Melo y Treinta y Tres | 45 |
| 5.4. Monitoreo de astrovirus emergentes en las PTAR de Melo y Treinta y Tres mediante amplificación del ORF1b | 47 |
| 5.5. Caracterización molecular de los astrovirus humanos (clásicos y emergentes) y caninos de Uruguay | 48 |
| 5.6. Patrones temporales y geográficos de los HAstV clásicos en Uruguay | 61 |
| 5.7. Determinación de la tasa de evolución y la edad del ancestro común más reciente de los HAstV MLB-1 | 64 |
| 6. DISCUSIÓN | 67 |
| 6.1. Monitoreo y dinámica de los HAstV clásicos en las aguas residuales del Uruguay | 67 |
| 6.2. Caracterización molecular de HAstV clásicos en Uruguay | 73 |
| 6.3. Detección y caracterización molecular de HAstV emergentes y astrovirus caninos en Uruguay | 78 |
| 6.3.1. Detección y caracterización molecular de HAstV MLB-1 | 78 |
| 6.3.2. Detección y caracterización molecular de astrovirus caninos | 82 |
| 6.3.3. Coalescencia de HAstV MLB-1 | 84 |
| 7. CONCLUSIONES | 88 |
| 8. PERSPECTIVAS | 89 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 90 |
| 10. ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS | 105 |
| ANEXOS | 106 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de clasificación de los astrovirus | 7 |
| Figura 2. Organización del genoma y productos proteicos de astrovirus humano | 10 |
| Figura 3. Reconstrucción tridimensional de astrovirus humanos obtenida mediante criomicroscopía electrónica | 13 |
| Figura 4. Replicación de astrovirus humano. | 16 |
| Figura 5. Localización de las ciudades uruguayas donde se colectaron las muestras de agua residual | 34 |
| Figura 6. Carga viral de astrovirus humanos clásicos en aguas residuales vertidas al Río Uruguay en la región oeste de Uruguay | 43 |
| Figura 7. Distribución de astrovirus humanos clásicos en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres | 47 |
| Figura 8. Análisis filogenético de las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos | 52 |
| Figura 9. Identidad nucleotídica y aminoacídica entre las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos | 53 |
| Figura 10. Cambios aminoacídicos resultantes de sustituciones no sinónimas en las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos | 54 |
| Figura 11. Análisis filogenético de la región parcial del ORF1b de astrovirus amplificado a partir de muestras de agua residual de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres | 56 |
| Figura 12. Análisis filogenético de la región parcial del ORF2 de la cepa MLB1 detectada en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo. | 57 |
| Figura 13. Patrón geográfico de detección para los genotipos de astrovirus humanos clásicos caracterizados en este estudio a partir de muestras de agua residual en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Melo y Treinta y Tres | 62 |
| Figura 14. Distribución temporal de astrovirus humanos clásicos en aguas residuales de Uruguay | 63 |
| Figura 15. Análisis filogenético reconstruido a partir de un segmento del ORF2 de astrovirus humanos MLB-1 con coalescencia estimada en el programa Beast V.1.8.0. | 66 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de la familia <i>Astroviridae</i> según el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) | 8 |
| Tabla 2. Resultados del monitoreo cualitativo para la detección de astrovirus clásicos en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Melo y Treinta y Tres en el periodo Setiembre 2011 – Abril 2013 | 44 |
| Tabla 3. Distribución de astrovirus humanos clásicos en cada una de las etapas del tratamiento realizado en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres | 46 |
| Tabla 4. Resultados del monitoreo cualitativo para la detección de astrovirus emergentes en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Melo y Treinta y Tres en el periodo Setiembre 2011 – Abril 2013 | 48 |
| Tabla 5. Grupos de cepas uruguayas idénticas de astrovirus humanos clásicos | 49 |
| Tabla 6. Distribución del número de casos positivos para cada genotipo de astrovirus humanos clásicos caracterizados durante los monitoreos de acuerdo a la ciudad de colecta | 50 |
| Tabla 7. Porcentaje de identidad nucleotídica en el fragmento de 362 pb del ORF2 de cepas de astrovirus humanos MLB-1 | 58 |
| Tabla 8. Porcentaje de identidad nucleotídica en el ORF2 completo de cepas de astrovirus humanos MLB-1 | 59 |
| Tabla 9. Porcentaje de identidad nucleotídica en el genoma completo de cepas de astrovirus humanos MLB-1 | 59 |
| Tabla 10. Polimorfismos de nucleótidos conservados en el segmento del ORF2 que diferencian entre los dos grupos de cepas de astrovirus humanos MLB-1 | 60 |
| Tabla 11. Sitios informativos en la secuencia de aminoácidos de la cápside de astrovirus humanos MLB-1 | 61 |
| Tabla 12. Tasas de evolución y edad del ancestro común más reciente de acuerdo a los modelos demográficos para los HAstV-MLB1a y MLB1b | 65 |

RESUMEN

Los astrovirus (AstV) son virus entéricos que causan casos de gastroenteritis aguda en diferentes mamíferos entre los cuales se encuentra el ser humano. Estos virus presentan transmisión hídrica por lo cual es importante su estudio en diferentes matrices de aguas ambientales. El objetivo de este estudio fue detectar, cuantificar y caracterizar los AstV humanos (HAstV) circulantes en Uruguay en dos grupos de muestras de aguas residuales. El primer muestreo fue realizado de manera quincenal desde Marzo de 2011 a Febrero de 2012 en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos, totalizando 96 muestras. Dichas ciudades vierten las aguas residuales en el Río Uruguay, sin tratamiento (con excepción de Bella Unión donde existe una laguna de decantación). El segundo muestreo se realizó desde Setiembre 2011 a Abril de 2013 de manera bimensual en dos plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) de Melo y Treinta y Tres, colectándose muestras de afluente y de efluentes terciarios pre y post desinfección con luz ultravioleta, totalizando 57 muestras. Los virus fueron concentrados por ultracentrifugación y detectados y cuantificados por PCR cualitativa y cuantitativa, respectivamente. Finalmente se realizó la secuenciación de los AstV detectados para efectuar los estudios filogenéticos y de coalescencia. Fueron evidenciadas concentraciones de HAstV en el rango de $3,2E+3$ a $3,2E+6$ copias genómicas por litro en las muestras de agua residual en las ciudades que vierten las mismas en el Río Uruguay. Fue detectada una disminución en la frecuencia de muestras positivas para HAstV desde el afluente hasta el efluente final del 100% (4/4) y del 75% (6/8), así como un descenso en la carga viral promedio desde afluentes hacia efluentes finales de 7 y 2 órdenes logarítmicos en las PTAR de Melo y Treinta y Tres, respectivamente. Se detectó la presencia de los genotipos HAstV-1 (linaje 1a), HAstV-2 (linajes 2c y 2d) y HAstV-5, así como del genotipo emergente MLB-1, para el cual se propuso una circulación mundial bajo la forma de dos linajes a los cuales se denominó MLB-1a y MLB-1b. La tasa de evolución del genotipo MLB-1 fue estimada en $1,72E-03$ sustituciones por sitio por año y la edad del ancestro común más reciente para la totalidad de cepas reportadas hasta el momento se estimó en el año de 1970. En este estudio se confirmó una frecuente y elevada concentración de HAstV en aguas residuales en las ciudades localizadas sobre el Río Uruguay así como también una co-circulación de varios genotipos. También se evidenció el importante rol de las PTAR en la reducción de las concentraciones virales a lo largo del proceso de tratamiento de las aguas residuales que son vertidas a cursos hídricos utilizados para recreación y/o consumo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus entéricos y su transmisión hídrica

Los virus son uno de las agentes etiológicos más importantes en las enfermedades relacionadas al agua. Los denominados virus entéricos, infectan y replican en células del aparato gastrointestinal pudiendo producir diversas enfermedades siendo excretados en altas concentraciones en las heces de los individuos infectados (Bosch et al. 2008). Por ello, se encuentran en altas concentraciones en las aguas residuales y los tratamientos que se realizan para lograr efluentes de calidad por lo general remueven entre un 20 y 80% de la carga viral inicial, permitiendo que una carga viral importante y diversa sea liberada al ambiente durante la descarga del efluente y sea posible su diseminación hacia el agua subterránea, agua de ríos, arroyos, estuarios y mares (La Rosa et al. 2012).

El agua residual contiene una gran diversidad de virus, parte de la misma, desconocida para nosotros (Aw et al. 2014). No obstante, podemos reconocer una gran variedad de virus transmitidos por aguas contaminadas, que causan diversas enfermedades en humanos, incluyendo hepatitis, gastroenteritis, meningitis, fiebre, rash, conjuntivitis, enfermedades respiratorias, enfermedades renales y diabetes (Bosch et al. 2008).

No obstante, los síntomas de gastroenteritis son los más frecuentemente relacionados a los virus entéricos (La Rosa et al. 2012). Billones de casos de gastroenteritis ocurren anualmente a nivel mundial, siendo la diarrea responsable de la muerte de unos 800 mil niños menores de cinco años de edad (Liu et al. 2012). Se calcula que una parte importante de las causas de estos casos es atribuible a un suministro de agua de mala calidad, instalaciones de saneamiento o prácticas de higiene precarias (W.H.O., 2004).

El estudio de virus en matrices acuáticas comenzó a gestarse a partir de un brote de hepatitis declarado en Nueva Deli entre diciembre de 1955 y enero de 1956. En ese entonces, el agua del río Junma era tratada con aluminio y cloro para abastecer con agua potable a la población, no obstante, unas semanas antes de declarado el brote, el río fue contaminado con agua residual. Esa fue posiblemente la causa de los 30 mil casos de hepatitis ocurridos entre la población (Bosch, 1998).

La virología ambiental ha contribuido al conocimiento de la incidencia y comportamiento de los virus en las distintas matrices acuáticas, a determinar el riesgo de infección debido a la presencia de los virus en el agua, a evaluar la eficiencia de los procesos de tratamiento y desinfección, así como a realizar monitoreos rutinarios de calidad de agua mediante el empleo de directrices. De esta manera ha contribuido al conocimiento del impacto de los virus de transmisión hídrica en la salud pública. Además, mediante esta disciplina, al identificar las distintas estirpes virales que circulan en el ambiente es posible estudiar la epidemiología de estos virus de transmisión hídrica y obtener una aproximación de las estirpes que circulan en la comunidad, incluyendo los virus que causan tanto infecciones sintomáticas como asintomáticas (Bosch et al. 2008).

El alto grado de persistencia de los virus entéricos en el ambiente acuático nos lleva a prestar especial atención al tratamiento que reciben las aguas residuales domiciliarias, ya que éstas transportan por el sistema de saneamiento aquellos virus que se excretan en las heces que eventualmente pueden ser volcados en cuerpos de aguas utilizados para el consumo, pesca, riego o recreación humana (Bosch et al. 2008). Procesos tales como lodos activados, lagunas de oxidación, tratamientos con carbón activado, filtración y cloración remueven gran parte de los virus presentes en las aguas residuales, aunque en muchas ocasiones, una carga viral

significativa permanece en los efluentes pudiendo contaminar arroyos, ríos y otros cuerpos de agua (Cloette et al. 1998).

Numerosos estudios a nivel mundial evidencian la resistencia de los virus entéricos a los diversos tratamientos realizados para mejorar la calidad del agua residual previo a su descarga en cursos naturales de agua y se ha demostrado que incluso éstos pueden conservar su capacidad infectiva en los efluentes (Morsy El-Senousy et al. 2007; Schlindwein et al. 2010; Francy et al. 2012; Hata et al. 2013; Kitajima et al. 2014).

Los virus entéricos generalmente están presentes en el agua adsorbidos a partículas sólidas. La remoción física de las partículas por procesos como la coagulación, floculación, sedimentación y filtración, ayuda a la remoción de los virus en los efluentes de aguas residuales (Templeton et al. 2008).

La remoción adicional de los contaminantes biológicos puede ser realizada mediante desinfección con cloro, ozono, ácido paracético o irradiación con luz ultravioleta (UV) (Mezzanotte et al. 2007). La calidad microbiológica del agua generalmente es determinada por la determinación de la concentración de coliformes totales y fecales y eventualmente por bacteriófagos. Sin embargo, existe un consenso mundial con respecto a la ausencia de correlación entre la contaminación bacteriana y viral presente en diferentes matrices acuáticas (Bosch et al. 1998; Pusch et al. 2005; Payment y Locas, 2011; He et al. 2012). La estabilidad y persistencia de los virus entéricos en el ambiente aumenta el riesgo de infección para el ser humano que entra en contacto con aguas contaminadas (ingesta, pesca, recreación, riego en agricultura), o con alimentos que estuvieron en contacto con estas (Fong y Lipp, 2005).

1.2. ASTROVIRUS

1.2.1. Historia

Madeley y Cosgrove (1975) observaron por primera vez mediante microscopía electrónica directa, una partícula viral pequeña, redondeada, que presentaba forma de estrella con 5 ó 6 puntas, de unos 30 nm de diámetro en la materia fecal de niños hospitalizados por diarrea y de brotes de diarrea generados en guarderías. A su vez, Appleton y Higgins (1975) encontraron partículas similares en la materia fecal de niños con diarrea leve y vómitos. Ineludiblemente, debido a su forma, estas partículas fueron denominadas astrovirus (AstV), aunque recién en 1982 se confirmaría que se trataba de un virus diferente a los previamente conocidos *Norwalk like virus* (Caul y Appleton, 1982).

Los experimentos realizados por Lee y Kurtz (1981) fueron trascendentales, ya que lograron aislar astrovirus humanos (HAstV) y realizar pasajes en cultivos primarios de células. Ello posibilitó más tarde, junto a técnicas inmunológicas el reconocimiento de varios serotipos de HAstV (Kurtz y Lee, 1984; Belliot et al. 1997a).

Tan pronto como fueron descubiertos los HAstV, partículas similares fueron identificadas en asociación con gastroenteritis en distintas aves y otros mamíferos. Actualmente, la lista de animales en los cuales se ha reportado la presencia del virus es bien extensa: gatos (Hoshino et al. 1981), vacas (Woode y Bridger, 1978), ciervos (Tzipori et al. 1981), perros (Toffan et al. 2009), ratones (Kjeldsberg y Hem, 1985), ratas (Chu et al. 2010), cerdos (Bridger, 1980), ovejas (Jonassen et al. 2003), visones (Englund et al. 2002), murciélagos (Chu et al. 2008), chitas (Atkins et al. 2009), conejos (Martella et al. 2011), delfines, leones marinos (Rivera et al. 2010), pavos (Koci et al. 2000), pollos (Pantin-Jackwood

et al. 2011), patos (Asplin, 1965), palomas (Zhao et al. 2011), gallinas de guinea (Canelli et al. 2012) y otras aves acuáticas (Chu et al. 2012).

Desde su descubrimiento, las infecciones en humanos producidas por HAstV han sido reportadas en todo el mundo, principalmente en bebés y niños pequeños (Madeley y Cosgrove, 1975; Guix et al. 2002; Victoria et al. 2007; De Grazia et al. 2013), incluso se han postulado como la segunda causa más común de gastroenteritis infantil luego de la infección por rotavirus (Méndez y Arias, 2013).

Recientemente, gracias a distintos estudios utilizando la metodología de metagenómica, se han descubierto nuevos AstV altamente divergentes, capaces de infectar distintas especies de animales, incluyendo al humano y posiblemente causando, en algunos casos, patologías distintas a la diarrea (Finkbeiner et al. 2008; Blomström et al. 2010; Quan et al. 2010; Holtz et al. 2011b; Li et al. 2013).

1.2.2. Clasificación

Los AstV pertenecen a la familia *Astroviridae* que fue creada en 1995 en el sexto reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV). Características distintivas de esta familia son la morfología del virión, la falta de un dominio de ARN-helicasa codificado en el genoma y el uso de un mecanismo de *frameshifting* ribosomal para traducir la ARN polimerasa ARN dependiente (Jiang et al. 1993; Risco et al. 1995).

Esta familia está dividida en dos géneros en función del tipo de hospedero: géneros *Mamastrovirus* y *Avastrovirus*, incluyendo partículas virales capaces de infectar mamíferos o aves, respectivamente (Méndez y Arias, 2013). Los HAstV eran clasificados únicamente en ocho genotipos hasta el 2008 cuando fueron descubiertos AstV emergentes capaces de

infectar a humanos, pero más relacionados genéticamente con AstV de ratas (HAstV MLB), ovejas y visones (HAstV HMO/VA) que con los HAstV clásicos (Finkbeiner et al. 2008; Finkbeiner et al. 2009a, c; Kapoor et al. 2009; Chu et al. 2010; Méndez y Arias, 2013).

Actualmente, el género *Mamastrovirus*, incluye dos genogrupos (figura 1, tabla 1), GI y GII, que incluyen 19 especies virales. Ambos genogrupos incluyen virus de origen humano y animal. Los ocho genotipos clásicos de los HAstV (HAstV-1 a HAstV-8) se encuentran agrupados dentro de la especie viral *Mamastrovirus* 1 del genogrupo 1 del género *Mamastrovirus*. Este genogrupo también incluye a la especie viral *Mamastrovirus* 6 (genotipo HAstV MLB-1). Por otro lado, los genotipos VA/HMO forman las especies virales *Mamastrovirus* 8 y 9, ambas dentro del genogrupo 2. El género *Avastrovirus* se divide en dos genogrupos, GI y GII, que incluyen 2 y 1 especies virales, respectivamente (Bosch et al. 2010).

Recientemente, Phan y colaboradores (2014) propusieron, la inclusión del vigésimo genotipo dentro del género *Mamastrovirus* debido a la detección de un nuevo y divergente AstV en un estudio de metagenómica de un caso inexplicado de diarrea humana.

Aquellas cepas con una diferencia genética a nivel de la proteína de cápside que sea superior a 0,30 son consideradas de diferentes genotipos. Mientras que, en promedio, la distancia media aminoacídica (distancia p) entre dos géneros es de 0,83, las distancias medias dentro del género son de 0,72 y 0,64 para los mamastrovirus y avastrovirus, respectivamente (Bosch et al. 2014).

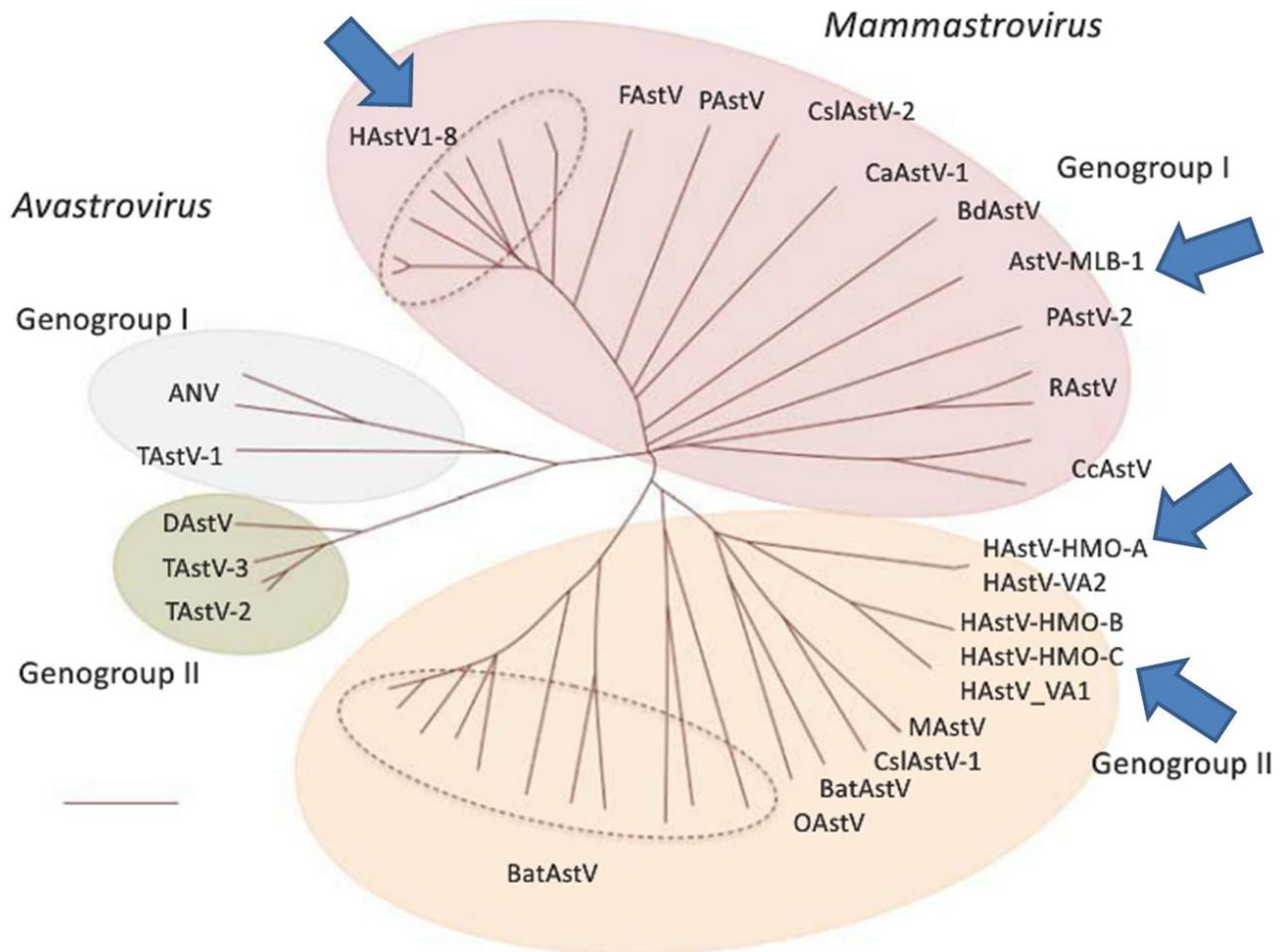


Figura 1. Esquema de clasificación de los astrovirus.

Las flechas azules indican los distintos genotipos capaces de infectar a humanos. ANV: Virus de la Nefritis Aviar, TAstV: Astrovirus de Pavo, DAstV: Astrovirus de Pato, OAstV: Astrovirus Ovino, CslAstV: Astrovirus de León Marino Californiano, MAstV: Astrovirus de Visón, HAstV: Astrovirus Humano, RAstV: Astrovirus de Rata, PAstV: Astrovirus Porcino, BdAstV: Astrovirus de Delfín, CaAstV: Astrovirus Canino, FAstV: Astrovirus Felino, CcAstV: Astrovirus de Ciervo. Adaptado de Méndez y Arias (2013).

Tabla 1. Clasificación de la familia *Astroviridae* según el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV).

| GÉNERO | GENOGRUPO | ESPECIE | HOSPEDERO/S | INCLUYE |
|---------------|-----------|-------------------------|---------------|--------------|
| AVASTROVIRUS | 1 | <i>Avastrovirus 1</i> | Pavos | TAstV |
| | | <i>Avastrovirus 2</i> | Pollos, Pavos | ANV, TAstV |
| | 2 | <i>Avastrovirus 3</i> | Pavos, Patos | DAstV, TAstV |
| MAMASTROVIRUS | 1 | <i>Mamastrovirus 1</i> | Humanos | HAstV-1 a 8 |
| | | <i>Mamastrovirus 2</i> | Felinos | FAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 3</i> | Porcinos | PAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 4</i> | León Marino | CsIAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 5</i> | Caninos | CaAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 6</i> | Humanos | HAstV-MLB1 |
| | | <i>Mamastrovirus 7</i> | Delfín | BdAstV |
| | 2 | <i>Mamastrovirus 8</i> | Humanos | HAstV-VA2 |
| | | <i>Mamastrovirus 9</i> | Humanos | HAstV-VA1 |
| | | <i>Mamastrovirus 10</i> | Visón | MAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 11</i> | León Marino | CsIAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 12</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 13</i> | Ovinos | OAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 14</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 15</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 16</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 17</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 18</i> | Murciélagos | BatAstV |
| | | <i>Mamastrovirus 19</i> | Murciélagos | BatAstV |

ANV: Virus de la Nefritis Aviar, TAstV: Astrovirus de Pavo, DAstV: Astrovirus de Pato, OAstV: Astrovirus Ovino, CsIAstV: Astrovirus de León Marino Californiano, MAstV: Astrovirus de Visón, HAstV: Astrovirus Humano, RAstV: Astrovirus de Rata, PAstV: Astrovirus Porcino, BdAstV: Astrovirus de Delfín, CaAstV: Astrovirus Canino, FAstV: Astrovirus Felino, CcAstV: Astrovirus de Ciervo. Adaptado de Méndez y Arias (2013).

1.2.3. Estructura del genoma y sus proteínas

Los AstV presentan un genoma de simple hebra de ARN de polaridad positiva, cuyo tamaño varía entre 6,17 kb en el caso de HAstV MLB-1 a 7,72 kb en el caso de DAstV-2, excluyendo la cola polyA en el extremo 3' (Finkbeiner et al. 2008; Fu et al. 2009). El genoma viral incluye una región no traducible (UTR) en sus extremos 5' y 3' y tres marcos abiertos

de lectura (ORFs) de longitud variable dependiendo del aislado (figura 2a). Los ORF1a y ORF1b se ubican en ese orden a continuación de la región 5' UTR y codifican proteínas no estructurales relacionadas con la transcripción y replicación del genoma viral. El ORF2 es el tercero a continuación de los anteriores y se encuentra en el extremo 3' precediendo la región 3' UTR. Este ORF codifica para la poliproteína estructural, la cual se expresa desde un ARN subgenómico y es la región más variable del genoma (Méndez y Arias, 2013).

En los HAstV clásicos y en otros *Mamastrovirus*, se ha descrito un cuarto ORF, denominado ORFX, solapando el extremo 5' del ORF2 en el marco de lectura +1. Este ORF podría ser traducido a través de un mecanismo de *leaking scanning* aunque su producto proteico no ha sido confirmado experimentalmente (Firth y Atkins, 2010).

En el extremo 3' del genoma de algunos AstV, se encuentra un elemento secundario altamente conservado denominado motivo *stem-loop II*. Particularmente está presente en los HAstV clásicos, en los VA/HMO, en los AstV de gato, oveja, cerdo y aviares, aunque está conservado parcialmente en el genoma de los HAstV MLB. Dicha estructura también se encuentra en el extremo 3' de los genomas de algunos coronavirus, norovirus y rinovirus, indicando una fuerte selección evolutiva para su conservación. Si bien su función no ha sido determinada, se ha sugerido que podría proveer estabilidad para la estructura secundaria del ARN e interactuar con proteínas virales y celulares durante la función de replicación del genoma (Monceyron et al. 1997; Jonassen et al. 1998; Wang et al. 2001; Robertson et al. 2005).

Otra estructura importante en el genoma de los AstV, la constituye la Señal de Cambio de Marco para el Ribosoma (RFS). Dicha señal se encuentra en la región de solapamiento

del ORF1a con el ORF1b y es de cabal importancia para la traducción de la ARN polimerasa dependiente de ARN, codificada en el ORF1b (Jiang et al. 1993; Marczinke et al. 1994).

Por otro lado, en la región de solapamiento del ORF1b y el ORF2 se encuentra una secuencia altamente conservada que podría ser parte del promotor para la síntesis del ARN subgenómico (Jonassen et al. 2003) la cual además ha sido identificada como un *hot spot* de recombinación (Walter et al. 2001; Strain et al. 2008; Wolfaardt et al. 2011).

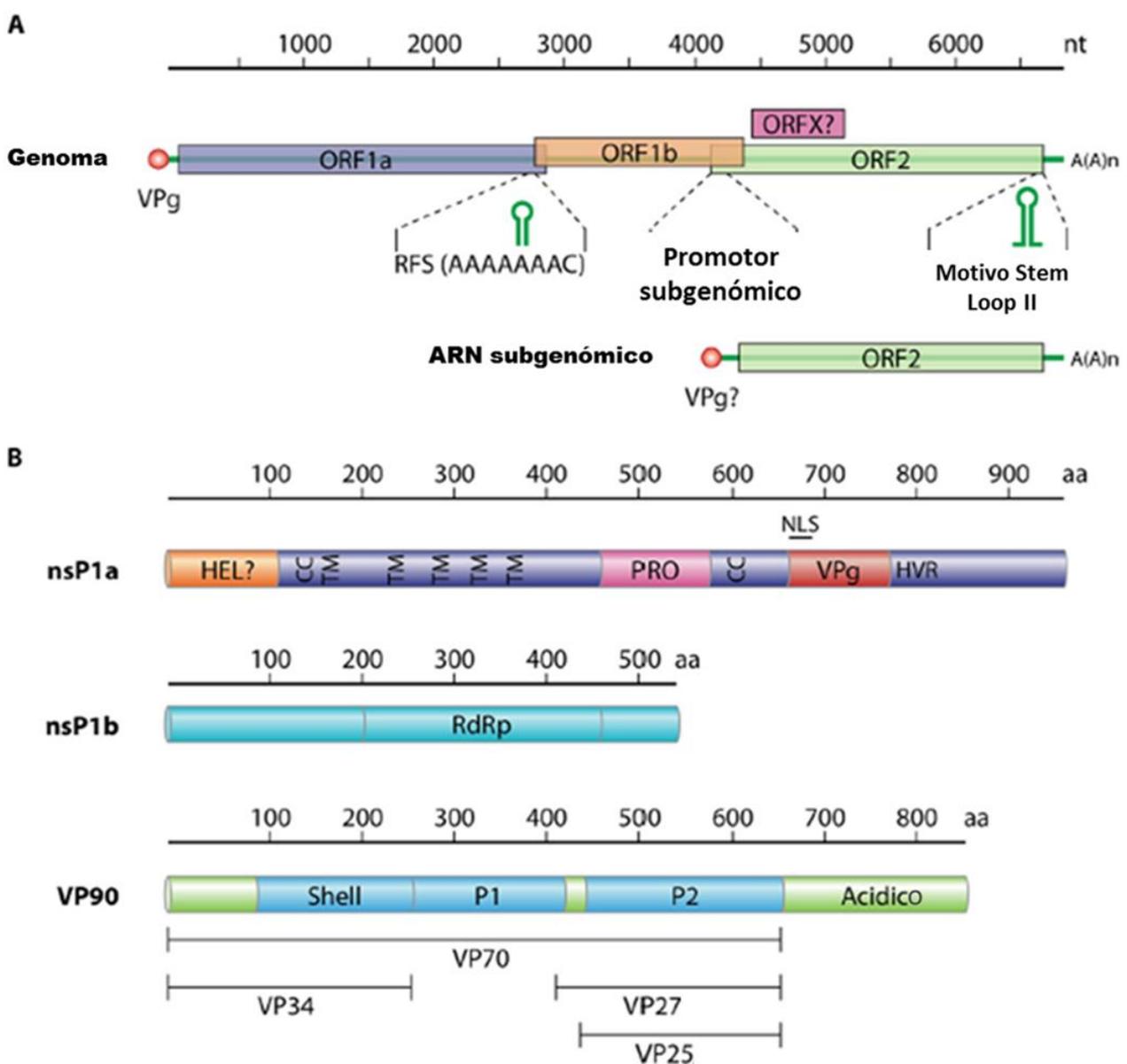


Figura 2. Organización del genoma y productos proteicos de astrovirus humano.

a) Organización del genoma y del ARN subgenómico, con los marcos abiertos de lectura (ORFs) representados como bloques. Las secuencias de nucleótidos representan secuencias altamente conservadas localizadas en la señal de cambio de marco del ribosoma (RFS) y previas al sitio de inicio de la transcripción del ARN subgenómico. b) Motivos característicos de los productos poliproteicos de HAstV. HEL: dominio putativo helicasa, TM: dominios transmembrana, CC: dominio *coiled-coil*, PRO: dominio proteasa, VPg: proteína de unión al genoma, HVR: región hipervariable, NLS: señal putativa de localización nuclear, RdRp: dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN. El ORF2 codifica la poliproteína estructural (VP90) el cual consiste de regiones conservadas (*shell* y dominio P1), una región variable que contiene el dominio P2 (espículas de la cápside) y una región C terminal ácida la cual es clivada por caspasas celulares resultando en VP70. Las partículas que contienen VP70 son clivadas adicionalmente por tripsina para originar las proteínas VP34, VP27 y VP25. Adaptada de Bosch y colaboradores (2014).

El ORF1a codifica un polipéptido denominado proteína no estructural 1a (nsP1a) y contiene un dominio putativo de helicasa (HEL), varios dominios transmembrana (TM), dos dominios *coiled-coil* (CC), un dominio proteasa (PRO), un motivo VPg (proteína protectora del genoma) y un dominio hipervariable (HVR). Por otro lado, el ORF1b codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (Figura 2b).

El ORF2 codifica para un polipéptido precursor de la proteína de cápside (Figura 2b), siendo el extremo N terminal de la proteína, más conservado que el C terminal y posiblemente el que interactúa con el ARN genómico del virus (Jonassen et al. 2001; Wang et al. 2001; Geigenmuller et al. 2002). Por otro lado, el extremo C terminal muestra una

variabilidad considerada, incluso a nivel de diferentes cepas que infectan una misma especie y está implicado en la formación de la espícula de la partícula viral (Krishna, 2005; Méndez y Arias, 2013).

1.2.4. Estructura y ensamble del virión

El virión de AstV es una partícula sin envoltura, de simetría icosaédrica con 5 ó 6 proyecciones características en la superficie en forma de puntas, lo cual le otorga una forma de estrella en aproximadamente el 10% de los viriones (Bosch et al. 2014).

Los virus eliminados en la materia fecal, presentan un diámetro de 28 a 30 nm, mientras que los virus generados en cultivo celular presentan un diámetro de 41 nm y espículas en su superficie (Risco et al. 1995).

La poliproteína resultante de la traducción del ARN subgenómico (codificado por el ORF2), se denomina VP90 (de 90 kDa aproximadamente), y se ensambla para conformar inicialmente el virión, siendo luego procesada por caspasas celulares dando lugar a la proteína VP70 (figura 2b), de 70 kDa aproximadamente (Méndez et al. 2004).

Los viriones con VP70 como proteína de cápside son aun inmaduros y requieren, al egresar de la célula, la acción de la tripsina para generar partículas altamente infecciosas con proteínas de cápside de 34, 27 y 25 kDa (VP34, VP27y VP25) (Méndez et al. 2002) (figura 3). Mientras que VP34 deriva de la región N terminal altamente conservada de la poliproteína y constituye la capa esférica de la cápside, VP27 y VP25 derivan del dominio C terminal variable (figura 2b) y forman las espículas diméricas (Krishna, 2005; Dong et al. 2011).

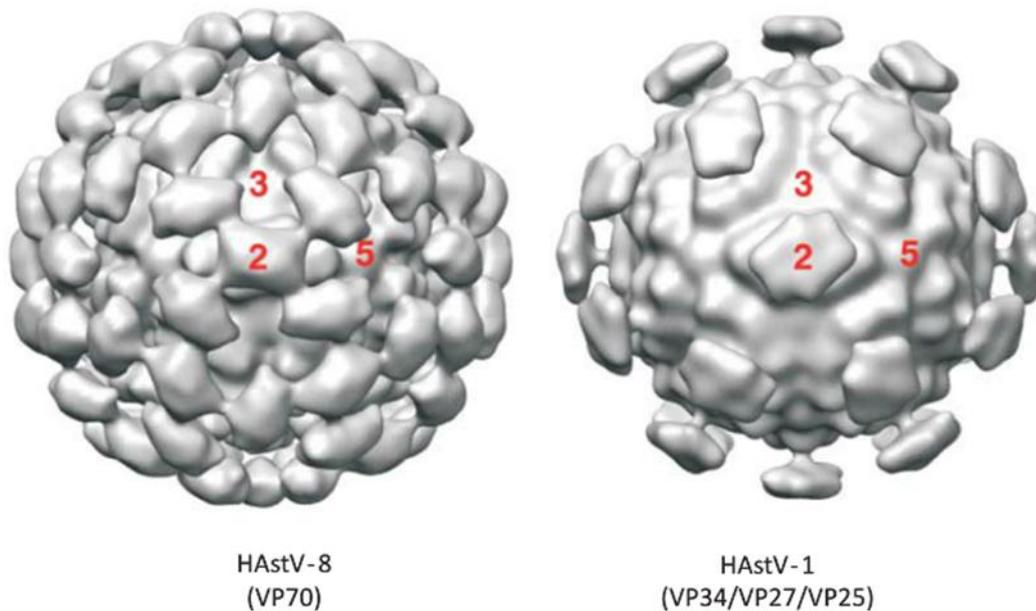


Figura 3. Reconstrucción tridimensional de astrovirus humanos obtenida mediante criomicroscopía electrónica.

Partículas de HAstV-8 y HAstV-1 purificadas mediante gradientes de cloruro de cesio, sin tratar (izquierda) y tratada (derecha) con tripsina. Se indica la composición proteica para cada partícula. Tomado de Méndez y Arias (2013).

1.2.5. Ciclo replicativo

Una vez que el virus ha ingresado a la célula y se ha decapsidado, las poliproteínas no estructurales (nsP1a y nsP1a1b) son traducidas desde el genoma viral. El clivaje de las mismas genera proteínas no estructurales relacionadas a la replicación del genoma, lo cual permite generar el ARN genómico y subgenómico, el cual traducido da lugar a la proteína de cápside. Una vez que se realiza la encapsidación y maduración del virión, el mismo es liberado de la célula (figura 4) (Bosch et al. 2014).

Se desconoce cuál es el receptor principal que HAstV utiliza para ingresar a la célula hospedera. Diferentes cepas de HAstV muestran diferente tropismo celular en cultivo, por lo

que es probable que las interacciones iniciales con la célula hospedera sean diferentes (Brinker et al. 2000). Se ha sugerido que podría existir más de una molécula receptora o de unión, dentro de las cuales podríamos encontrar una molécula de naturaleza polisacárida (Dong et al. 2011). Incluso ha sido identificado un sitio putativo de unión al receptor, conservado en todos los serotipos de HAstV clásicos, el cual podría reconocer una molécula de este tipo. El mismo se encuentra en VP25, e involucra los residuos Lys455, Ser554, Thr575 y Glu610 (Méndez y Arias, 2013). Anticuerpos anti VP25 y VP27 neutralizan la infectividad viral, probablemente debido a que bloquean la unión del virus (Sánchez-Fauquier et al. 1994; Bass y Upadhyayula, 1997).

Por otro lado, se ha confirmado que HAstV utiliza una vía de endocitosis mediada por clatrina como mecanismo de entrada a la célula. Esta entrada también depende de la acidificación y maduración de los endosomas, donde la decapsidación podría ocurrir (Méndez et al. 2014).

La proteína VPg ha demostrado tener un rol importante en la infectividad viral, una vez que el ARN ha sido decapsidado. Cuando se logra remover mediante tratamiento proteolítico, la infección es improductiva, lo que indicaría un rol en el reclutamiento de factores celulares de inicio de la traducción, como ha sido descrito para calicivirus (Fuentes et al. 2012; Thorne y Goodfellow, 2014). La traducción del genoma viral genera las poliproteínas nsP1a1b y nsP1a, las cuales son clivadas por la proteasa serina viral (que se encuentra en nsP1a) y algunas proteasas celulares, originándose de esta manera las proteínas no estructurales individuales (Bosch et al. 2014).

El procesamiento proteolítico de la poliproteína nsP1a1b genera la proteína nsP1b (ARN polimerasa dependiente de ARN) y la proteína nsP1a, la cual es subsecuentemente clivada para generar varios productos (Bosch et al. 2014).

Las proteínas estructurales son expresadas desde el ARN subgenómico, primero como una poliproteína de 90 kDa denominada VP90. La síntesis de dicha proteína es llevada a cabo en los mismos compartimientos celulares donde se forman los complejos de replicación (Méndez et al. 2007).

Debido a que, tanto las proteínas no estructurales como el ARN viral han sido localizados conjuntamente en el retículo endoplásmico y que en nsP1a se ha predicho la existencia de una señal para la retención del retículo, se piensa que las membranas intracelulares derivadas del retículo endoplásmico podrían ser el sitio celular para la replicación del genoma de HAstV (Guix et al. 2004).

Inicialmente, los complejos de VP90 ensamblan el virión inmaduro en asociación con membranas intracelulares mediante su extremo C terminal. Luego, varias caspasas celulares clivan a VP90, disociando así los viriones de las membranas, y generando cápsides virales compuestas por la proteína VP70 (Méndez et al. 2007; Banos-Lara y Méndez, 2010). El procesamiento de VP90 hacia VP70 es requerido para que el virus pueda salir de la célula y parecería que la liberación de las partículas formadas por VP70 ocurre sin lisis celular. Una vez en el exterior, los viriones maduran por acción de la tripsina, incrementando la infectividad de los mismos entre 3 a 5 órdenes de magnitud (Méndez et al. 2002, 2004). Sin embargo, se ha observado efecto citopático en células infectadas con cepas de AstV de pollo y cerdo, por lo que se presume que existe más de un mecanismo dentro de la

familia *Astroviridae* para egresar de la célula (Shimizu et al. 1990; Baxendale y Mebatsion, 2004; Méndez y Arias, 2013)

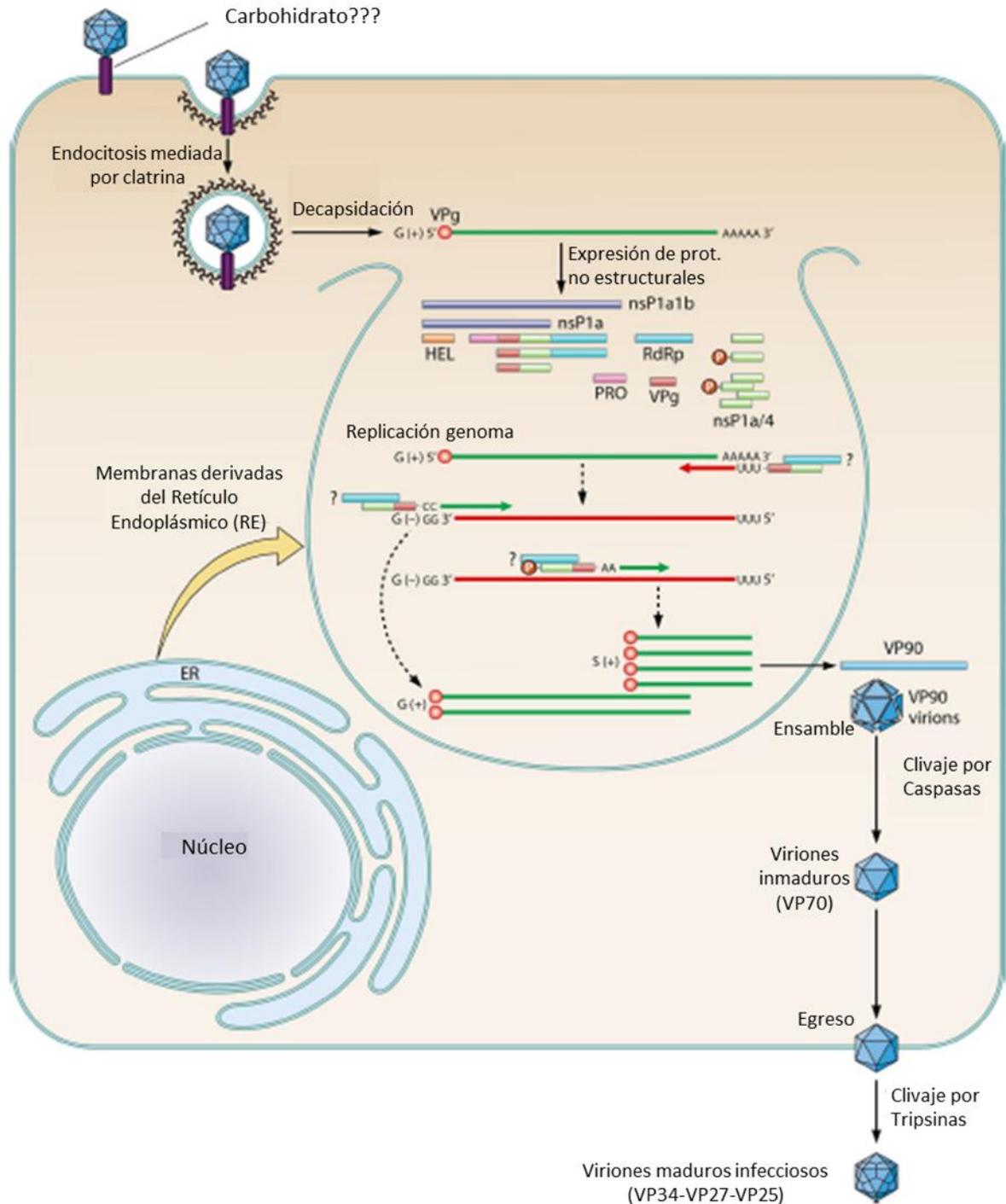


Figura 4. Replicación de astrovirus humano. Adaptado de Bosch y colaboradores (2014).

1.2.6. Patogénesis y manifestaciones clínicas

Los HAstV son transmitidos mediante la ruta fecal-oral causando gastroenteritis principalmente en niños, por lo general menores de 2 años, aunque las personas inmunocomprometidas, así como los ancianos, también constituyen un grupo de riesgo alto de originar casos de gastroenteritis aguda (De Benedictis et al. 2011).

Típicamente, el virus induce una diarrea acuosa leve de unos 2 a 3 días de duración que puede estar asociada a vómitos, fiebre, anorexia y dolor abdominal. El periodo de incubación promedio calculado para HAstV es de 4,5 días, el cual se sitúa por encima del de rotavirus y calicivirus (Lee et al. 2013; Bosch et al. 2014). Generalmente, la diarrea que causa HAstV es más leve que la causada por estos dos virus y se resuelve espontáneamente, aunque en algunos casos puede requerir hospitalización (Bosch et al. 2014).

En niños altamente inmunocomprometidos, se ha demostrado que las infecciones por HAstV clásicos pueden diseminarse sistemáticamente y causar infecciones graves e incluso letales (Wunderli et al. 2011).

La enfermedad en adultos puede ser transmitida por la exposición a AstV, mediante fómites, agua o alimentos contaminados (Abad et al. 2001; Belliot et al. 1997b), aunque también se ha evidenciado la transmisión de persona a persona (Midthun et al. 1993; De Benedictis et al. 2011).

Se han reportado algunos casos de adultos sanos afectados por el virus (Belliot et al. 1997b; Pager y Steele, 2002), en los cuales además, al igual que para los niños, la infección puede darse de manera asintomática (Méndez-Toss et al. 2004).

Los mamastrovirus afectan principalmente las células epiteliales del tracto intestinal. La infección involucra las células epiteliales maduras localizadas próximas a las puntas de

las vellosidades, haciéndose más extensa en el yeyuno que en el duodeno, pero no en el estómago (Sebire et al. 2004).

1.2.7. Transmisión y Epidemiología

Además de ser responsables de hasta un 20% de los casos de diarrea esporádica no bacteriana, los HAstV han demostrado una incidencia entre 0,5 y 15% en los brotes de diarrea (Kirkwood et al. 2005; Moser y Schultz-Cherry, 2005).

Importantes brotes de HAstV han sido asociados al consumo de alimentos contaminados (Oishi et al. 1994; Iritani et al. 2014). La transmisión de HAstV mediante agua contaminada ha sido sugerida como un riesgo de morbilidad digestiva para la población en general (Gofti-Laroche et al. 2003) y HAstV ha sido detectado en el agua superficial en un área en la cual un brote de gastroenteritis ocurría continuamente (Pintó et al. 1996).

Debido a que los tratamientos de agua residual, generalmente, no aseguran la completa remoción de los patógenos virales, cuando estas aguas son vertidas en el ambiente tanto el agua dulce, como la marina, o el agua subterránea, pueden contaminarse con HAstV (Pintó et al. 2001; Nadan et al. 2003; Le Cann et al. 2004; Morsy El-Senousy et al. 2007). En dichas matrices acuáticas el virus ha demostrado gran estabilidad facilitando de esta manera su transmisión hídrica (Abad et al. 1997; Bosch et al. 1997).

Existen alimentos, con una alta susceptibilidad a ser contaminados con HAstV, en etapas previas a la cosecha, como es el caso de moluscos bivalvos cultivados en aguas contaminadas y productos frescos regados con agua contaminada, tales como lechugas, cebollas de verdeo y otros vegetales, así como frutas del tipo frambuesas y frutillas (Le Guyader et al. 2000; Pintó y Bosch, 2008). Dichos productos, por lo general llevan poco, o

ningún procesamiento antes de su consumo y así actúan como vehículo en la transmisión de HAstV entre otros virus entéricos (Kurtz y Lee, 1987).

También el uso de agua contaminada, con fines recreacionales, puede originar un brote de gastroenteritis por HAstV como lo señala el caso de un brote que afectó a niños y adultos usuarios de una piscina cuya agua contenía HAstV (Maunula et al. 2004).

Las prácticas higiénicas inadecuadas por parte del personal gastronómico, son a menudo las responsables de la contaminación de productos tales como ensaladas y sándwiches, los cuales se consumen sin cocción o apenas cocidos. Dicho personal, muchas veces, presenta infecciones asintomáticas por HAstV y están implicados en brotes de gastroenteritis (Todd et al. 2007).

Los fómites y superficies tienen un rol importante en la diseminación de HAstV a nivel de instituciones como hospitales, residenciales de adultos mayores, restaurantes, y guarderías ya que pueden contener altas concentraciones del virus (Cubitt, 1999; Abad et al. 2001; Gallimore et al. 2005).

Generalmente las infecciones por HAstV afectan a niños menores de cinco años, siendo en niños entre cero y dos años, el rango de edades en la cual la infección es más frecuente (Bosch et al. 2014).

Los HAstV presentan distribución mundial, siendo su incidencia media 11%, con 7% y 23% en áreas urbanas y rurales, respectivamente (Bosch et al. 2013). La incidencia es usualmente mayor en países en desarrollo (Basu et al. 2003; Kiulia et al. 2007; Reither et al. 2007).

En las últimas décadas, se ha evidenciado una tendencia hacia la disminución en la incidencia de los HAstV clásicos, como se ha demostrado en países como Francia y Japón

y se ha especulado a partir de la alta seroprevalencia de algunas cepas de HAstV emergentes (VA1 y MLB-1), sobre la posibilidad de que estos estén reemplazando a los HAstV clásicos (Bosch et al. 2014).

Si bien las infecciones por HAstV ocurren durante todo el año, en regiones templadas tienen una alta incidencia en los meses fríos, la cual desciende dramáticamente en los meses de calor (Bosch et al. 2014). Posiblemente la alta incidencia en los meses de invierno se deba a la mejor estabilidad del virus en bajas temperaturas (Abad et al. 1997, 2001). En áreas tropicales, la mayor incidencia de infecciones por HAstV clásicos tiende a ocurrir en los meses lluviosos (Cruz et al. 1992; Maldonado et al. 1998).

1.2.8. Epidemiología molecular

De forma general, el genotipo HAstV-1 es el predominante a nivel mundial, aunque existen algunas excepciones donde la predominancia es del HAstV-2 o del par HAstV-1/HAstV-8 (Guerrero et al. 1998; Méndez-Toss et al. 2004; Méndez y Arias, 2013). Generalmente, con menor frecuencia que el HAstV-1 son detectados los genotipos HAstV-2, 3, 4, 5 y ocasionalmente el HAstV-8, dependiendo de la región; mientras que los genotipos HAstV-6 y HAstV-7 son raramente detectados (Palombo y Bishop, 1996; Mustafa et al. 2000; Guix et al. 2002; Méndez-Toss et al. 2004; Gabbay et al. 2007a; Liu et al. 2008; De Grazia et al. 2011).

Un estudio realizado en distintas regiones de India, mostró que la mayoría de los HAstV que circulan en niños menores de 2 años de edad son virus recombinantes (Verma et al. 2010). A su vez, virus con la polimerasa y la proteína de cápside de distintos HAstV clásicos han sido hallados en diferentes poblaciones de Kenia (Wolfaardt et al. 2011).

Un estudio realizado en España mostró que la mayoría de las infecciones por HAstV-1 y HAstV-3 ocurrían en niños menores de 2 años, mientras que las infecciones por HAstV-4 ocurrían en niños mayores de 4 años. A partir de estos hallazgos se especuló con que la inexistencia de inmunidad heterotípica pudiera incidir de manera importante en la prevalencia de los HAstV clásicos (Guix et al. 2002).

1.2.9. Evolución molecular

La familia *Astroviridae* actualmente constituye una familia de virus emergentes y genéticamente diversos con una larga historia evolutiva y un amplio espectro de especies hospederas (van Hemert et al. 2007a).

La reconstrucción de los eventos evolutivos dentro de la familia *Astroviridae* indica que la separación entre los linajes aviáres y de mamíferos ocurrió hace 310 millones de años y fue seguida por procesos de divergencia dentro de los virus de mamíferos y de varias transmisiones entre especies (Lukashow y Goudsmith, 2002; van Hemert et al. 2007a, 2007b).

Mientras las infecciones inter especies han sido bien documentadas en aves de corral (Battisti et al. 2012; Bidin et al. 2012) y han sido sugeridas en mamíferos, especialmente en cerdos, gatos y humanos (van Hemert et al. 2007a; Ulloa y Gutiérrez, 2010; Lan et al. 2011; Xiao et al. 2013), aún se desconoce si los AstV de aves podrían ser capaces de infectar mamíferos y viceversa.

Interesantemente y considerando los HAstV clásicos y emergentes, las distintas relaciones evolutivas entre los genotipos indican que han ocurrido varias introducciones de AstV en los humanos (Jiang et al. 2013). Como consecuencia, el potencial zoonótico de

estos virus es alto y futuras transmisiones de AstV no humanos hacia humanos probablemente ocurran.

La tasa de evolución para el genoma de HAstV fue determinada por Babkin y colaboradores en 2012 y se correspondió con lo esperado para aquellos virus de ARN de simple hebra de sentido positivo aproximándose a $3,7E-3$ sustituciones de nucleótidos por sitio por año y $2,8E-3$ cambios sinónimos por sitio por año.

La selección negativa (o purificadora) es la fuerza dominante entre los genes de HAstV y pocos sitios de codones, tales como los que codifican para los residuos ubicados en la región de la cápside viral que se expone al sistema inmune o aquellos relacionados en el reconocimiento celular, son los que muestran selección positiva y adaptación molecular durante la evolución (van Hemert et al. 2007b; Strain et al. 2008).

Cuando se comparan las tasas evolutivas entre diferentes AstV, aquellas más elevadas así como una mayor acumulación de sustituciones sinónimas, especialmente en el ORF2, han sido descritas en AstV de cerdos, ovejas, visones y pavos en comparación con AstV de humanos, gatos y pollos (van Hemert et al. 2007b). Por otro lado, las fuerzas evolutivas más importantes actuando específicamente sobre las posiciones sinónimas son las de composición nucleotídica, selección traduccional y uso diferencial de codones (van Hemert et al. 2007a).

Por otra parte, la recombinación luego de una coinfección por diferentes virus en un mismo hospedero es otro de los mecanismos principales que han tenido un rol en la evolución de los HAstV y en la generación de cepas nuevas (Bosch et al. 2014). Se han encontrado recombinantes naturales tanto entre cepas del mismo genotipo como de distintos genotipos dentro de los HAstV clásicos (Walter et al. 2001; Pativada et al. 2011, 2013;

Wolfaardt et al. 2011; De Grazia et al. 2012; Martella et al. 2013). Además, se han sugerido eventos de recombinación que involucran cepas de HAstV clásicos y de AstV de león marino (Rivera et al. 2010) o HAstV clásicos y AstV de cerdos (Ulloa y Gutiérrez, 2010). Estos resultados nos llevan al planteo de la hipótesis de un ancestro común o de un evento de transmisión zoonótica.

La gran variedad de especies infectadas, la evidente diversidad genética y la ocurrencia de eventos de recombinación indican la transmisión entre especies y la subsecuente adaptación del virus a un nuevo hospedero y la co-infección de un mismo hospedero con diferentes AstV.

Los ocho genotipos de los HAstV clásicos dentro de la especie *Mamastrovirus 1* comparten 63 a 84% de similitud a nivel de aminoácidos en la proteína de cápside, por otro lado para los *Mamastrovirus 6, 8 y 9* (HAstV emergentes), la similitud varía entre 74 y 90%, 78 y 79% y 75 y 77%, respectivamente, sugiriendo que probablemente muestren diferentes propiedades antigénicas (Bosch et al. 2014). Dentro de los HAstV clásicos, se han identificado distintos linajes dentro de algunos genotipos, definidos por un *cutoff* de similitud nucleotídica de 93 a 95% con la cepa de referencia (Medina et al. 2000; Walter et al. 2001; Guix et al. 2002; Jackab et al. 2003; Liu et al. 2008). Así, se ha definido la existencia de seis linajes para HAstV-1, cuatro linajes para HAstV-2, dos linajes para HAstV-3 y tres linajes para HAstV-4 y HAstV-8 (Colomba et al. 2006; Gabbay et al. 2007a, b; Liu et al. 2008; De Grazia et al. 2011; Medici et al. 2012; Martella et al. 2013).

1.2.10. Prevención y Tratamiento

Las infecciones de HAstV esencialmente pueden prevenirse mediante el control de las rutas de transmisión y controlando la enfermedad a nivel del paciente infectado. Es importante poder detectar el virus en el ambiente e inactivarlo tanto en agua de consumo como en alimentos así como desinfectar los fómites y superficies contaminadas (Bosch et al. 2014).

Si bien la resistencia de los HAstV clásicos en agua potable es alta, los tratamientos de desinfección de 2 horas con 1 mg/L de cloro son efectivos (Abad et al. 1997). Existe evidencia que muestra una mayor resistencia al cloro por parte de HAstV-6 y HAstV-7 en comparación con los restantes genotipos clásicos (Morsy El-Senousy et al. 2007).

Hasta el momento y a pesar que ha sido posible desarrollar *virus like particles* (VLPs) de HAstV en distintos sistemas (Dalton et al. 2003; Caballero et al. 2004), no se han desarrollado vacunas para el virus. Probablemente ello se deba al bajo impacto de la infección por HAstV en pacientes inmunocompetentes y a la necesidad de vacunas multivalentes para proteger al menos contra los genotipos más prevalentes, debido a la ausencia de protección heteróloga (Koopmans et al. 1998).

La terapia más común utilizada en pacientes que sufren gastroenteritis grave consiste en rehidratación oral o intravenosa (Bosch et al. 2014).

1.2.11. Diagnóstico

Inicialmente, los HAstV eran detectados en la rutina mediante microscopía electrónica de transmisión en muestras de materia fecal teñidas negativamente (Appleton y Higgins, 1975; Madeley y Cosgrove, 1975; Cubitt et al. 1999). Además de las limitaciones de la técnica (laboriosa, consume mucho tiempo, brinda un diagnóstico subjetivo e involucra personal de mucha experiencia), solamente un 10% de las partículas muestran la característica estructura en forma de estrella y la sensibilidad de la microscopía electrónica requiere una concentración viral de 10^7 partículas por gramo de materia (Glass et al. 1996).

Actualmente, existen al menos dos inmunoensayos enzimáticos comerciales para la detección de HAstV clásicos a partir de materia fecal. Si bien la tipificación no es posible, son útiles para la rápida detección de los virus cuando se deben analizar grandes cantidades de muestras (Medina et al. 2000; Putzker et al. 2000; Rovida et al. 2013).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa precedida de Transcripción Reversa (RT-PCR) ofrece umbrales de detección tan bajos como 10 a 100 copias genómicas por gramo de materia fecal, por lo cual los métodos convencionales de RT-PCR son ampliamente utilizados actualmente en muchos laboratorios tanto para realizar *screening* como para caracterizar el aislado (Glass et al. 1996).

Un refinamiento adicional de las técnicas moleculares lo constituye la PCR en tiempo real, como técnica de detección y cuantificación a partir de la amplificación de los genomas virales presentes en la muestra. Esta técnica posee rapidez, alta sensibilidad y reducción del riesgo de contaminación en el diagnóstico de los HAstV (Le Cann et al. 2004; Royuela et al. 2006; Dai et al. 2010).

La utilización de la línea celular CaCo-2 combinado con el pre-tratamiento del inóculo viral con tripsina constituye la técnica *gold standard* para el aislamiento de HAstV clásicos a partir de muestras clínicas y ambientales (Willcocks et al. 1994; Brinker et al. 2000), y varios métodos de cultivo celular integrados a RT-PCR han sido descritos (Grimm et al. 2004).

1.2.12. Presencia de HAstV en aguas ambientales

Si bien la presencia de HAstV en distintas matrices acuáticas ha sido documentada ampliamente desde hace varios años, pocos estudios han caracterizado molecularmente las distintas cepas que circulan en el ambiente (Nadan et al. 2003; Meleg et al. 2006; Rodríguez-Díaz et al. 2009; Aw y Gin, 2010, 2011; Fumian et al. 2013; Zhou et al. 2014).

En tal sentido, Nadan y colaboradores (2003) reportaron en aguas residuales y superficiales de Sudáfrica la presencia de todos los genotipos clásicos de HAstV, con excepción del HAstV-6, siendo predominante el HAstV-1, seguido en igual medida por HAstV-2, 3 y 7.

En Hungría, Meleg y colaboradores (2006) realizaron un estudio en el cual detectaron y caracterizaron molecularmente los HAstV presentes en los afluentes de 22 PTAR reportando la presencia del genotipo HAstV-1 (diez muestras) y el HAstV-2 (una muestra).

En Singapur, Aw y Gin en 2010, detectaron HAstV en el 100% de las muestras colectadas de manera mensual en tres PTAR en un monitoreo de afluentes y efluentes con tratamiento secundario. El genotipo HAstV-1 mostró ser predominante, aunque también fueron

detectados los genotipos HAstV-2 y HAstV-8. Estos mismos investigadores analizaron la presencia de HAstV en muestras de agua superficial de un río y un canal de la ciudad de Singapur, reportando una frecuencia del 50% con respecto al total de 80 muestras analizadas y detectando la presencia de los genotipos HAstV-1, HAstV-2, HAstV-4, HAstV-6 y HAstV-8, siendo el primero, el prevalente (Aw y Gin, 2011).

Recientemente, un estudio realizado en China, con muestras de afluentes en dos PTAR demostró la circulación de los genotipos HAstV-1, HAstV-5, HAstV-2 y HAstV-4, con prevalencia del primero, seguido por el segundo, y con apenas un caso para los genotipos HAstV-2 y HAstV-4 (Zhou et al. 2014).

En la región de América Latina y el Caribe han sido realizados pocos estudios que determinan la diseminación de los HAstV en el ambiente, en particular en matrices acuáticas. La información disponible proviene principalmente de los trabajos realizados en Brasil por Miagosotovich y colaboradores (2008) y por Guimaraes y colaboradores (2008), quienes detectaron HAstV en muestras de aguas superficiales de la red hidrográfica que rodea la ciudad de Manaus (norte brasileiro) y durante un monitoreo anual en afluentes y efluentes de una PTAR en la ciudad de Río de Janeiro. También en Brasil, Fumian y colaboradores (2013) detectaron y caracterizaron los HAstV presentes en las muestras de afluente de una PTAR también en Río de Janeiro, resultando todas las muestras pertenecientes al genotipo HAstV-1. En Venezuela, Rodríguez-Díaz y colaboradores (2009) hallaron un alto porcentaje de positividad en muestras provenientes de aguas residuales domésticas y de un río altamente contaminado por éstas en la ciudad de Caracas, reportando la circulación exclusiva del genotipo HAstV-8.

Hasta el momento, no se conoce en nuestro país el rol que juegan los Astrovirus humanos en la generación de casos de gastroenteritis a nivel clínico. Un estudio piloto realizado por nuestro grupo en el marco de un proyecto financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) junto al grupo de la Sección Virología de la Facultad de Ciencias y con la coparticipación de OSE permitió la detección de astrovirus humanos clásicos en un monitoreo realizado en las PTAR de Melo y Treinta y Tres (Lizasoain, 2012). Estos resultados preliminares nos llevaron a considerar la posibilidad de que dicho virus circulara ampliamente en nuestro país en diferentes regiones. Para conocer y caracterizar los astrovirus, nos planteamos estudiar la presencia del virus, mediante un abordaje de virología ambiental, en aguas residuales cruda y tratada en dos regiones del país (este y oeste).

2. RELEVANCIA

Este estudio realiza un aporte sustancial al monitoreo ambiental del recurso acuático al constatar la ocurrencia frecuente de HAstV en las aguas residuales de dos regiones en nuestro territorio nacional, constituyendo el primer monitoreo de este virus en matrices ambientales uruguayas, lo cual además reviste importancia por la carencia de datos existentes sobre la prevalencia de este patógeno en los casos de gastroenteritis en la población de nuestro país.

Además, en este estudio, se analiza el proceso de tratamiento terciario con desinfección mediante luz UV de aguas residuales a través del análisis de la remoción de HAstV en dos PTAR, señalando un importante beneficio para el ambiente y la salud humana al generar efluentes con bajas frecuencias y concentraciones de HAstV en la mayoría de los casos. En tal sentido, se sugiere la necesidad urgente de tratamiento de aguas residuales en las ciudades que vierten las mismas directamente a los recursos hídricos con el fin de disminuir el riesgo existente de infecciones por HAstV así como también por otros virus entéricos por parte de la población que entra en contacto con esta matriz ya sea con fines deportivos, recreacionales o de consumo, entre otros.

También se realiza una caracterización molecular mediante el análisis filogenético de las distintas cepas detectadas, estableciendo una línea de base con respecto al conocimiento de los genotipos y linajes que circulan en el agua residual uruguaya como aporte significativo a la epidemiología molecular del virus en aguas ambientales tanto en la región como en el mundo. En tal sentido, se reporta por primera vez, la presencia en el ambiente de una cepa de un genotipo emergente de HAstV (MLB-1) y se propone a partir del análisis filogenético

la clasificación en linajes a partir del grado de divergencia encontrado entre las mismas. Adicionalmente, se calcula por primera vez la tasa de evolución de este genotipo y se datan los ancestros en común que tuvieron las cepas circulantes actualmente dentro de este genotipo. También se reporta por primera vez, la circulación de cepas de AstV de origen canino en el agua residual y se debate acerca de la importancia de profundizar en el estudio del potencial zoonótico de las mismas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pretenden ser utilizados como fundamento científico para avanzar en materia de legislación ambiental, diseño e implementación de sistemas eficaces de monitoreo de calidad de agua, así como también para optimizar la gestión de los recursos hídricos con la finalidad de mitigar el impacto humano sobre la calidad del agua.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Demostrar la circulación de astrovirus en Uruguay utilizando un abordaje ambiental de detección, cuantificación y caracterización molecular de los virus presentes en aguas residuales y monitorear su presencia durante el proceso de tratamiento de este tipo de aguas.

3.2. Objetivos específicos

- Monitorear la presencia de astrovirus humanos clásicos por PCR cualitativa en las aguas residuales tratadas y no tratadas en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos y en dos PTAR de las ciudades de Melo y Treinta y Tres.
- Cuantificar los astrovirus humanos clásicos presentes en el monitoreo de las aguas residuales por PCR en tiempo real.
- Estudiar la dinámica de los astrovirus humanos clásicos durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales en las PTAR de Melo y Treinta y Tres.
- Monitorear los astrovirus emergentes por PCR cualitativa en las PTAR de las ciudades de Melo y Treinta y Tres.
- Realizar la caracterización molecular de los astrovirus detectados en las aguas residuales de Uruguay.
- Determinar los patrones temporales y geográficos de los astrovirus humanos clásicos detectados en el monitoreo.
- Determinar la tasa de evolución de MLB-1 y la edad del ancestro común más reciente para dicho genotipo y para cada linaje propuesto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño y caracterización de la colecta de muestras

Este estudio está basado en el muestreo de aguas residuales en dos regiones del país (región oeste y este), las cuales presentan, además de diferencias demográficas y económicas, estrategias de saneamiento distintas en lo relacionado al tratamiento del agua residual doméstica (Figura 5).

En la región oeste, se realizó un monitoreo de agua residual con colectas en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos. Dichas ciudades están localizadas en la margen del Río Uruguay, el cual conforma una amplia cuenca hidrográfica y constituye un importante modelo geográfico para el estudio del impacto de la actividad humana y de la contaminación viral del agua superficial. El río Uruguay recorre una distancia de aproximadamente 1.838 kilómetros de los cuales 1.262 pertenecen a Brasil y corresponden al tramo entre su nacimiento y la confluencia con el río Quaraí. Los restantes 576 kilómetros constituyen el límite entre Uruguay y Argentina.

Las cuatro ciudades localizadas en la región oeste forman un recorrido hidrográfico de unos 330 kilómetros desde Bella Unión hasta Fray Bentos, un 75% de la longitud del Río Uruguay en territorio uruguayo. Con la excepción de Bella Unión, donde las aguas residuales reciben un tratamiento mediante laguna de decantación antes de ser vertidas en el Río Uruguay, las restantes tres ciudades utilizan este río como vertedero de agua residual, sin que exista tratamiento alguno para las mismas.

En dicha región, se colectaron 42 ml de agua residual directamente desde los caños emisores en cada ciudad, de manera quincenal en el período comprendido entre Marzo de 2011 a Febrero de 2012. En Bella Unión, la colecta fue realizada en el efluente de la laguna de decantación.

Por otro lado, en la región este, el muestreo se focalizó en las ciudades de Melo y Treinta y Tres. Dichas ciudades, a diferencia de las anteriores, cuentan con Plantas de Tratamiento de Agua Residual (PTAR), las cuales depuran las aguas residuales domésticas mediante un tratamiento terciario con un proceso final de desinfección de efluentes con radiación ultravioleta. Dichos efluentes depurados son vertidos en cuerpos naturales de agua. En ambas PTAR, fueron colectadas muestras de agua residual cruda (afluente), de efluente con tratamiento terciario previo a la desinfección con UV (efluente pre UV) y de efluente con tratamiento terciario sometido a radiación UV (efluente post UV). Las colectas se realizaron bimensualmente desde setiembre de 2011 hasta abril de 2013. En cada PTAR, el muestreo de los tres puntos se realizó el mismo día, colectando 42 ml de muestra en cada caso, siendo la muestra de afluente, una colecta compuesta de muestreo. Todas las muestras fueron preservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.



Figura 5. Localización de las ciudades uruguayas donde se colectaron las muestras de agua residual.

En las ciudades de Bella Unión (1), Salto (2), Paysandú (3) y Fray Bentos (4) las aguas residuales domésticas son vertidas directamente al Río Uruguay mediante emisarios. En las ciudades de Melo (5) y Treinta y Tres (6) las aguas residuales domésticas son depuradas en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales, las cuales realizan un tratamiento terciario con un proceso de desinfección final de efluentes con luz ultravioleta.

4.2. Concentración viral

La concentración viral en las muestras de agua residual se realizó mediante la técnica de ultracentrifugación siguiendo el protocolo de Pina y colaboradores (1998), con modificaciones (Fumian et al. 2010). 42 mL de muestra fueron centrifugados a 100.000 xg por una hora a 4 °C. El pellet fue eluído en 3,5 mL de tampón glicina 0,25 N (pH 9,5) y fue incubado en hielo por 30 minutos con agitación cada 5 minutos. Posteriormente, fueron

adicionados 3,5 mL de PBS 2X (pH 7,2) y se centrifugó a 12.000 xg por 15 minutos. Luego, el sobrenadante fue centrifugado a 100.000 xg por 1 hora a 4 °C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 200 µL de PBS 1X y fue almacenado a -70 °C hasta su posterior análisis.

4.3. Control interno

Previo a la concentración viral, todas las muestras fueron inoculadas con 500 µL de una suspensión de cultivo conteniendo el fago PP7, utilizado como un control interno del proceso de concentración. Dicho fago fue cedido por la Dra. Verónica Rajal, de la Universidad Nacional de Salta, Argentina y fue cuantificado en el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Río de Janeiro Brasil, resultando en 1×10^8 copias genómicas por mililitro.

4.4. Extracción del ácido nucleico y síntesis del ADN copia (ADNc)

200 µl de PBS 1X fueron adicionados al mismo volumen de muestra concentrada para obtener un volumen final de 400 µl con el fin de realizar la extracción de ácidos nucleicos mediante el método de guanidina/sílica descrito por Boom y colaboradores (1990). La transcripción reversa del ARN viral se realizó con cebadores randómicos hexaméricos (SBS Genetech Co. Ltd., Shanghai-China) y con la transcriptasa reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen™, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En todos los procedimientos (extracción del ácido nucleico, síntesis del ADNc y PCRs), agua libre de RNAsas y ADNAsas fue utilizada como control negativo.

4.5. Detección del control interno (fago PP7)

Para la detección del control interno, se realizó una PCR cualitativa en un volumen final de 25 µl conteniendo una concentración final de 0,4 µM de los cebadores 247f y 320r, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de ADN Taq Polimerasa (Invitrogen™, Estados Unidos) y 5 µl de ADNc. La amplificación fue realizada con 40 ciclos (94 °C por 30 seg., 60 °C por 60 seg. y 72 °C por 30 seg.) con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos (Rajal et al. 2007).

4.6. Detección por RT-PCR de HAstV clásicos

La detección de los HAstV clásicos mediante RT-PCR cualitativa se realizó con los cebadores Mon269 y Mon270 (región del ORF2) con los mismos reactivos y concentraciones descritos para la PCR de detección de PP7. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 40 ciclos de 94 °C por 30 seg., 50 °C por 30 seg. y 72 °C por 60 seg.; con una extensión final de 10 minutos a 72 °C (Noel et al. 1995).

Como control positivo se utilizó una suspensión fecal al 10% de un caso de diarrea infantil previamente caracterizado como HAstV-1 (número de acceso en GenBank: JQ796912).

4.7. Detección de HAstV emergentes por RT-PCR

La detección de los HAstV emergentes mediante RT-PCR cualitativa se realizó con los cebadores SF0073 y SF0076 (región del ORF1b) en un volumen final de 25 µl conteniendo una concentración final de 0,5 µM de dichos cebadores, 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 U de ADN Taq Polimerasa (Invitrogen™) y 5 µl de ADNc (Finkbeiner et al. 2009b). La amplificación fue realizada con 40 ciclos (94 °C por 30 seg., 53 °C por 30 seg., 72 °C por 50 seg.) con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

4.8. Detección de HAstV MLB-1 mediante RT-PCR

Los casos positivos resultantes de la PCR que utiliza los cebadores SF0073 y SF0076 que fueron caracterizados como MLB-1 mediante análisis filogenético del segmento del ORF1b, fueron sometidos a una *One Step* RT-PCR con los cebadores SF0053 y SF0061 cuyo blanco de amplificación es un segmento de 402 pb del ORF2, para lo cual se utilizó el sistema *SuperScript® III One-Step RT-PCR* (Invitrogen™, Estados Unidos) (Finkbeiner et al. 2009b).

4.9. Cuantificación de HAstV clásicos mediante PCR en tiempo real

Las muestras positivas por RT-PCR de HAstV clásicos fueron cuantificadas utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real con tecnología TaqMan®. Se utilizó el kit *SensiMix™ II Probe II* (BIOLINE Reagents Ltd, Inglaterra) siguiendo las indicaciones del fabricante, y el termociclador *Rotor Gene Q II* (Qiagen®, Alemania). 5 µl de ADNc fueron añadidos al *mix* de

PCR para lograr un volumen final de 25 μ l, el cual contenía los siguientes reactivos con las correspondientes concentraciones finales: *2X SensiMix™II Probe* (1X), los cebadores AstVF y AstVR (0,8 μ M) y la sonda TaqMan® marcada con el fluoróforo FAM (0,4 μ M). Para cada reacción se adicionó el volumen de agua estéril libre de nucleasas (AMRESCO®, Estados Unidos) necesario para llevar la reacción a un volumen final de 25 μ l (Dai et al. 2010). En cada caso, la fluorescencia se midió en cada paso de elongación y el *Ct* fue calculado determinando el punto al cual la fluorescencia excede el límite umbral. La amplificación fue realizada con 40 ciclos (95 °C por 15 seg. y 55 °C por 60 seg.), precedidos de un paso inicial de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos. Los cebadores AstVF y AstVR amplifican una región de 76 pb del ORF1b del genoma de los HAstV clásicos.

4.10. Electroforesis y visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR cualitativas se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las electroforesis se realizaron con las siguientes condiciones: 100 volts por 80 minutos, con una concentración del gel de agarosa al 3% en Buffer TAE 1X. Para la visualización de los productos de PCR, fue utilizado el agente intercalante de ácidos nucleicos *GoodView™ Nucleic Acid Stain II* (SBS Genetech Co., Ltd. China), el cual fue incorporado en el gel antes de su solidificación. Dos μ l de *5x DNA Loading Buffer blue II* (BIOLINE Reagents, Ltd, Inglaterra) fueron adicionados a 10 μ l de producto de PCR. En cada corrida electroforética fue utilizado un marcador de peso molecular de 100 pb y de 50 pb (BIOLINE Reagents, Ltd, Inglaterra) para auxiliar en la identificación del tamaño de las bandas esperadas para cada una de las reacciones de PCR. Los geles fueron visualizados en

transiluminador de luz UV (Cleaver Scientific Ltd., Inglaterra) y la fotografía fue registrada mediante el sistema de captura de imagen *FOTODYNE Incorporated FOTO/Analyst® Express* (Fotodyne Incorporated, Estados Unidos).

4.11. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Las purificaciones de los productos de PCR fueron realizadas utilizando el kit comercial *AxyPrep™ PCR Cleanup Kit* (AXYGEN®, Estados Unidos). El kit *AxyPrep™ DNA Gel Extraction* (AXYGEN®, Estados Unidos) fue utilizado para purificar las bandas del tamaño esperado directamente del gel de agarosa cuando además del amplicón esperado también se observaron bandas inespecíficas. En ambas ocasiones se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron enviados al Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo para la obtención de su secuencia de ADN. Se secuenció en ambos sentidos utilizando el kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing* (Life Technologies™, Estados Unidos) y el secuenciador automático *ABI3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem™, Estados Unidos).

4.12. Análisis Bioinformático de las secuencias de ADN de Astrovirus

4.12.1. Edición, alineamiento de secuencias y construcción de matrices de identidad

El programa *SeqMan™* (DNASTar Incorporated) fue utilizado para ensamblar y editar las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio. Las secuencias de las cepas prototipo de los diferentes genotipos y otras provenientes de diferentes países de la región y del mundo fueron obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>)

y alineadas con las secuencias obtenidas en este estudio mediante la herramienta *Clustal W* en el programa *MEGA 6.0* (Tamura et al. 2013).

Distintas matrices de identidad nucleotídica/aminoacídica fueron realizadas a partir de los diferentes alineamientos realizados utilizando el programa *BioEdit* versión 7.2.5 (Hall 1999).

4.12.2. Análisis filogenéticos y de coalescencia

Las distintas reconstrucciones filogenéticas fueron realizadas calculando la distancia genética mediante el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2-parámetros, utilizando el método de *Neighbor-Joining* con *Bootstrap* de 1.000 réplicas en el programa *MEGA 6.0* (Tamura et al. 2013).

Para realizar el estudio de coalescencia del genotipo MLB-1 fueron seleccionadas desde la base de datos de GenBank la totalidad de secuencias disponibles parciales del ORF2 del genoma de MLB-1 que estuvieran asociadas a una publicación en una revista científica arbitrada, a las cuales se les añadió la secuencia parcial de ORF2 generada en este estudio a partir de una cepa uruguaya, totalizando 29 secuencias nucleotídicas de distintos países del mundo (Estados Unidos, Italia, Egipto, India, Bután, China, Australia y Uruguay) las cuales fueron datadas a partir de la información disponible en la base de datos o los artículos. En el anexo 1 se observan los números de acceso a GenBank, el país de origen y el año en que circuló cada cepa cuya secuencia fue utilizada en este análisis.

Previo al análisis de coalescencia, la herramienta *GARD* (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*) disponible en la web www.Datamonkey.org fue utilizada para detectar posibles puntos de recombinación en las secuencias del alineamiento.

El programa *Beauti* del paquete *Beast* v 1.8.0 fue utilizado para preparar los datos para el análisis de coalescencia (Drummond et al. 2012). El modelo de reloj molecular utilizado fue el relajado lognormal no correlacionado y el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a nuestro conjunto de secuencias fue determinado previamente con la herramienta *FindModel* de la Base de Datos de HIV de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>) resultando en el modelo de Tamura Nei 93 + gamma (Ho et al. 2005; Drummond et al. 2006).

Se realizó el análisis utilizando como datos previos de árboles coalescentes el modelo de tamaño constante, el de crecimiento logístico, el de crecimiento expansional, el de crecimiento exponencial y el modelo bayesiano de *skyline*. En cada caso, se estimó la tasa de evolución tomando valores en una distribución uniforme entre 0 y 1 con un valor inicial de 1,0E-03 sustituciones por sitio por año.

Se realizó un muestreo Monte Carlo vía Cadenas de Markov (MCMC) de 1×10^8 generaciones. Cada combinación de datos fue corrida en el programa *Beast* v 1.8.0 y los resultados fueron luego visualizados con el programa *Tracer* v 1.5 descartando como calentamiento el 10% inicial de la corrida. Los valores del número efectivo de muestreo (ESS) fueron chequeados a fin de evaluar la convergencia del análisis, aceptando solamente valores mayores a 200 para todos los parámetros. El cálculo de Factor de Bayes fue realizado en el programa *Tracer* v 1.5 para decidir qué modelo contaba con un soporte más fuerte. La incertidumbre estadística de los datos se expresó mediante valores de 95% HPD (*Highest Probability Density*). Los árboles generados en cada corrida fueron anotados con el programa *TreeAnnotator* v 1.8.0 y luego visualizados y editados con el programa *FigTree* v 1.4.2.

5. RESULTADOS

5.1. Monitoreo y cuantificación de HAstV clásicos en las ciudades localizadas en la región oeste de Uruguay

Fueron colectadas un total de 96 muestras de agua residual (24 muestras en cada ciudad citada anteriormente) para las cuales la amplificación del control interno (fago PP7) arrojó resultados positivos en todos los casos (anexo 2).

Del total de muestras, 45% (43/96) fue positivo para HAstV clásicos por RT-PCR. La ciudad de Salto presentó una positividad de 63% (15/24), seguida por Fray Bentos con un 46% (11/24), Bella Unión con un 42% (10/24) y Paysandú con 29% (7/24).

De las 43 muestras positivas para HAstV clásicos, 39 (91%) pudieron ser cuantificadas. Los valores mínimos y máximos de concentración de HAstV clásicos en las aguas residuales corresponden a $3,2E+03$ y $2,0E+05$ en Bella Unión, a $1,6E+04$ y $1,4E+06$ en Salto, a $1,5E+04$ y $5,3E+05$ en Paysandú y a $3,7E+03$ y $3,2E+06$ en Fray Bentos, respectivamente, siendo dichos valores expresados en copias genómicas por litro (figura 6).

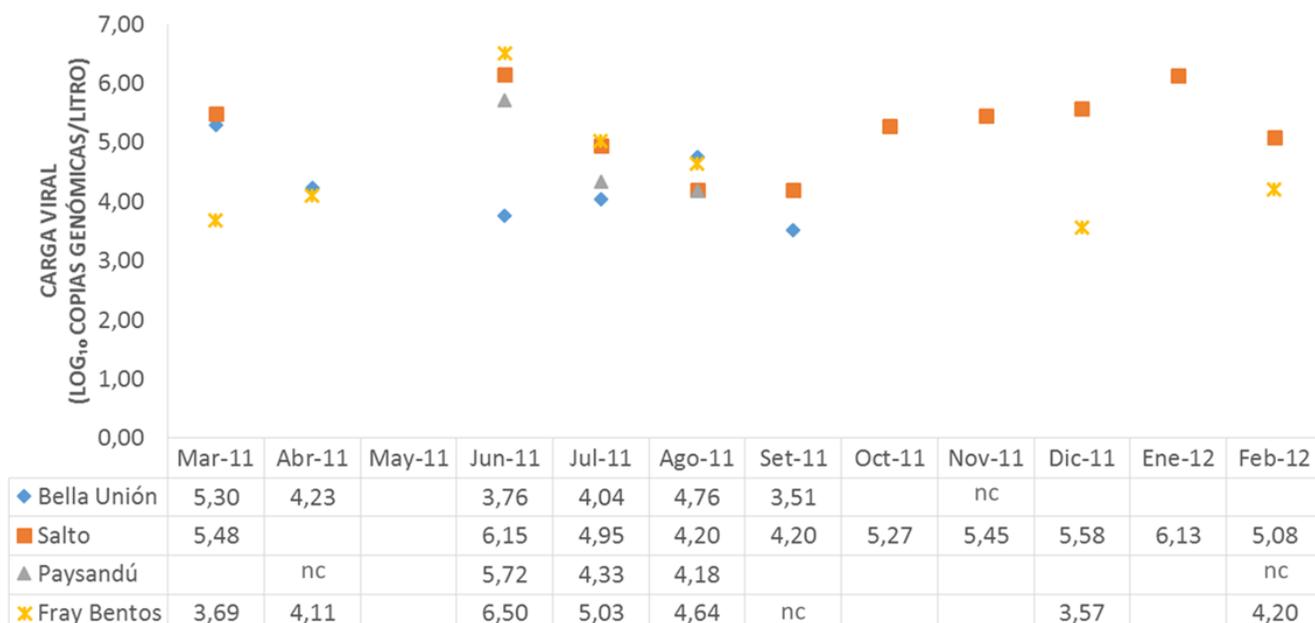


Figura 6. Carga viral de astrovirus humanos clásicos en aguas residuales vertidas al Río Uruguay en la región oeste de Uruguay.

En la figura se observa la carga viral en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos expresada en las ordenadas como el Log_{10} de las copias genómicas del virus por litro de agua residual. El valor de cada mes es el promedio de los dos valores obtenidos en ese mes. nc: muestra positiva no cuantificada.

5.2. Monitoreo y cuantificación de HAstV clásicos en las PTAR de Melo y Treinta y Tres

Fueron colectadas un total de 27 muestras en la PTAR de Melo siendo 10 de afluente, nueve de efluente Pre UV y ocho de efluente Post UV. En la PTAR de Treinta y Tres se colectaron 30 muestras (10 para cada punto). La amplificación del control interno (fago PP7) arrojó resultados positivos en todos los casos (anexo 2).

Considerando los afluentes de Melo, el 60% (6/10) fue positivo para HAstV clásicos y en Treinta y Tres el 80% (8/10). Al considerar los efluentes pre UV, la positividad fue del 33% (3/9) en Melo y del 20% (2/10) en Treinta y Tres. La positividad en efluentes post

UV fue del 20% (2/10) en Treinta y Tres y no hubo detección de HAstV clásicos en las muestras de efluentes post UV de Melo (tabla 2).

Tabla 2. Resultados del monitoreo cualitativo para la detección de astrovirus humanos clásicos en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres en el periodo Setiembre 2011 – Abril 2013.

| | 2011 | | | 2012 | | | | | | | | 2013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|---|---|------|---|---|-----|---|---|-----|---|------|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|
| | Set | | | Nov | | | Feb | | | Abr | | | Jun | | | Ago | | | Oct | | | Dic | | | Feb | | | Abr | | |
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| <i>PTAR-Melo</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | + | 0 | - | + | + | - | + | + | 0 | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>PTAR-Treinta y Tres</i> | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - |

A: muestra de afluente, B: muestra de efluente con tratamiento terciario previo a la desinfección con luz ultravioleta, C: muestra de efluente con tratamiento terciario posterior a la desinfección con luz ultravioleta, +: muestra positiva, -: muestra negativa, 0: muestra no colectada, PTAR: Planta de Tratamiento de Agua Residual.

De las 14 muestras positivas en afluentes en ambas PTAR, fue posible cuantificar 12 de ellas, las cuales presentaron valores de concentración entre $1,7E+04$ a $2,9E+07$ y $5,0E+04$ a $7,6E+07$ copias genómicas por litro en las PTAR de Melo y Treinta y Tres, respectivamente.

De las cinco muestras positivas de efluentes pre UV en ambas PTAR se cuantificaron tres de ellas, tomando valores de $3,0E+04$ copias genómicas por litro en Melo y de $2,0E+5$ y $3,8E+05$ copias genómicas por litro en Treinta y Tres.

Finalmente, las dos muestras positivas de efluentes post UV de la PTAR de Treinta y Tres tomaron valores de $3,8E+05$ y $5,7E+05$ copias genómicas por litro.

5.3. Dinámica de los HAstV clásicos durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales en las PTAR de Melo y Treinta y Tres

Para el estudio de la dinámica de los HAstV en las PTAR fueron excluidos aquellos muestreos realizados de manera incompleta en Melo con la finalidad de preservar la equivalencia entre el número de afluentes y efluentes. Por lo tanto en Melo fueron considerados siete de los 10 muestreos realizados.

En la PTAR de Melo, fue posible cuantificar mediante PCR en tiempo real tres de los cuatro afluentes positivos detectados por PCR convencional, promediando una carga viral de $1,3E+07$ copias genómicas por litro de agua residual. También fue posible cuantificar uno de dos casos positivos de efluente previo al tratamiento con UV resultando en un valor de $3,0E+04$ copias genómicas por litro de agua residual. HAstV no fue detectado en las muestras de efluente posterior al UV (tabla 3).

En la PTAR de Treinta y Tres, fueron cuantificados la totalidad de los casos positivos en las muestras de afluente ($n=8$), efluente previo al tratamiento con UV ($n=2$) y efluente posterior al tratamiento con UV ($n=2$) resultando en valores promedios de carga viral expresada en copias genómicas por litro de agua residual de $1,4E+07$, $2,9E+05$ y $4,8E+05$, respectivamente (tabla 3).

Para conocer la capacidad de cada PTAR en la remoción de los HAstV clásicos se estudió la variación en el número de casos positivos y de la carga viral promedio de los mismos en función de las tres etapas del proceso de remoción en las cuales se muestreó: el afluente, el efluente previo al tratamiento con UV y el efluente posterior al tratamiento con UV. Para ello, los valores de carga viral promedio fueron expresados en Log_{10} y

graficados para cada etapa en cada PTAR, al igual que el número de casos positivos detectados por PCR convencional expresados como porcentaje de positividad (figura 7).

Tabla 3. Distribución de astrovirus humanos clásicos en cada una de las etapas del tratamiento realizado en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres.

| | Afluente (A) | | | Efluente Previo al UV (B) | | | Efluente Posterior al UV (C) | | |
|--|-----------------------------|--|----------------------|-----------------------------|--|----------------------|------------------------------|--|----------------------|
| | Cuantificados/ Positivos | Carga viral promedio (min ~ max) | Log10 carga viral | Cuantificados/ Positivos | Carga viral promedio (min ~ max) | Log10 carga viral | Cuantificados/ Positivos | Carga viral promedio (min ~ max) | Log10 carga viral |
| <i>PTAR-Melo</i> (<i>nA=nB=nC=7</i>) | 3/4 | 1,30E+07 (1,72E+04 ~ 2,88E+07) | 7,11 | 1/2 | 2,96E+04 (-----) | 4,47 | - | - (-----) | - |
| <i>PTAR-Treinta y Tres</i> (<i>nA=nB=nC=10</i>) | 8/8 | 1,38E+07 (4,98E+04 ~ 7,55E+07) | 7,14 | 2/2 | 2,90E+05 (1,99E+05 ~ 3,81E+05) | 5,46 | 2/2 | 4,78E+05 (3,82E+05 ~ 5,73E+05) | 5,68 |

Los valores de carga viral están expresados como copias genómicas por litro. PTAR: Planta de Tratamiento de Agua Residual. UV: ultravioleta.

En la PTAR de Melo, la positividad en afluentes de 60% descendió al 30% luego de que las muestras fueran sometidas al tratamiento terciario y al final del proceso, luego de ser desinfectadas con luz UV, la positividad fue nula (figura 7). La carga viral promedio en el efluente pre UV fue de tres órdenes inferior con respecto a la inicial y finalmente en el efluente post UV descendió cuatro órdenes más, resultando en una carga viral nula (figura 7).

En la PTAR de Treinta y Tres, la positividad inicial en afluentes del 80% descendió al 20% debido al tratamiento terciario, valor que se mantuvo aún luego de tratar las muestras con luz ultravioleta. En este caso, la carga viral promedio luego del tratamiento terciario (efluente pre UV) y luego del tratamiento con luz UV fue de dos órdenes de magnitud inferior con respecto a la inicial, por lo que al final del proceso, no todos los

HAstV fueron removidos en su totalidad y persistieron con una carga viral promedio de $4,8E+05$ copias genómicas por litro (figura 7).

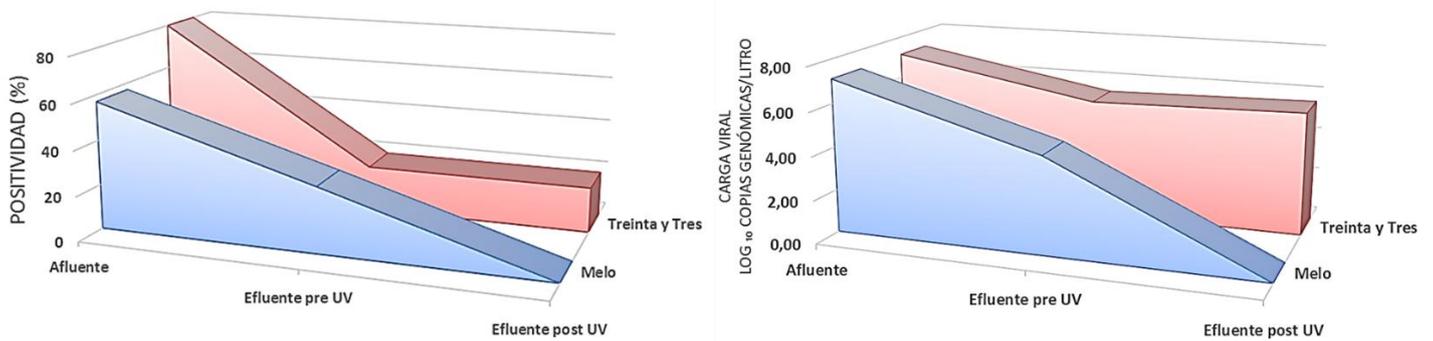


Figura 7. Distribución de astrovirus humanos clásicos en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres.

En el gráfico de la izquierda se observa el porcentaje de positividad con respecto al número de muestras colectadas en cada etapa del proceso de tratamiento del agua residual en ambas Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR). En el gráfico de la derecha se muestra el Log₁₀ de la carga viral promedio para cada etapa del proceso de tratamiento del agua residual en cada PTAR.

5.4. Monitoreo de astrovirus emergentes en las PTAR de Melo y Treinta y Tres mediante amplificación del ORF1b

Las 57 muestras de las PTAR fueron sometidas a reacciones de amplificación con el par de cebadores SF0073 y SF0076, resultando en 13 muestras positivas, correspondientes a 12 muestras de afluentes en ambas PTAR y una muestra de efluente pre UV de la PTAR de Treinta y Tres (tabla 4).

Tabla 4. Resultados del monitoreo cualitativo para la detección de astrovirus emergentes en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres en el periodo Setiembre 2011 – Abril 2013.

| | 2011 | | | 2012 | | | | | | | | | 2013 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|---|---|------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|---|---|---|
| | Set | | | Nov | | | Feb | | | Abr | | | Jun | | | Ago | | | Oct | | | Dic | | | Feb | | | Abr | | | | | |
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| <i>PTAR-Melo</i> | - | - | - | - | - | - | + | - | 0 | - | 0 | - | + | - | - | - | - | 0 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>PTAR-Treinta y Tres</i> | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - |

A: muestra de afluente, B: muestra de efluente con tratamiento terciario previo a la desinfección con luz ultravioleta, C: muestra de efluente con tratamiento terciario posterior a la desinfección con luz ultravioleta, +: muestra positiva, -: muestra negativa, 0: muestra no colectada, PTAR: Planta de Tratamiento de Agua Residual.

5.5. Caracterización molecular de los astrovirus humanos (clásicos y emergentes) y caninos de Uruguay

De las 43 muestras positivas para HAstV clásicos detectadas en las cuatro ciudades de la región oeste del Uruguay y de las 14 muestras positivas para HAstV clásicos detectadas en los afluentes de las PTAR de Melo y Treinta y Tres, fue posible secuenciar 31 y 12 muestras, respectivamente.

Con fines explicativos, cuando dos o más cepas uruguayas comparten una identidad nucleotídica de 100%, las mismas fueron agrupadas conjuntamente, definiendo así la existencia de 6 grupos de secuencias uruguayas (tabla 5).

Tabla 5. Grupos de cepas uruguayas idénticas de astrovirus humanos clásicos.

| | | | | | | | | | |
|---------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|--|-----------------|
| | A013-BU-03/2011 | | | | | | | | |
| | A015-BU-04/2011 | A065-SA-09/2011 | | | | A037-SA-06/2011 | | | A126-ME-04/2012 |
| | A034-FB-06/2011 | A069-SA-10/2011 | | | | A041-SA-06/2011 | | | A128-TT-04/2012 |
| | A035-PY-06/2011 | A083-SA-11/2011 | | | | A048-BU-07/2011 | | | A131-ME-06/2012 |
| Grupo 1 | A038-FB-06/2011 | Grupo 2 A101-SA-12/2011 | Grupo 3 A049-SA-07/2011 | Grupo 4 A008-SA-03/2011 | Grupo 5 A050-FB-08/2011 | Grupo 6 A134-TT-06/2012 | | | A140-ME-08/2012 |
| | A040-BU-06/2011 | A102-SA-01/2012 | A053-SA-08/2011 | A011-SA-03/2011 | A054-FB-08/2011 | A142-TT-10/2012 | | | A145-ME-10/2012 |
| | A042-FB-07/2011 | A105-SA-01/2012 | | | A056-BU-09/2011 | | | | |
| | A046-FB-07/2011 | A113-SA-02/2012 | | | | | | | |
| | A051-PY-08/2011 | | | | | | | | |

Cada grupo (1-6) está formado por secuencias con una identidad nucleotídica del 100% entre sí. Los nombres de las cepas uruguayas son codificadas de la siguiente manera: número de muestra-código de ciudad-fecha de colecta. BU: Bella Unión, SA: Salto, PY: Paysandú, FB: Fray Bentos, ME: Melo, TT: Treinta y Tres.

Las 43 cepas uruguayas agruparon con alto soporte de *bootstrap*, con los genotipos HAstV-1 (n=31), HAstV-2 (n=11) y HAstV-5 (n=1). En la tabla 6 se muestra la distribución de los casos positivos según el genotipo asignado mediante el análisis filogenético de acuerdo a la ciudad de colecta. HAstV-1 fue prevalente en todas las ciudades, con la excepción de la ciudad de Bella Unión en donde se registró el mismo número de casos positivos para HAstV-1 y HAstV-2. Dicho genotipo (HAstV-2) ocupó el segundo lugar en prevalencia en las ciudades de Salto y Fray Bentos, pero no fue detectado ni en Paysandú ni en Melo. A su vez, en Treinta y Tres fue detectado en una sola ocasión, al igual que el genotipo HAstV-5, cuya detección en esta ciudad constituye el único caso de este estudio. Del total de 57 muestras positivas, no fue posible genotipar 14 de ellas.

Tabla 6. Distribución del número de casos positivos para cada genotipo de astrovirus humanos clásicos caracterizados durante los monitoreos de acuerdo a la ciudad de colecta.

| Ciudad | Casos Positivos n (%) | HAstV-1 n (%) | HAstV-2 n (%) | HAstV-5 n (%) | Sin genotipar n (%) |
|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Bella Unión | 10 (18) | 3 (10) | 3 (27) | 0 | 4 (29) |
| Salto | 15 (26) | 9 (29) | 5 (45) | 0 | 1 (7) |
| Paysandú | 7 (12) | 3 (10) | 0 | 0 | 4 (29) |
| Fray Bentos | 11 (19) | 6 (19) | 2 (18) | 0 | 3 (21) |
| Melo | 6 (11) | 6(19) | 0 | 0 | 0 |
| Treinta y Tres | 8 (14) | 4(13) | 1(9) | 1(100) | 2(14) |
| Total | 57 | 31 | 11 | 1 | 14 |

Los casos sin genotipar son casos positivos de los cuales no fue posible obtener su secuencia nucleotídica.

Todas las cepas uruguayas de HAstV-1 agruparon junto a cepas de otras partes del mundo pertenecientes al linaje 1a (figura 8). La identidad a nivel nucleotídico entre las cepas uruguayas de HAstV-1a varió de 94,8% a 99,7% (figura 9) y a nivel aminoacídico todas fueron iguales, con la excepción de la cepa “URY/A157-ME-02/2013” que presentó una divergencia de 0,9% con el resto, provocado por el cambio aminoacídico entre Valina e Isoleucina en la posición 160 de la cápside con respecto a la cepa de referencia Oxford (número de acceso en GenBank: L23513) (figura 10a). Las cepas del linaje HAstV-1a agruparon en dos *clústers*, el mayor se formó con las cepas “URY/A017-PY-04/2011”, “URY/A114-FB-02/2012”, “URY/A157-ME-02/2013”, “URY/A70-TT-09/2011”, “URY/A163-ME-04/2013” y los grupos 1, 2, 3 y 6 en conjunto con cepas de otras partes del mundo como Rusia, Brasil, Honduras y Tailandia. El *clúster* menor comprende la cepa “URY/A006-FB-03/2011” y cepas de Japón, Rusia, Singapur y Honduras.

Las cepas uruguayas del genotipo HAstV-2 agruparon con cepas de otras partes del mundo de los linajes HAstV-2c y HAstV-2d (figura 8). La identidad entre las cepas uruguayas del genotipo HAstV-2 comprendió el rango entre 91,0% y 99,7% a nivel nucleotídico y fueron todas idénticas a nivel aminoacídico, a excepción de las cepas del grupo 4 (linaje HAstV-2c) que mostraron una divergencia del 0,9% con el resto, divergencia dada por el cambio aminoacídico entre Lisina y Arginina en la posición 195 de la cápside con respecto a la cepa de referencia Oxford (número de acceso a GenBank: L13745) (figura 10b). Siete cepas uruguayas (grupo 5), junto a las cepas “URY/A079-SA-10/2011” y “URY/A88-TT-11/2011” agruparon con cepas de otras partes del mundo (Italia, Brasil y Honduras) pertenecientes al linaje 2d. Las dos cepas uruguayas restantes del genotipo HAstV-2 (grupo 4) agruparon con secuencias de cepas del linaje 2c de otras partes del mundo (Colombia, India, Kenia, Tailandia e Italia).

La cepa “URY/A160-TT-04/2013” agrupó con cepas del genotipo HAstV-5 de Rusia y Brasil y con la secuencia de referencia de dicho genotipo (figura 8).

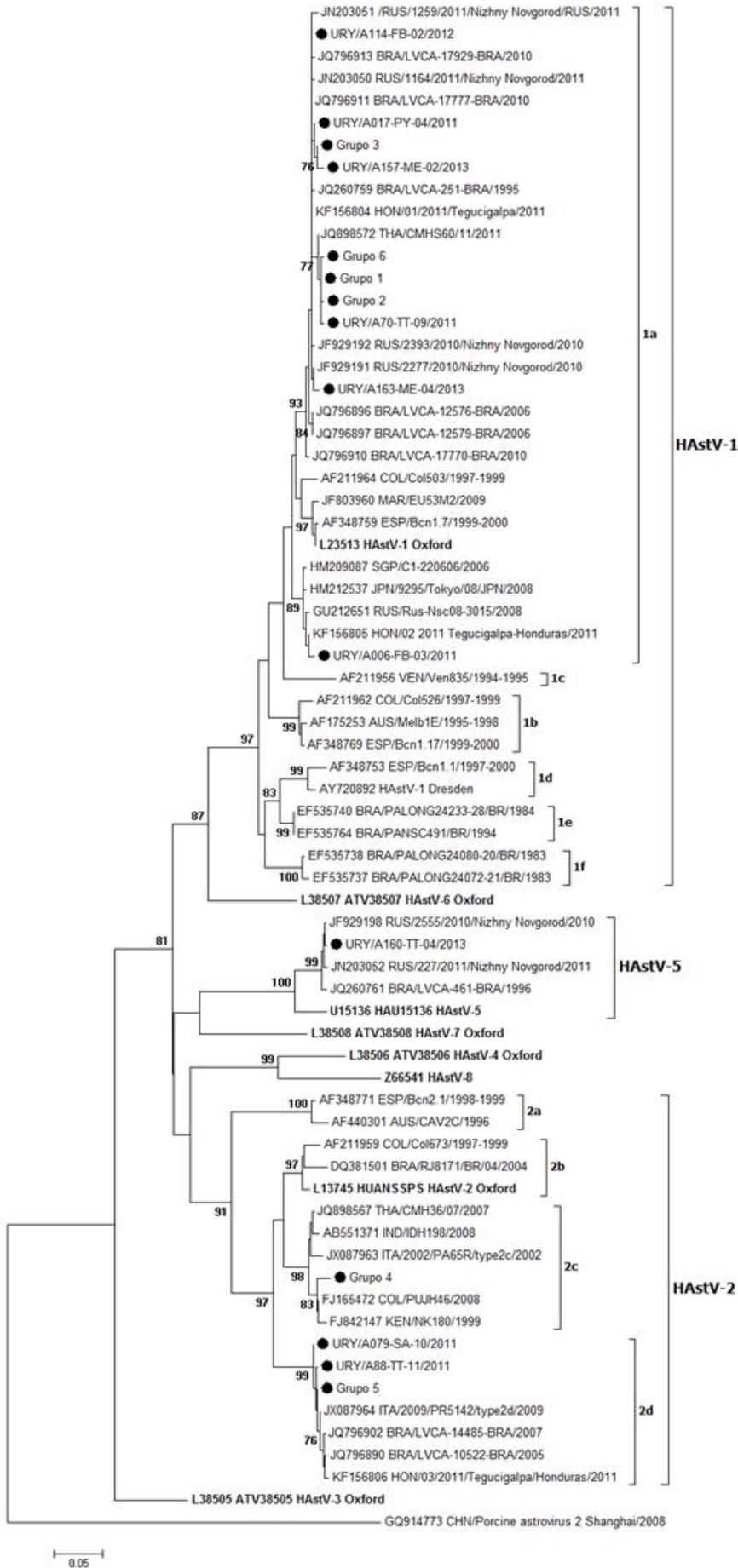


Figura 8. Análisis filogenético de las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos.

Análisis filogenético de secuencias nucleotídicas de la región parcial de 348 nt del ORF2 de HAstV clásicos de 43 cepas detectas en muestras de agua residual de seis ciudades de Uruguay. Los valores de *bootstrap* mayores a 75% son mostrados en los nodos. Las cepas y grupos de cepas uruguayas están precedidas por un círculo negro. Las cepas de referencia se indican en negrita. El árbol fue construido utilizando el método de *Neighbor Joining* y el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2-parámetros.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | |
|------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| URY/A114-FB-02/2012 | A | ID | 100 | 100 | 99,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| URY/A017-PY-04/2011 | B | 99,7 | ID | 100 | 99,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| Grupo_3 | C | 99,4 | 99,7 | ID | 99,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| URY/A157-ME-02/2013 | D | 98,8 | 99,1 | 99,4 | ID | 99,1 | 99,1 | 99,1 | 99,1 | 99,1 | 93,9 | 94,7 | 94,7 | 94,7 | 95,6 | |
| Grupo_6 | E | 98,8 | 98,5 | 98,2 | 97,7 | ID | 100 | 100 | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| Grupo_1 | F | 99,1 | 98,8 | 98,5 | 97,9 | 99,7 | ID | 100 | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| Grupo_2 | G | 98,8 | 98,5 | 98,2 | 97,7 | 99,4 | 99,7 | ID | 100 | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| URY/A70-TT-09/2011 | H | 98,8 | 98,5 | 98,2 | 97,7 | 99,4 | 99,7 | 99,4 | ID | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| URY/A163-ME-04/2013 | I | 99,1 | 98,8 | 98,5 | 97,9 | 98,5 | 98,2 | 97,9 | 97,9 | ID | 100 | 93 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| 1a_URY/A006-FB-03/2011 | J | 95,9 | 96,2 | 95,9 | 95,4 | 94,8 | 95,1 | 94,8 | 94,8 | 95,1 | ID | 93 | 93,9 | 93,9 | 96,5 | |
| Grupo_4 | K | 78,1 | 77,8 | 78,1 | 78,4 | 78,1 | 78,4 | 78,1 | 78,7 | 77,2 | 78,4 | ID | 99,1 | 99,1 | 99,1 | |
| URY/A079-SA-10/2011 | L | 79,3 | 79,5 | 79,8 | 80,4 | 78,7 | 79 | 78,7 | 79,3 | 78,7 | 80,1 | 91 | ID | 100 | 100 | |
| URY/A88-TT-11/2011 | M | 79 | 79,3 | 79,5 | 80,1 | 78,4 | 78,7 | 78,4 | 79 | 78,4 | 79,8 | 91 | 99,4 | ID | 100 | |
| Grupo_5 | N | 79 | 79,3 | 79,5 | 80,1 | 78,4 | 78,7 | 78,4 | 79 | 78,4 | 79,8 | 91,3 | 99,7 | 99,7 | ID | |
| URY/A160-TT-04/2013 | O | 78,4 | 78,1 | 78,1 | 77,8 | 78,1 | 78,4 | 78,7 | 78,7 | 78,1 | 78,7 | 76,1 | 76,1 | 75,8 | 76,1 | ID |

Figura 9. Identidad nucleotídica y aminoacídica entre las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos.

Los valores corresponden al porcentaje de identidad a nivel nucleotídico (de la diagonal de ID hacia abajo) y aminoacídico (de la diagonal de ID hacia arriba). Los porcentajes en beige y marrón comparan las cepas del genotipo HAstV-1 entre sí, mientras que en celeste y azul las del genotipo HAstV-2.

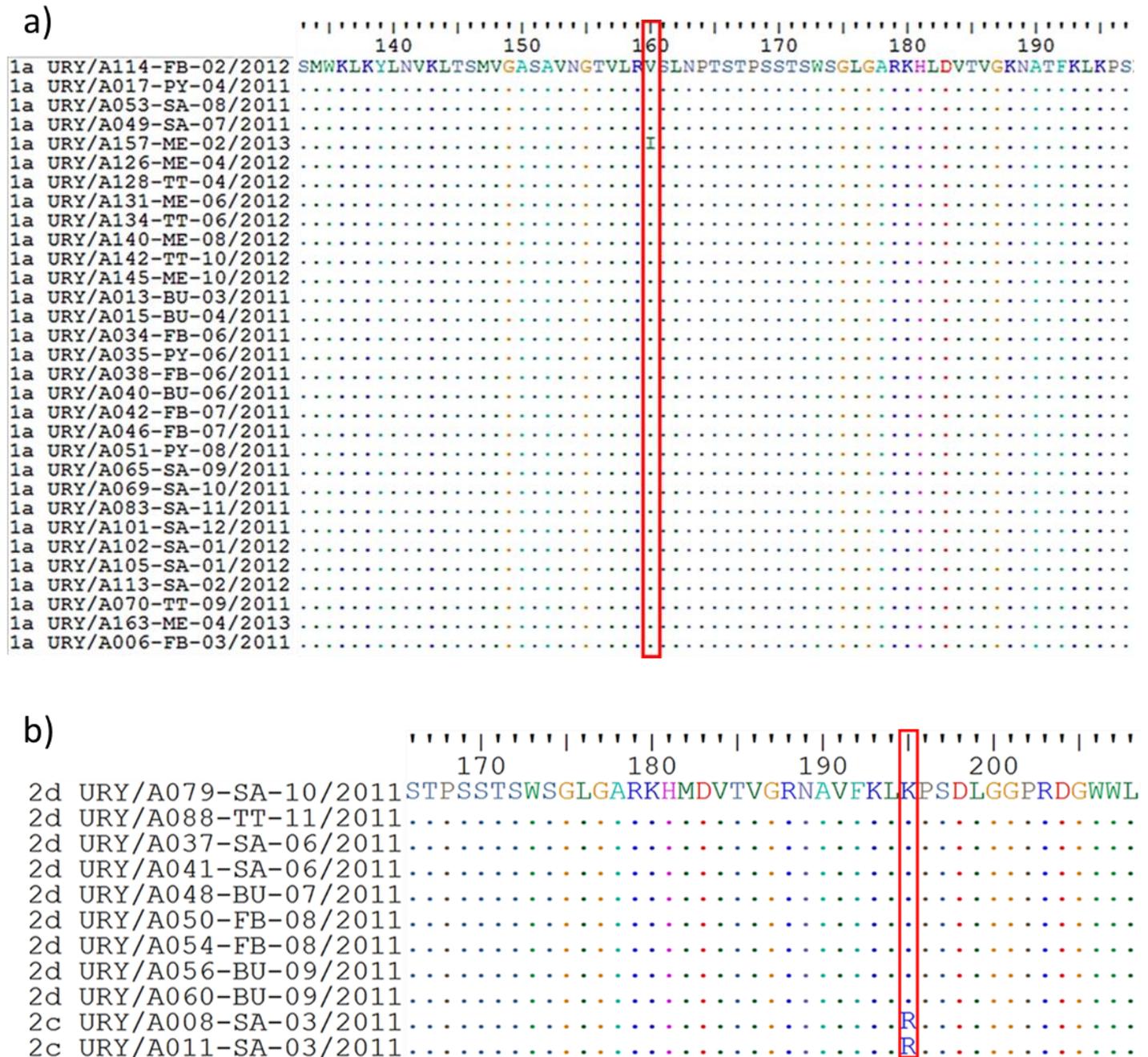


Figura 10. Cambios aminoacídicos resultantes de sustituciones no sinónimas en las cepas uruguayas de astrovirus humanos clásicos.

Alineamiento de aminoácidos de las cepas uruguayas del genotipo HAdV-1 (a) y del genotipo HAdV-2 (b). Las posiciones aminoacídicas son con respecto a las respectivas cepas de referencia Oxford (Números de acceso a GenBank: HAdV-1: L23513; HAdV-2: L13745).

Para conocer si los HAstV emergentes estaban presentes en Uruguay, se trabajó sobre el muestreo de las PTAR de Melo y Treinta y Tres. Para ello, las 57 muestras fueron testeadas con los cebadores SF0073 y SF0076 resultando en trece muestras positivas. Las mismas fueron objeto de reacciones de secuenciación para un segmento del ORF1b pudiendo secuenciar 8 de ellas, de las cuales cuatro fueron clasificadas mediante análisis filogenético como AstV canino (figura 11) con un porcentaje de identidad a nivel nucleotídico entre las mismas del 100% y entre 93,5% a 95,2% con cepas detectadas en 2008, 2011 y 2012 en Brasil (números de acceso a GenBank: JX878479 a JX878484) y de 96,1% con la cepa detectada en Italia en 2008 “Bari/2008” (número de acceso a GenBank: HM045005). Las restantes 4 muestras positivas para el ORF1b presentaron valores de identidad nucleotídica entre sí entre 99,4% y 100% y fueron clasificadas mediante análisis filogenético dentro del genotipo HAstV MLB-1 (figura 11). Las mismas agruparon junto a cepas referencia del genotipo HAstV MLB-1 con las cuales compartieron una identidad nucleotídica en el rango de 96,5% a 98,2%.

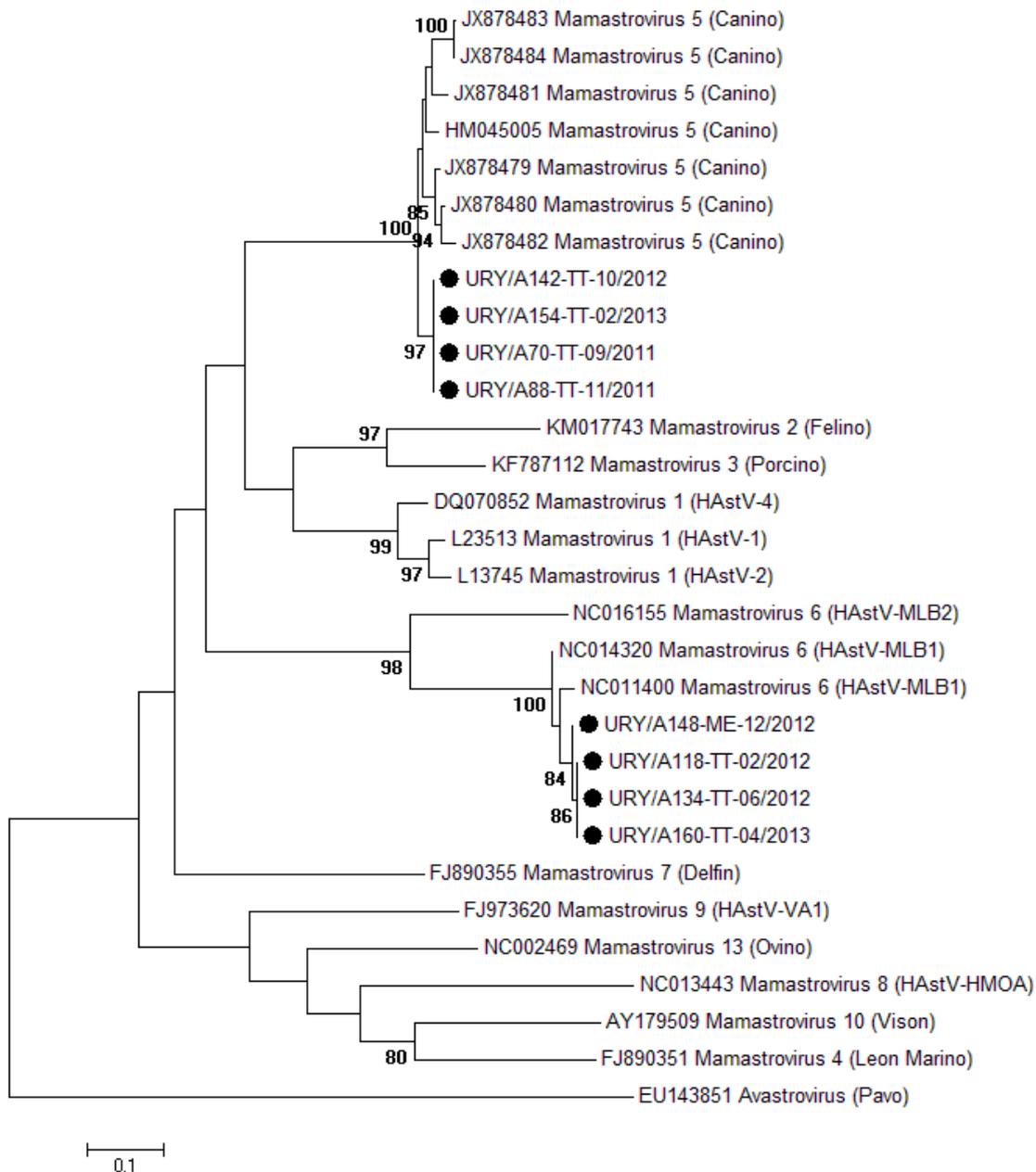


Figura 11. Análisis filogenético de la región parcial del ORF1b de astrovirus amplificado a partir de muestras de agua residual de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo y Treinta y Tres.

Los valores de *bootstrap* mayores a 75% son mostrados en los nodos. Las cepas uruguayas están precedidas por un círculo negro. El árbol fue construido utilizando el método de *Neighbor Joining* y el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros.

A pesar de haber intentado amplificar una región parcial del ORF2 (con los cebadores SF0053 y SF0061) de todas las cepas uruguayas MLB-1, esto solamente se logró para la cepa URY/A148-ME-12/2012. La secuencia de esta cepa fue alineada con secuencias reportadas en otras partes del mundo y se generó el árbol filogenético de la figura 12. Las secuencias de HAstV MLB-1 formaron dos *clusters* con un alto soporte de *bootstrap*, localizándose la secuencia uruguaya en el *clúster* más numeroso con cepas de Asia (Bután, China e India), África (Egipto) y Oceanía (Australia), mientras que el *clúster* minoritario comprendió secuencias de Estados Unidos e Italia. La cepa uruguaya URY/148-ME-12/2012 comparte una identidad nucleotídica entre 96.1% a 98.3% con cepas del *clúster* que las comprende y 90.8% a 91.9% con las cepas norteamericanas e italiana (anexo 3).

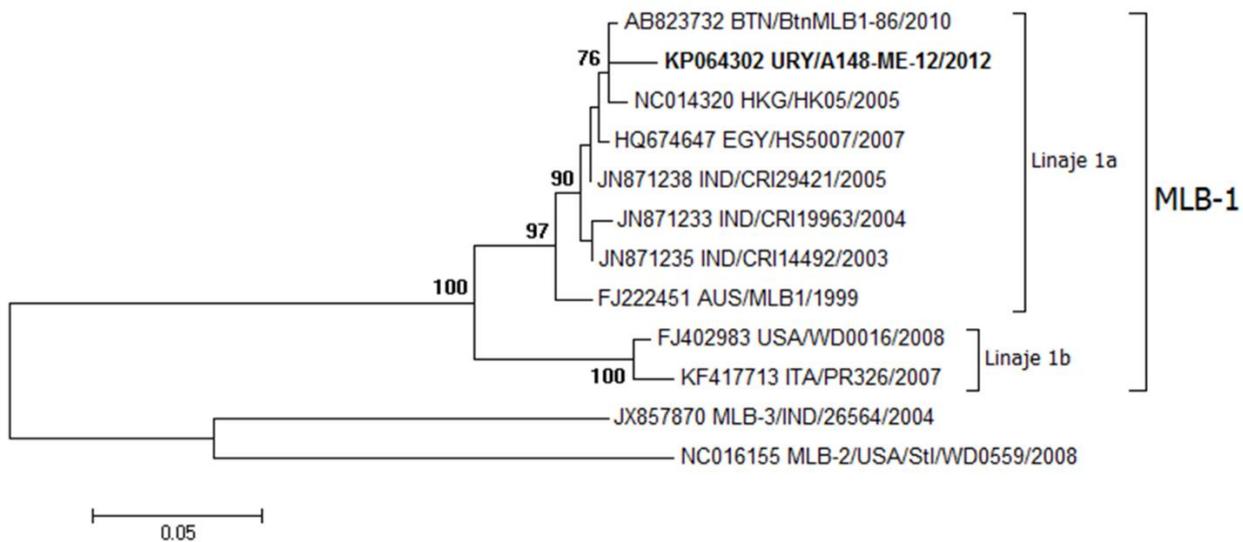


Figura 12. Análisis filogenético de la región parcial del ORF2 de la cepa MLB-1 detectada en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Melo.

Análisis filogenético basado en un segmento parcial de 362 pb del ORF2 de cepas de HAstV MLB-1, incluyendo la cepa detectada en la región este de Uruguay en el monitoreo de

aguas residuales realizado entre setiembre de 2011 y abril de 2013 junto a cepas detectadas en otras partes del mundo. Los valores de *bootstrap* mayores a 75% son mostrados en los nodos. La cepa de este estudio está indicada en negrita. El árbol fue construido utilizando el método de *Neighbor Joining* y el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2-parámetros.

La identidad nucleotídica del *clúster* mayoritario con respecto al minoritario osciló entre 90,8% y 92,5% (tabla 7) y cuando se analizó la identidad a nivel del ORF2 y del genoma completo, con las secuencias disponibles representativas de cada *clúster*, se obtuvieron valores entre 91,4% a 91,8% y 92,5% a 92,6%, respectivamente (tablas 8 y 9).

Se propone que cada *clúster* constituye un linaje distinto, denominando HAstV MLB-1a y HAstV MLB-1b al mayoritario y al minoritario, respectivamente (figura 12).

Tabla 7. Porcentaje de identidad nucleotídica en el fragmento de 362 pb del ORF2 de cepas de astrovirus humanos MLB-1.

| | FJ402983 USA/2008 | KF417713 ITA/2007 |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| AB823732_BTN/2010 | 92,5 | 91,9 |
| KP064302_URY/2012 | 91,9 | 90,8 |
| NC014320_HKG/2005 | 92,2 | 91,9 |
| HQ674647_EGY/2007 | 92,2 | 91,7 |
| JN871238_IND/2005 | 92,2 | 91,7 |
| JN871233_IND/2004 | 91,7 | 91,1 |
| JN871235_IND/2003 | 92,2 | 91,7 |
| FJ222451_AUS/1999 | 92,5 | 91,9 |

En amarillo se señalan las cepas del *clúster* mayoritario (MLB-1a) y en celeste las del minoritario (MLB-1b).

Tabla 8. Porcentaje de identidad nucleotídica en el ORF2 completo de cepas de astrovirus humanos MLB-1.

| | FJ402983_USA/2008 | KF417713_ITA/2007 |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| FJ222451_AUS/1999 | 91,8 | 91,6 |
| NC014320_HKG/2005 | 91,8 | 91,5 |
| AB823731_BTN/2010 | 91,7 | 91,4 |
| AB823732_BTN/2010 | 91,7 | 91,4 |

En amarillo se señalan las cepas del *clúster* mayoritario (MLB-1a) y en celeste las del minoritario (MLB-1b).

Tabla 9. Porcentaje de identidad nucleotídica en el genoma completo de cepas de astrovirus humanos MLB-1.

| | FJ402983_USA/2008 |
|-------------------|-------------------|
| FJ222451_AUS/1999 | 92,5 |
| NC014320_HKG/2005 | 92,5 |
| AB823731_BTN/2010 | 92,6 |
| AB823732_BTN/2010 | 92,6 |

En amarillo se señalan las cepas del *clúster* mayoritario (MLB-1a) y en celeste las del minoritario (MLB-1b).

Como se muestra en la tabla 10, 11 polimorfismos conservados de nucleótidos están presentes en el segmento estudiado del ORF2, diferenciando los dos *clústers* formados en el árbol filogenético de HAsV MLB-1 de la figura 12. Adicionalmente, cuando la secuencia deducida de aminoácidos del ORF2 de cepas representativas de cada *clúster* es examinado, se pueden observar 12 cambios fijos de aminoácidos y la delección de un codón (tabla 11), permitiendo la diferenciación de cada *clúster*.

Tabla 10. Polimorfismos de nucleótidos conservados en el segmento del ORF2 que difieren entre los dos grupos de cepas de astrovirus humanos MLB-1.

| Cepa/posición | 489 | 504 | 525 | 579 | 594 | 606 | 618 | 648 | 711 | 750 | 822 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>FJ222451/AUS/1999</i> | C | T | T | A | G | A | T | T | C | T | A |
| KP064302/URY/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| AB823731/BTN/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| AB823732/BTN/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| HQ674647/EGY/2007 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| HQ674648/EGY/2007 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| HQ674649/EGY/2007 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| HQ674650/EGY/2007 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NC014320/CHN/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871249/IND/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871245/IND/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871243/IND/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871238/IND/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871240/IND/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871239/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871233/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871241/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871244/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871246/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871234/IND/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871235/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871236/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871237/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871242/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871247/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871248/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| JN871250/IND/2003 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| FJ402983/USA/2008 | T | C | C | G | A | G | C | C | T | C | G |
| KF417713/ITA/2007 | T | C | C | G | A | G | C | C | T | C | G |

Las columnas representan la posición del nucleótido en el ORF2 tomando como referencia a la cepa AUS/1999 (número de acceso en GenBank: FJ222451). Las cepas están denominadas por su número de acceso en GenBank, el código de país de tres letras (norma ISO3166) y el año de detección. La cepa uruguaya de HAstV MLB1 es indicada en negrita. Los colores amarillo y celeste señalan los linajes MLB-1a y MLB-1b, respectivamente.

Tabla 11. Sitios informativos en la secuencia de aminoácidos de la cápside de astrovirus humanos MLB-1.

| <i>Cepa / Aminoácido-posición</i> | 29 | 30 | 45 | 57 | 105 | 470 | 505 | 523 | 537 | 662 | 665 | 669 | 691 |
|-------------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>FJ222451/AUS/MLB1/1999</i> | S | T | F | T | A | I | V | A | N | S | G | D | L |
| <i>NC014320/CHN/HK05/2005</i> | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>AB823731/BTN/BtnMLB1-40/2010</i> | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | . |
| <i>AB823732/BTN/BtnMLB1-86/2010</i> | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | . |
| <i>KF417713/ITA/PR326/2007</i> | T | V | Y | I | S | V | I | S | S | T | - | Y | V |
| <i>FJ402983/USA/WD0016/2008</i> | T | V | Y | I | S | V | I | S | S | T | - | Y | V |

Las posiciones de los aminoácidos están indicadas con respecto a la secuencia de la proteína de cápside de la cepa AUS/1999 (número de acceso en GenBank: FJ222451). Las cepas están denominadas por su número de acceso en GenBank, el código de país de tres letras (norma ISO3166), el nombre de la cepa y el año de detección. Los colores amarillo y celeste señalan los linajes MLB-1a y MLB-1b, respectivamente. Nótese que en la posición 665 el linaje MLB-1a presenta un aminoácido que está ausente en el linaje MLB-1b.

5.6. Patrones temporales y geográficos de los HAstV clásicos en Uruguay

Cepas de HAstV clásicos fueron detectadas en el agua residual de las seis ciudades de Uruguay que este estudio abarcó. Mientras que el genotipo HAstV-1 fue detectado en todas las ciudades, no hubo detección de HAstV-2 en las ciudades de Paysandú y Melo, mientras que el genotipo HAstV-5 fue detectado únicamente en la ciudad de Treinta y Tres (figura 13).

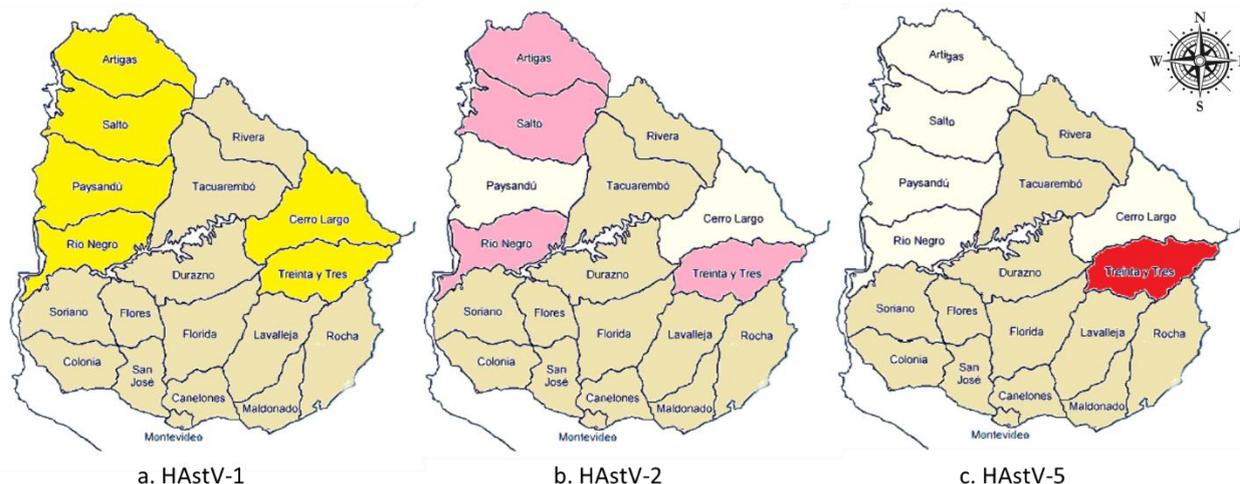


Figura 13. Patrón geográfico de detección para los genotipos de astrovirus humanos clásicos caracterizados en este estudio a partir de muestras de agua residual en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Melo y Treinta y Tres.

En a) se muestra en amarillo los departamentos en que se detectó HASTV-1. En b) se muestran en color rosa los departamentos donde se detectó HASTV-2 y en c) se muestra en color rojo el departamento donde se detectó el genotipo HASTV-5. En color beige se muestran los departamentos no incluidos en este estudio.

Las cepas del genotipo HASTV-1 circularon a lo largo de cada período de muestreo en cada región del país sin que se presente un patrón de estacionalidad determinado. Por otro lado, las cepas del genotipo HASTV-2 que circularon en las aguas residuales de las cuatro ciudades de la región oeste de Uruguay entre junio y octubre pertenecieron al linaje 2d y las cepas que pertenecieron al linaje 2c circularon únicamente en marzo (figura 14A). En la región este del país, el genotipo HASTV-2 fue detectado por única vez en el mes de noviembre de 2011 perteneciendo al linaje 2d y el HASTV-5 en el mes de abril de 2013 (figura 14B).

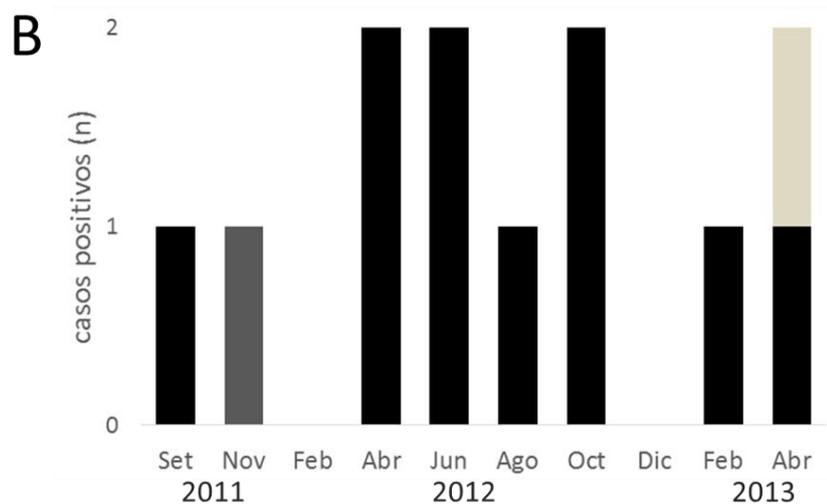
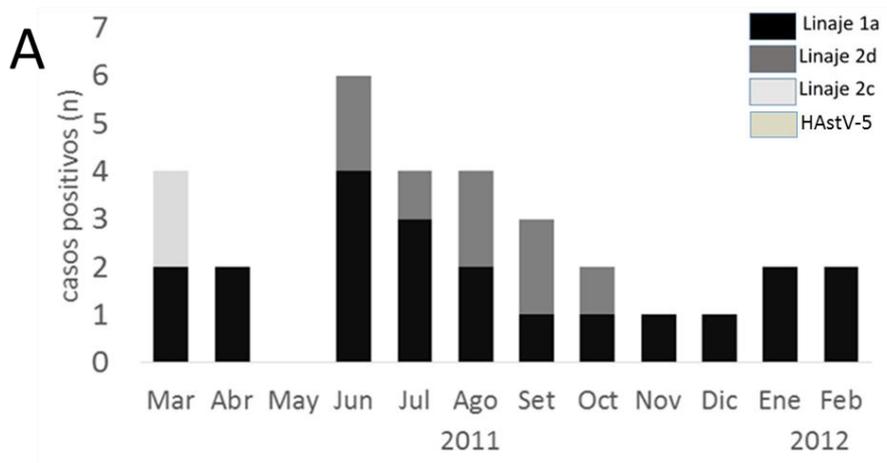


Figura 14. Distribución temporal de astrovirus humanos clásicos en aguas residuales de Uruguay.

En A) el gráfico muestra el total de muestras positivas genotipadas para HAsTV clásicos para cada linaje dentro de los genotipos HAsTV-1 y HAsTV-2 en las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos en el período comprendido entre Marzo de 2011 y Febrero de 2012. En B) se suma la detección del genotipo HAsTV-5 a los linajes HAsTV-1a y HAsTV-2d en el total de muestras positivas genotipadas de HAsTV clásicos en las Plantas de Tratamiento de agua residual de Melo y Treinta y Tres en el período comprendido entre Setiembre de 2011 y Abril de 2013.

5.7. Determinación de la tasa de evolución y la edad del ancestro común más reciente de los HAstV MLB-1

Para determinar la tasa de evolución del genotipo HAstV MLB-1 se trabajó con la totalidad de secuencias del ORF2 disponibles en GenBank que estuvieran asociadas a publicaciones en revistas arbitradas, significando un conjunto de 29 secuencias nucleotídicas de 362 pb (fue incluida la secuencia de la cepa HAstV MLB-1 uruguaya). El modelo que mejor se ajustó a este conjunto de secuencias fue el Tamura Nei + gamma con un LnL de -857,30 y un AIC de 1726,60. No se encontró evidencia de recombinación cuando las secuencias fueron sometidas a un análisis con la herramienta GARD.

Se utilizó el modelo TN93+Gamma y 100 millones de generaciones en un muestreo Monte Carlo vía Cadenas de Markov en la prueba de varios modelos de dinámica poblacional (tamaño constante de la población, crecimiento exponencial, crecimiento expansional, crecimiento logístico y el skyline bayesiano) para estimar la distribución posterior del tamaño efectivo de la población a través del tiempo a partir del conjunto de secuencias parciales del ORF2 de HAstV MLB-1. Este análisis permitió coestimar la tasa de evolución y la dinámica de poblaciones ancestrales dentro de un único análisis.

Dependiendo del modelo demográfico empleado, la tasa de evolución para el genotipo HAstV MLB-1 osciló entre $1,90E-3$ y $1,72E-3$ sustituciones por sitio por año (s/s/a) y el tMRCA (tiempo al ancestro común más reciente) se estableció entre 36,4 y 43,1 años antes del 2012 (año en que fue detectada la cepa HAstV MLB-1 uruguaya, la cual es la más recientemente reportada en GenBank (tabla 12).

El tMRCA para los linajes HAstV MLB-1a y HAstV MLB-1b osciló entre 19,5 y 20,5 y entre 8,3 y 8,8 años antes del 2012, respectivamente (tabla 12).

Según el análisis de *Bayes Factor*, el modelo poblacional de tamaño constante mostró ajustarse mejor que el resto a nuestros datos, por lo cual se utilizó este modelo para realizar la reconstrucción filogenética datada que se muestra en la figura 15. La cepa uruguaya (en rojo) presenta un ancestro en común con una cepa de la India (número de acceso a GenBank: JN871239) 8,7 años antes de que se detectara en nuestro país.

Tabla 12. Tasas de evolución y edad del ancestro común más reciente de acuerdo a los modelos demográficos para los HAstV MLB-1a y MLB-1b.

| | Tasa Evolución MLB-1 | | tMRCA MLB-1 | | tMRCA MLB-1a | | tMRCA MLB-1b | |
|--------------------|----------------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | <i>min</i> | <i>max</i> | <i>min</i> | <i>max</i> | <i>min</i> | <i>max</i> | <i>min</i> | <i>max</i> |
| Constante | 1,72E-03 | | 43,1 | | 20,32 | | 8,48 | |
| | 7,51E-04 | 2,73E-03 | 17,6 | 72,5 | 14,34 | 28,32 | 5,45 | 13 |
| Expansional | 1,77E-03 | | 41,6 | | 20,15 | | 8,45 | |
| | 7,60E-04 | 2,86E-03 | 17,0 | 70,1 | 14,15 | 27,88 | 5,39 | 12,91 |
| Exponencial | 1,84E-03 | | 39,8 | | 19,88 | | 8,28 | |
| | 7,74E-04 | 3,02E-03 | 14,8 | 66,2 | 14,2 | 27,54 | 5,32 | 12,35 |
| Logístico | 1,90E-03 | | 36,4 | | 19,54 | | 8,34 | |
| | 6,83E-04 | 3,23E-03 | 13,1 | 60,3 | 14,03 | 26,78 | 5,13 | 12,27 |
| Skyline | 1,83E-03 | | 43,0 | | 20,47 | | 8,75 | |
| | 6,42E-04 | 3,37E-03 | 13,0 | 73,7 | 14,16 | 29,32 | 5,25 | 13 |

La tasa de evolución está expresada en número de sustituciones por sitio por año (s/s/a).

La edad del ancestro común más reciente (tMRCA) está expresada en número de años antes del 2012. La misma se calculó para el genotipo HAstV MLB-1 y para ambos linajes propuestos en este estudio (HAstV MLB-1a y MLB-1b). Los valores de min y máx corresponden al 95% HPD *lower* y *upper*, respectivamente.

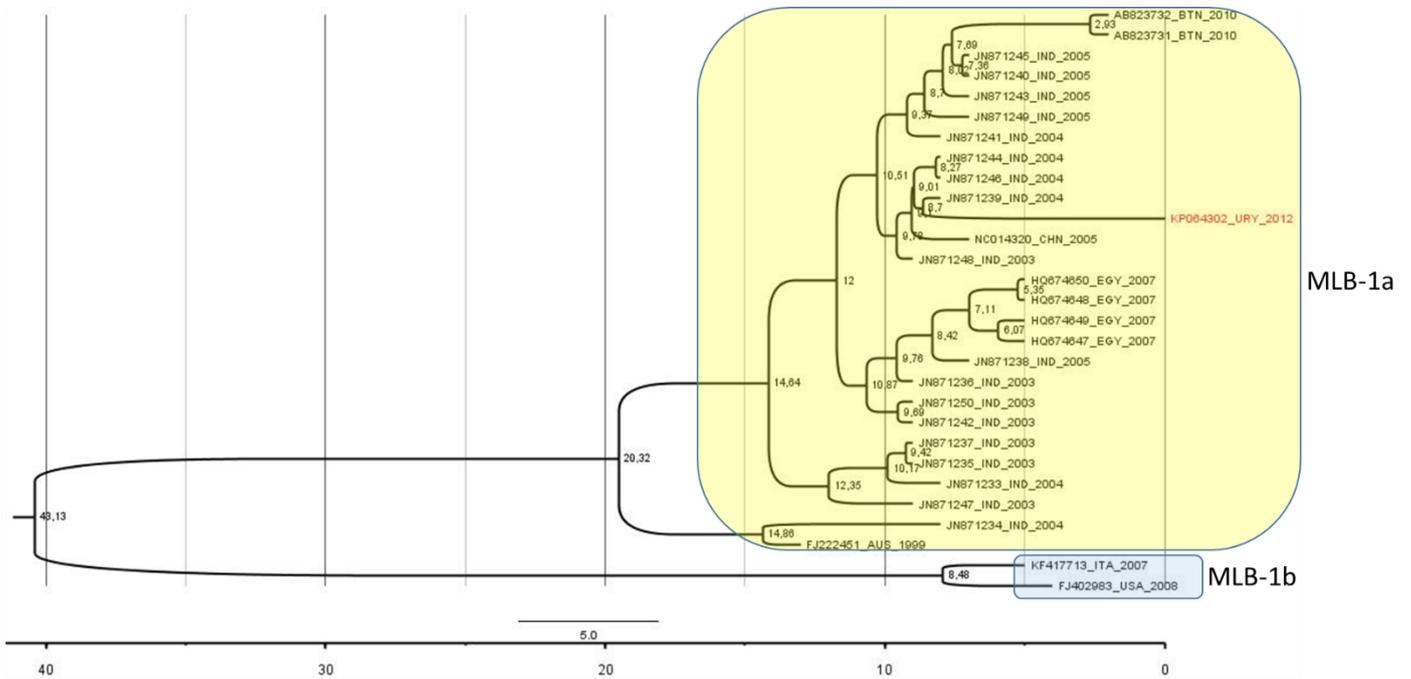


Figura 15. Análisis filogenético reconstruido a partir de un segmento del ORF2 de astrovirus humanos MLB-1 con coalescencia estimada en el programa *Beast* V.1.8.0.

La edad media de los distintos ancestros se muestra en los nodos (expresada como años antes de 2012). El modelo de tamaño constante se utilizó como *prior* del árbol del coalescente. Los valores de 95% *Highest Posterior Density* para los nodos de coalescencia del genotipo HAstV MLB-1, como de cada uno de los linajes que lo componen (señalados en amarillo para el linaje HAstV MLB-1a y en celeste para el linaje HAstV MLB-1b) se muestran en la tabla 12. La cepa uruguaya de HAstV MLB-1 se muestra en color rojo. Cada cepa es nombrada por su número de acceso a GenBank, el código de país de tres letras (norma ISO3166) y el año en que fue colectada la muestra.

6. DISCUSIÓN

6.1. Monitoreo y dinámica de los HAstV clásicos en las aguas residuales del Uruguay

A partir de los dos muestreos realizados para esta tesis fue posible determinar la frecuencia y la dinámica del vertido de HAstV clásicos presentes en el agua residual en cursos naturales de agua de nuestro país.

Con la excepción de la ciudad de Bella Unión, donde el agua residual es colectada hacia una laguna de decantación antes de ser vertida en el río, las restantes ciudades del litoral del Río Uruguay (Salto, Paysandú y Fray Bentos) vierten directamente sus aguas residuales sin tratar en este curso de agua. Por otro lado, en las ciudades de Melo y Treinta y Tres, el agua residual doméstica es colectada por el sistema de saneamiento hacia dos PTAR, las cuales depuran la misma mediante un tratamiento terciario con un paso final de desinfección mediante luz ultravioleta.

Considerando el muestreo de las ciudades sobre el Río Uruguay, Salto aparece como la ciudad que más frecuentemente vierte HAstV a través de sus aguas residuales ya que los HAstV fueron detectados en 10 de los 12 meses del monitoreo. Si bien Bella Unión presenta una laguna de decantación, no se observó que dicha ciudad lograra efluentes de mayor calidad en comparación con las ciudades que no cuentan con tratamiento, observándose por ejemplo, una mayor frecuencia de detección para HAstV en Bella Unión en comparación con Paysandú. A su vez, tampoco mostró una carga viral inferior en comparación a las restantes ciudades. Recientemente, se comenzó a cuestionar la eficiencia de los sistemas de lagunaje en la remoción de virus entéricos y al parecer resta mucho

por conocer sobre cómo funciona este tipo de tratamiento en la remoción viral, el cual está extendido ampliamente en el mundo (Symmonds et al. 2014; Verbyla y Mihelcic, 2015).

Por otro lado, un monitoreo mensual de HAstV en agua residual de dos ciudades chinas realizado durante un año (Zhou et al. 2014), reportó la detección de este virus en una frecuencia menor a la reportada en Salto, aunque similar a la de Paysandú, lo cual indica que las diferencias entre los estudios realizados en distintas partes del planeta se deban posiblemente a diferentes realidades epidemiológicas y no sólo a diseños experimentales diferentes.

Si bien las técnicas moleculares empleadas en este estudio se basan en la detección de un fragmento del genoma del virus y no consideran su capacidad infectiva, existen reportes que indican la existencia de partículas infecciosas de HAstV en matrices acuáticas (Pintó et al. 1996; Chapron et al. 2000; Espinosa et al. 2008). Adicionalmente, se ha reportado que los virus entéricos son capaces de mantener su capacidad infectiva, incluso luego de los tratamientos realizados al agua residual (La Rosa et al. 2010). Además, se ha propuesto que si el ARN del genoma de un virus es detectado por PCR a partir de una muestra de agua residual, ello indica la presencia reciente, o la existencia de un virus potencialmente viable (Limsawat y Ohgaki, 1997). En tal sentido, el vertido de aguas residuales sin tratamiento alguno en el Río Uruguay es una problemática que debe ser solucionada y constituye una realidad a ser considerada al momento de establecer las políticas sanitarias y de salud pública de la poblaciones que desarrollan sus actividades en torno a este importante curso natural de agua.

En Uruguay, se consideran parámetros microbiológicos bacterianos para determinar la calidad del agua (Artículo 253/79 del Poder Ejecutivo), sin embargo, existe fuerte evidencia que demuestra la inexistente relación entre el nivel de contaminación bacteriano y viral en matrices acuáticas (Bosch et al. 1998; Pusch et al. 2005; Payment y Locas, 2011; He et al. 2012), por lo cual basarse únicamente en indicadores de origen bacteriano podría significar un riesgo importante para la salud humana y animal en tanto se desconoce totalmente la posible contaminación viral. A pesar de que en otras latitudes se ha reportado la ausencia de HAstV en agua residual y superficial (Egglestone et al. 1999), el caso de Uruguay es totalmente diferente, ya que la frecuencia de detección y su concentración reportados en este trabajo, muestran que el Río Uruguay es un sumidero permanente de HAstV clásicos, entre otros virus entéricos, debido a la inexistencia de tratamientos de agua residual en estas ciudades que sean capaces de mitigar la contaminación del agua.

En el muestreo en la zona este del país, en las ciudades de Melo y Treinta y Tres, la realidad es diferente a la observada en las ciudades localizadas sobre el Río Uruguay. Aquí funcionan dos PTARs que reciben las aguas residuales mediante el sistema de saneamiento y realizan un tratamiento terciario con un proceso final de desinfección mediante luz ultravioleta con la finalidad de remover los contaminantes químicos y biológicos.

El tratamiento del agua residual acoplado a uno o varios procesos finales de desinfección son realizados con la finalidad de reducir la circulación de patógenos y consecuentemente el riesgo de infección para los seres humanos que entran en contacto con estas aguas residuales, o con las aguas superficiales que las reciben (Gantzer et al. 1998). En el monitoreo que realizamos en ambas PTAR se colectó muestra de afluente (agua

residual cruda) y muestras de efluente terciario colectadas antes y después de la desinfección con luz ultravioleta. Los HAstV presentes en cada muestra fueron detectados por PCR cualitativa y los casos positivos fueron cuantificados por PCR en tiempo real. Otros estudios han determinado la presencia y concentración de los HAstV clásicos en muestras de agua residual afluyente y efluente en PTAR (Guimaraes et al. 2008; Aw y Gin, 2010; He et al. 2011; Fumian et al. 2013). En tal sentido, tanto en la PTAR de Melo como en la de Treinta y Tres se detectó HAstV más frecuentemente a lo reportado en las PTARs de Brasil (Guimaraes et al. 2008; Fumian et al. 2013) y China (He et al. 2011). Sin embargo, Aw y Gin (2010) reportaron una frecuencia de detección de HAstV de 100% en las muestras de afluyente y efluente secundario tratado con lodos activado en tres PTAR de Singapur en un monitoreo de seis meses de duración con colectas mensuales, lo cual sumado a nuestros datos plantea la necesidad de tratamientos a nivel terciario con procesos de desinfección microbiológica en el tratamiento de efluentes.

Nuestros datos muestran que en ambas PTAR, el número de casos positivos detectado en afluentes, baja drásticamente con el proceso de tratamiento. En el ambiente, los virus entéricos se encuentran predominantemente asociados a partículas de la materia orgánica (Sakoda et al. 1997) debido a la atracción electrostática e interacciones hidrofóbicas (Wait y Sobsey, 1983; Gerba, 1984). Por lo tanto, la disminución observada de casos positivos en ambas PTAR, desde la muestra de afluyente hasta la muestra de efluente tratado terciariamente sin luz UV, posiblemente sea la consecuencia de la reducción de los niveles de materia orgánica en el agua residual mediante el proceso de lodos activados.

La luz ultravioleta puede impactar en el virus tanto a nivel de los nucleótidos que conforman el genoma como a nivel de los aminoácidos que conforman la cápside (Nuanualsuwan y Cliver, 2003; Eischeid y Linden, 2011). A su vez, las reacciones que tienen lugar en el genoma o en las proteínas durante la desinfección pueden formar subproductos que reaccionen luego con los aminoácidos y los nucleótidos y así en el proceso de desinfección, alterar las estructuras o funciones del virus en cuestión (Wigginton y Kohn, 2012). Interesantemente, en un estudio comparativo de varias tecnologías y procesos para la remoción de microorganismos en PTAR, se ha reportado que la desinfección con luz ultravioleta luego del tratamiento secundario fue responsable de una significativa remoción adicional de microorganismos, más allá de lo efectuado por el tratamiento con lodos activados (Francy et al. 2012). En nuestro estudio, en la PTAR de Melo, las dos muestras positivas provenientes del proceso de tratamiento terciario fueron negativas después de la desinfección con luz UV y se logró un 100% de efluentes libres de HAstV a lo largo del monitoreo. No obstante, en la PTAR de Treinta y Tres, la desinfección con luz UV no resultó en la remoción de los HAstV que lograron permanecer a lo largo del proceso de tratamiento y por ende, en dos ocasiones los efluentes vertidos al curso natural de agua donde la PTAR descarga, contenían HAstV en una concentración promedio de $4,8E5$ copias genómicas por litro. Si bien es posible lograr efluentes con carga viral promedio inferior a este valor tal como reportaron Aw y Gin (2010), en nuestro estudio se reporta la remoción total de HAstV en el 75% de los afluentes al final del proceso en la PTAR de Treinta y Tres, mientras que dichos autores reportan la persistencia de HAstV en el 100% de los afluentes al final del proceso.

En la PTAR de Treinta y Tres, en los muestreos donde tanto el afluente, como los efluentes fueron positivos para HAstV, el análisis de la identidad nucleotídica de las secuencias de las respectivas cepas demostró que aparentemente se trata de un mismo virus que ingresa en la PTAR, resiste los distintos tratamientos y finalmente es liberado en el efluente al curso de agua natural, ya que una identidad de 100% a nivel nucleotídico fue evidenciado (anexo 3) entre las secuencias obtenidas en estos casos.

En los tratamientos de desinfección mediante luz UV es importante considerar que los microorganismos pueden protegerse en la materia orgánica disminuyendo la eficiencia del proceso. Sustancias orgánicas comúnmente encontradas en las PTAR como son las partículas de lodos activados o de ácidos húmicos han demostrado impedir la interacción entre los rayos UV y los patógenos asociados (Templeton et al. 2005). Por lo tanto, si consideramos nuestros resultados, sugerimos que una mayor turbidez presente en los efluentes de la PTAR de Treinta y Tres permitió que los HAstV fueran detectados a pesar de ser sometidos a desinfección con luz UV. Dicha turbidez habría evitado o disminuido la incidencia de la radiación sobre las partículas virales. Sin embargo, la presencia de estos HAstV en los efluentes tratados con luz UV de Treinta y Tres podrían no significar un riesgo para la población que entra en contacto con las aguas donde son vertidos dichas aguas residuales, ya que la detección de un fragmento del genoma de HAstV, no implica que se trate de un virus infeccioso, ya que existe la posibilidad de que la luz UV haya perjudicado la capacidad infectiva del virus, lo cual ha sido reportado previamente para otros virus entéricos (Francy et al. 2012).

6.2. Caracterización molecular de HAstV clásicos en Uruguay

Este estudio constituye en Uruguay la primera caracterización molecular de los HAstV clásicos que circulan en el país. Dicha caracterización fue realizada a partir de muestras de agua residual colectadas en seis ciudades del interior del país. Este abordaje ambiental, no solo permitió obtener un conocimiento inicial sobre las variantes de HAstV clásicos que circulan en dos regiones del Uruguay, sino que también permitió expandir nuestro conocimiento sobre la epidemiología molecular de este virus en este tipo de matriz ya que si bien algunos estudios han evidenciado la prevalencia del HAstV-1 en el agua residual sobre los demás genotipos clásicos, al igual que como se ha observado en la clínica (Nadan et al. 2003; Meleg et al. 2006; Aw and Gin, 2010; Fumian et al. 2013), otros estudios han discordado con ello y han reportado la presencia de otros genotipos como prevalentes en el ambiente (Rodríguez-Díaz et al. 2009; Zhou et al. 2014).

En la región de América Latina y el Caribe, han sido realizados pocos estudios de HAstV clásicos en muestras ambientales (Guimarães et al. 2008; Miagostovich et al. 2008; Espinosa et al. 2009; Rodríguez-Díaz et al. 2009; Fumian et al. 2013). Sin embargo, la epidemiología molecular de los HAstV clásicos realizada a partir de casos clínicos ha mostrado la ocurrencia de varios genotipos en países de la región como Brasil, Argentina, Chile y Colombia, siendo el HAstV-1 el prevalente con la presencia de HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4 y HAstV-5 en menor medida (Gaggero et al. 1998; Medina et al. 2000; Espul et al. 2004; Victoria et al. 2007; Ferreira et al. 2012). No obstante, en México el genotipo HAstV-2 ha demostrado predominancia, seguido en orden decreciente por HAstV-4, HAstV-3, HAstV-1 y HAstV-5 (Walter et al. 2001). La predominancia del HAstV-1 en las muestras de agua residual de Uruguay está en concordancia con lo reportado en la mayoría de los estudios

citados anteriormente, sin embargo, Rodríguez-Díaz y colaboradores (2009) reportaron una alta prevalencia del HAstV-8 como el único genotipo detectado en el agua residual de Caracas en Venezuela y Zhou y colaboradores (2014) reportaron una predominancia del HAstV-5 en el agua residual de la ciudad de Linyi en China.

La caracterización molecular a nivel de linajes realizada en este estudio demostró que el linaje 1a del HAstV-1 circula a lo largo del año y que los linajes 2c y 2d del HAstV-2 circulan esporádicamente, así como el HAstV-5, el cual solamente fue detectado en una ocasión. Futuros estudios son necesarios para identificar un posible patrón de estacionalidad para cada uno de estos genotipos y linajes ya que hasta el momento los estudios de estacionalidad realizados en todo el mundo no contemplan los diferentes genotipos (Méndez y Arias, 2013).

Desafortunadamente, hasta el momento, Uruguay carece de datos acerca de la prevalencia de HAstV en los casos de gastroenteritis. No obstante, mediante un estudio de vigilancia ambiental para HAstV, como el aquí realizado, es posible caracterizar no solo las cepas relacionadas a una infección sintomática, sino también aquellas causantes de infecciones leves o asintomáticas que por lo general no derivan en una consulta médica (Meleg et al. 2006; Bosch et al. 2008). Previamente, se ha reportado que existe un alto porcentaje de identidad entre las cepas de HAstV detectadas en estudios clínicos con las detectadas en el ambiente (Nadan et al. 2003) y que incluso en el caso de otros virus entéricos puede existir una correlación entre los genotipos y prevalencia de los mismos en muestras clínicas y ambientales (Barril et al. 2010). Por lo tanto, posiblemente, cepas muy similares a las que aquí caracterizamos estén causando casos de gastroenteritis en la población uruguaya.

Todas las cepas uruguayas determinadas como HAstV-1 en este estudio pertenecen al linaje 1a. Este linaje ha sido observado reemplazando a los linajes 1b y/o 1d en un corto período de tiempo en Tailandia, Italia y España (Guix et al. 2002; Malasao et al. 2012; Medici et al. 2012; De Grazia et al. 2013), aunque también se ha observado su co-circulación con estos dos linajes luego de largos períodos de circulación como linaje único como ha sucedido en Corea del Sur y Brasil (Silva et al. 2006; Gabbay et al. 2007a; Aragão et al. 2010; Jeong et al. 2011). Estudios adicionales futuros en muestras de aguas residuales y clínicas son necesarios en nuestro país para conocer el patrón de circulación, la alternancia de linajes de este genotipo y su posible implicancia en los casos de gastroenteritis aguda en la población.

Por otro lado, el linaje 2d de HAstV-2 fue el último linaje propuesto dentro de este genotipo cuando emergió en Italia en 2009 (Medici et al. 2012), aunque cepas de HAstV-2 que causaron un brote de gastroenteritis en 2004 en una población indígena del sudeste brasilero pertenecieron a este linaje (Gabbay et al. 2006). De acuerdo a nuestros resultados, en América Latina, el linaje 2d continúa circulando hasta la actualidad en diferentes países, como Honduras y Uruguay. El linaje 2c fue propuesto por De Grazia y colaboradores en 2011 a partir del estudio de cepas que emergieron en Italia en 2002 y ha mostrado una distribución global debido a que varias cepas detectadas en diferentes partes del mundo agruparon con las cepas italianas. Interesantemente, en Uruguay, cepas del linaje 2c fueron detectadas únicamente en Salto en Marzo de 2011. A su vez, en esta ciudad fue donde se observó la mayor frecuencia y diversidad genética de HAstV clásicos, lo cual podría estar explicado por la dinámica de la población salteña, la cual está muy influenciada por la

presencia de turistas extranjeros atraídos por su red de parques acuáticos termales, los cuales podrían significar la introducción de variantes importadas en nuestro país, desde donde se diseminan hacia la población uruguaya favorecidas por su facilidad de transmisión hídrica.

Todas las cepas uruguayas del genotipo HAstV-1 resultaron idénticas entre sí a nivel aminoacídico con la excepción de la cepa URY/A157-ME-02/2013, la cual presentó una Isoleucina en vez de Valina en la posición 160 en la cadena de aminoácidos de la cápside (con respecto a la cepa HAstV-1 Oxford). Por otro lado, las cepas del linaje 2c del genotipo HAstV-2 presentaron una Arginina en la posición 195, en vez de una Lisina como sucedió para las cepas del linaje 2d. Los pares de aminoácidos Valina/Isoleucina y Arginina/Lisina involucran aminoácidos con características físico químicas similares, las cuales probablemente preservan la estructura de la cápside en cada caso, no obstante, estudios previos muestran que cambios de un único aminoácido pueden afectar dramáticamente ciertas características en otros virus como por ejemplo la resistencia a la acidez (Vázquez-Calvo et al. 2014), la resistencia a la neutralización (Yoo y Deregt, 2001), o la fusión y entrada a la célula (Côté et al. 2012). Incluso, un cambio entre Isoleucina y Valina en el virus de la enfermedad de Newcastle tiene implicaciones en la tasa de replicación del virus (Samal et al. 2011). Los cambios reportados aquí ocurren en la región conservada del ORF2, que codifica para el core de la cápside de la partícula viral, el cual interactúa con el genoma de ARN (Krishna, 2005), por lo tanto, estudios adicionales relacionados a la replicación viral, unión a la célula o a la presión inmune son necesarios para determinar la incidencia del cambio reportado aquí en la estructura del virión y la relación entre la proteína y el genoma viral.

Interesantemente, en este estudio, se detectaron de manera frecuente dos de los ocho genotipos clásicos de HAstV (HAstV-1 y HAstV-2), mientras que en otros estudios ambientales se ha detectado una mayor diversidad de genotipos (Nadan et al. 2003; Aw y Gin, 2011; Zhou et al. 2014). Se ha señalado con anterioridad que la amplificación y caracterización de un genotipo a partir de una muestra de agua no excluye la posibilidad de la presencia de múltiples genotipos y es posible que realizando la clonación y secuenciación de los productos de PCR, se identifiquen múltiples genotipos a partir de una única muestra de agua residual (Nadan et al. 2003). No obstante, Zhou y colaboradores (2014), realizaron una vigilancia ambiental anual en dos ciudades de la provincia china de Shandong, clonando y secuenciando los productos de PCR donde reportaron la presencia de HAstV-1 como único genotipo detectado en el agua residual en una de las ciudades, mientras que en la otra reportaron la presencia de los genotipos HAstV-1, HAstV-2, HAstV-4 y HAstV-5. Esto nos indica que si bien la clonación, como forma de profundizar el estudio de la diversidad de las cepas circulantes en el ambiente, es una herramienta válida, la exclusividad de un genotipo en un determinado punto geográfico en un determinado período, puede deberse a una realidad epidemiológica local y no precisamente a una limitación técnica.

En cuanto a la distribución de los genotipos clásicos de HAstV podemos decir que el genotipo HAstV-1 se encuentra distribuido a nivel de las dos regiones del país que este estudio abarcó, al igual que el HAstV-2, aunque este fue detectado en una frecuencia menor. Por otro lado el HAstV-5 se detectó únicamente en el este uruguayo, en la ciudad de Treinta y Tres. Posiblemente, monitoreos más exhaustivos, sobretudo en la región este,

donde se realizaron colectas bimensuales, son necesarios para obtener un panorama más completo con respecto a la presencia de los distintos genotipos en el agua residual de nuestro país.

6.3. Detección y caracterización molecular de HAstV emergentes y astrovirus caninos en Uruguay

6.3.1. Detección y caracterización molecular de HAstV MLB-1

Si bien se ha propuesto que el genotipo HAstV MLB-1 se encuentra distribuido mundialmente, estas conclusiones se basaron inicialmente en la detección del mismo en muestras de materia fecal de pacientes de países tan distantes como Australia, India y Estados Unidos (Finkbeiner et al. 2008; 2009a,b) y con el transcurso de los años la presencia del mismo ha sido reportada en otros países tales como Italia (Medici et al. 2014), Egipto (Ahmed et al. 2011), Bután (Matsumoto et al. 2013), China (Chu et al. 2010; Wang et al. 2013) y Nigeria (Kapoor et al. 2009). Por lo tanto podemos decir que la presencia de este HAstV emergente hasta el momento se ha reportado en menos de 10 países. Recientemente, Xavier y colaboradores (submitido) reportaron la presencia de dos cepas de HAstV MLB-1 a partir del estudio de la materia fecal de dos niños con diarrea aguda en Brasil, lo cual constituye el primer indicio de la presencia de este virus en América del Sur.

Considerando que la virología ambiental es una herramienta efectiva para describir las variantes de un virus circulante en una población, incluso cuando no se dispone de datos epidemiológicos al respecto (Bosch et al. 2008; Kokkinos et al. 2011), en este trabajo, mediante un abordaje de vigilancia ambiental hemos reportado por primera vez la presencia

ambiental del genotipo HAstV MLB-1 en nuestro país y en el mundo. Nuestros datos amplían el rango geográfico de detección de dicho genotipo, sumando a Uruguay a la lista de países en los cuales se ha reportado la presencia del mismo y reafirmando su distribución mundial. Si bien actualmente se ha puesto en duda el rol etiológico del HAstV MLB-1 como agente causador de gastroenteritis (Holtz et al. 2011a), en Uruguay se desconoce su prevalencia y no existe ningún estudio de su posible asociación con casos de diarrea en pacientes uruguayos. No obstante, en el monitoreo que hemos realizado a partir del agua residual de las ciudades de Melo y Treinta y Tres, este genotipo fue detectado de manera más frecuente que otros genotipos de HAstV clásicos detectados comúnmente en los casos de diarrea, sugiriendo su posible asociación a casos de gastroenteritis en la población local.

Previamente se ha señalado la necesidad de estudios que contribuyan a determinar la existencia de patrones de estacionalidad de los genotipos emergentes de HAstV (Bosch et al. 2014). En este estudio la detección de HAstV MLB-1 fue confirmada tanto en meses de verano como de invierno, sugiriendo una circulación anual de este genotipo sin la existencia de un patrón de estacionalidad marcado. En un estudio realizado con muestras de diarrea agua de niños menores de cinco años en China, el genotipo HAstV MLB-1 fue detectado en los meses de Marzo, Abril, Mayo y Noviembre (Wang et al. 2013). Estudios adicionales son necesarios para determinar posibles patrones de estacionalidad para este genotipo.

Si bien a partir de su detección en muestras de materia fecal se sugiere que los HAstV MLB-1 infectan y replican en células del aparato gastrointestinal, tal como lo hacen los HAstV clásicos, se desconoce si al igual que otros virus entéricos presentan un tropismo más amplio y una lista más larga de síntomas y/o enfermedades ya que varios estudios

han asociado algunos AstV emergentes con distintas patologías (Blomström et al. 2010; Quan et al. 2010; Holtz et al. 2011b; Li et al. 2013; Brown et al. 2015; Naccache et al. 2015). Adicionalmente, una alta seroprevalencia para HAstV MLB-1 ha sido reportada para niños menores de seis meses de edad así como para adultos en un estudio realizado en Estados Unidos (Holtz et al. 2014). Por lo tanto, aunque la etiología de la infección por HAstV MLB-1 no haya sido totalmente elucidada hasta la actualidad y exista la posibilidad de que dicho genotipo pueda estar asociado a otras patologías distintas a la diarrea, la infección aparece comunmente en el ser humano. Sin embargo, así como los HAstV clásicos son diseminados a través del agua residual y del agua superficial contaminada causando gastroenteritis aguda, la diseminación de los HAstV MLB-1 por el agua contaminada podría ser una posible vía de transmisión para el ser humano, independientemente del lugar en el organismo en el cual el virus finalmente infecte y replique.

Previamente, se ha propuesto un esquema de clasificación para los HAstV clásicos estableciendo distintos linajes dentro de cada genotipo (Medina et al. 2000; Guix et al. 2002). Dicha propuesta, establece que dos cepas son de distinto linaje si presentan una diversidad nucleotídica mayor al 5-7% a nivel del ORF2. A partir de ello, varios autores han seguido esta clasificación para establecer nuevos linajes en algunos de los genotipos clásicos de HAstV (Gabbay et al. 2007a; De Grazia et al. 2013; Martella, et al. 2013). A partir de los resultados del análisis filogenético para el segmento parcial del ORF2 de HAstV MLB-1, este estudio propone un esquema de clasificación para HAstV MLB-1 similar al de los clásicos, al considerar la formación de dos grupos con un soporte de *bootstrap* mayor a 95% para cada uno y una diversidad nucleotídica superior al 7% entre ambos grupos. Por lo tanto, las cepas de HAstV MLB-1 que se han reportado hasta el momento en todo el mundo

estarían segregadas en dos linajes distintos, a los cuales hemos propuesto denominarlos linaje HAstV MLB-1a y MLB-1b. Además de la diversidad nucleotídica observada entre las cepas de ambos linajes a nivel de ORF2 y de genoma completo, fueron identificados 11 polimorfismos de nucleótidos conservados en la región del ORF2, que reafirman la diferenciación entre los dos linajes aquí propuestos.

Cuando se analizó la secuencia aminoacídica deducida del ORF2 completo de cepas representativas de ambos linajes, fueron identificados algunos cambios exclusivos para cada linaje. Aproximadamente la mitad de estos cambios involucran aminoácidos de características fisicoquímicas distintas, por lo que probablemente han conferido distintas ventajas adaptativas para cada uno de los linajes. A su vez, las cepas de Estados Unidos e Italia (linaje MLB-1b) presentan un codón menos en comparación con el linaje MLB-1a, lo cual se evidencia mediante un gap en el alineamiento de secuencias en la posición 665 de la cadena de aminoácidos de cápside. Interesantemente, la presencia y ausencia de este codón en el linaje MLB-1a y MLB-1b, respectivamente, ocurre en una región de carácter ácido localizada en el extremo carboxilo de la proteína de cápside, la cual es conservada dentro de la familia *Astroviridae* y en donde se localizan sitios de corte para las caspasas celulares, las cuales están implicadas en la maduración del virus y el egreso celular y posibilitan el pasaje desde VP90 a VP70 (Méndez y Arias, 2013). Considerando que las caspasas celulares reconocen secuencias blanco del tipo *DXXD* y *XEXD* en las proteínas celulares y que precisamente secuencias de este tipo se encuentran en la región ácida de la poliproteína precursora de la cápside en la familia *Astroviridae*, la falta de un aminoácido en la poliproteína de cápside del linaje MLB-1b con respecto al MLB-1a genera una secuencia susceptible al

clivaje por las caspasas (anexo 4) posibilitando la ocurrencia de un procesamiento diferente a nivel proteico para las distintas cepas de MLB-1, lo que podría implicar sutiles diferencias en la maduración y egreso de las distintas cepas, tal como se ha sugerido para los HAstV clásicos (Méndez et al. 2004; Méndez y Arias, 2013).

6.3.2. Detección y caracterización molecular de astrovirus caninos

Durante el monitoreo en la ciudad de Treinta y Tres, fue posible la detección de cepas de AstV caninos que circulaban en el agua residual del afluente en la PTAR. Este resultado corrobora la utilización de los cebadores diseñados por Finkbeiner y colaboradores (2009b) para la amplificación de AstV diferentes a los humanos.

Si bien en los años 80 la observación de muestras de diarrea canina mediante microscopía electrónica levantó la sospecha acerca de la susceptibilidad de los canes a la infección por AstV, recién en 2009, Toffan y colaboradores (2009) confirmaron por primera vez la infección en perros mediante PCR. Desde entonces, existen pocos reportes de casos de diarrea canina causados por AstV en Italia (Toffan et al. 2009; Martella et al. 2011, 2012), China (Zhu et al. 2011), Francia (Grellet et al. 2012), Brasil (Castro et al. 2013) y Corea del Sur (Choi et al. 2014). En Uruguay no existen reportes sobre casos de gastroenteritis en canes originados por AstV, aunque la detección de cepas de este virus en aguas residuales podría indicar la presencia del virus en heces de mascotas caninas que se filtran al sistema de saneamiento doméstico, tal como propusieron Aw y Gin (2011) quienes detectaron una cepa de AstV felino en un canal de agua urbano. No obstante, la

detección de AstV canino en aguas residuales domésticas plantea la interrogante sobre la posible transmisión zoonótica de AstV entre canes y humanos.

Se ha propuesto que los perros pueden actuar como transportadores vivos de virus entéricos humanos y tener un rol en la transmisión de los mismos a humanos (Summa et al. 2012). Además, existe evidencia sobre la posibilidad de transmisión de AstV entre diferentes especies hospederas (van Hemert et al. 2007a, Ulloa and Gutierrez, 2010; Lan et al. 2011, Xiao et al. 2013) así como también se sugiere que varias introducciones de HAstV en la población humana hayan ocurrido desde animales cercanos (Jiang et al. 2013). Si bien existe un estudio que sugiere un potencial zoonótico de los virus de origen animal detectados en aguas residuales domésticas (Aw et al. 2014), basados en nuestros resultados no podemos confirmar el origen zoonótico de los AstV caninos detectados en las aguas residuales uruguayas.

Los resultados alcanzados en este estudio, demuestran que incluso virus de origen animal circulan por el agua residual doméstica de nuestro país, lo cual posibilita su diseminación en el ambiente cuando esta es vertida en cuerpos naturales de agua sin un tratamiento previo adecuado.

A pesar de haber amplificado un segmento parcial del ORF1b de cuatro cepas de AstV canino, son pocos los reportes que utilizan este segmento para realizar las reconstrucciones filogenéticas por lo que únicamente fue posible integrar en nuestro análisis secuencias de Brasil e Italia (Martella et al. 2011; Castro et al. 2013). La mayoría de los reportes utilizan un segmento parcial del ORF2 del genoma de AstV canino para realizar las reconstrucciones filogenéticas y se ha reportado una alta variabilidad no solamente a nivel nucleotídico, sino también a nivel aminoacídico en la región de cápside para las distintas

cepas que han circulado en cortos períodos de tiempo, incluso en una misma región geográfica (Martella et al. 2011). Por ello, se intentó amplificar la región I del ORF2, que presenta una menor variabilidad genética en comparación con el resto del ORF2 (Zhu et al. 2011) mediante la utilización de los cebadores 501F20 y 1156R21 descritos por Grellet y colaboradores (2012), por medio de la utilización de una *one-step* PCR estandarizada en el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro. No obstante, no fue posible amplificar este segmento en las cepas de AstV canino de este estudio. Debido a que este par de cebadores fue diseñado en base al alineamiento de las secuencias nucleotídicas de tres cepas de AstV caninos que circularon en Italia en 2005 (Toffan et al. 2009), posiblemente, tal como Grellet y colaboradores (2012) sostienen, mediante la utilización de los mismos, el número de casos positivos puede subestimarse debido a la ocurrencia de cepas divergentes.

Recientemente, a partir del análisis de un segmento parcial del ORF2 de 15 cepas de AstV canino de varios países, Choi y colaboradores (2014) propusieron la existencia de cuatro grupos genéticamente diversos (G1-G4). Futuros estudios son necesarios para determinar el grupo al cual pertenecen estas cepas uruguayas utilizando la amplificación de este segmento parcial del ORF2 de AstV canino.

6.3.3. Coalescencia de HAstV MLB-1

Los eventos de recombinación pueden interferir con los análisis de reconstrucción filogenética de la evolución de un virus, por lo tanto, antes de realizar la coalescencia para el total de cepas de MLB-1 reportadas hasta el momento a nivel mundial, se procedió a un

análisis de recombinación con el programa GARD. Si bien Babkin y colaboradores reportaron en 2012 la existencia de un mayor número de puntos potenciales de recombinación en el ORF2 comparativamente con los ORF1a y ORF1b para los HAstV clásicos, en nuestro caso, no detectamos puntos potenciales de recombinación en el fragmento considerado para la coalescencia del MLB-1.

Los valores de la tasa de evolución calculados mediante los distintos modelos oscilaron entre $1,7E-3$ y $1,9E-3$ sustituciones por sitio por año. Previamente, Babkin y colaboradores (2012) calcularon la tasa de evolución para HAstV clásicos utilizando 16 secuencias de los genotipos HAstV-1, HAstV-3, HAstV-4, HAstV-5 y HAstV-6, en un rango temporal desde 1988 a 2010. La misma tomó el valor de $3,7E-3$ sustituciones por sitio por año. Considerando este reporte y las tasas evolutivas de otros virus de ARN de hebra simple de sentido positivo, los valores obtenidos en nuestro estudio se encuentran dentro de lo esperado y colocan a los HAstV MLB-1 en la lista de virus que presentan una evolución rápida (Jenkins y Jensen, 2002). Aunque en este trabajo se reporta por primera vez la tasa de evolución para el genotipo HAstV MLB-1, la información debe tomarse como una primera aproximación que deberá ser confirmada a medida que el número de secuencias en las bases de datos se incremente. Actualmente, la detección de este genotipo está limitada a unos pocos países, pero su presencia en la población humana es un hecho al menos desde 1999 (Finkbeiner et al. 2008). Incluso, al parecer el genotipo MLB-1 se ha convertido en un patógeno común humano (Holtz et al. 2014).

Si bien los valores de 95% HPD generan un rango de valores bastante amplio para los tMRCA tanto del genotipo HAstV MLB-1 como para los de cada linaje (MLB-1a y MLB-

1b), los resultados aquí expresados proponen que las cepas que circulan actualmente pertenecientes al linaje MLB-1a descienden de un antepasado que estuvo presente en 1992 aproximadamente y las del linaje MLB-1b tienen un antepasado en común que estuvo presente en el 2004 aproximadamente. Ambos linajes, convergen en un antepasado en común en 1970 aproximadamente. Si bien hubiera sido interesante, mediante estudios de filogeografía, localizar geográficamente ese ancestro en común, la sobre representación de secuencias de India en nuestro conjunto de secuencias no habilitó un estudio de este tipo, por lo que ello será posible una vez que se vayan publicando reportes de MLB-1 en distintas partes del mundo.

Chu y colaboradores (2010), propusieron un ancestro en común para el clado MLB-1 y AstV de ratas hace aproximadamente mil años, datando el ancestro de tres cepas de MLB-1 en el año 1956. La disponibilidad de secuencias en las bases de datos ha aumentado considerablemente en los últimos cuatro años, por lo que nuestro análisis de coalescencia de MLB-1, al ser específico para dicho genotipo, brinda resultados a partir de datos más completos y con un muestreo más sostenido en el tiempo. Sin embargo, las estimaciones de ambos ancestros (el calculado en esta tesis y por Chu y colaboradores en 2010) son relativamente similares, diferenciándose únicamente por 14 años. A su vez, al estar nuestro análisis basado en un segmento parcial del ORF2, el cual es la región más variable del genoma viral, probablemente el MRCA (ancestro común más reciente) es datado de manera más cercana con respecto al presente que si se hubiese empleado el ORF1b (región más conservada del genoma viral) como lo realizaron Chu y colaboradores (2010).

Si bien previamente se ha mencionado la posibilidad de que los MLB-1 junto a otros HAstV emergentes, estén reemplazando a los HAstV clásicos (Bosch et al. 2014), la tasa de evolución para MLB-1 calculada en nuestro estudio es similar a la publicada por Bebkin y colaboradores (2012) para los HAstV clásicos, por lo que si existiera tal reemplazo, posiblemente no se deba a un diferencial en la tasa de evolución de dichos genotipos.

En nuestro análisis, India aparece como un punto geográfico con una alta diversidad de variantes de HAstV MLB-1, las cuales tienen ancestros en común con las cepas de Uruguay, Bután, China, y Egipto entre 2003 y 2005. Debido a esto es posible que HAstV MLB-1 haya encontrado en India las condiciones necesarias para diversificarse y desde allí, en un par de años dispersarse a otros países del mundo. Sin embargo, como se señaló anteriormente, una mayor representación de secuencias de otros países es necesaria para intentar realizar inferencias filogeográficas.

7. CONCLUSIONES

- HAstV clásicos y emergentes circulan de manera frecuente en las aguas residuales de Uruguay.
- El Río Uruguay recibe una contaminación viral de HAstV clásicos en una alta frecuencia y concentración debido a la ausencia de sistemas de tratamiento de aguas residuales.
- Los procesos de tratamiento de aguas residuales existentes en las ciudades de Melo y Treinta y Tres reducen la frecuencia y la concentración de los HAstV en los efluentes tratados.
- Fue evidenciada una amplia circulación temporal y espacial del HAstV-1a mientras que la circulación de linajes del HAstV-2 y el HAstV-5 fue esporádica.
- El genotipo MLB-1 fue caracterizado por primera vez en el ambiente, constituyendo el primer reporte a nivel mundial. La tasa de evolución de este genotipo fue calculada también por primera vez y tomó el valor esperado para un virus de ARN de hebra simple de sentido positivo. También fue sugerida la clasificación de los MLB-1 en dos linajes a nivel mundial.

8. PERSPECTIVAS

- Desarrollar una PCR en tiempo real para la cuantificación de HAstV MLB-1 en muestras clínicas y ambientales.
- Estudiar la presencia de HAstV emergentes en las muestras del monitoreo anual de las cuatro ciudades que vierten sus aguas en el Río Uruguay y analizar posibles patrones de estacionalidad de dichas variantes.
- Realizar estudios epidemiológicos moleculares a partir de muestras clínicas para conocer la prevalencia de los HAstV clásicos y emergentes en la población uruguaya.
- Buscar cepas recombinantes en muestras ambientales y clínicas de pacientes con cuadro de gastroenteritis cuyos parentales sean cepas pertenecientes a distintas especies virales del género *Mamastrovirus* (ej. *Mamastrovirus 1* y *θ*).
- Secuenciar el genoma completo de las cepas uruguayas de AstV canino y HAstV MLB-1.
- Determinar la prevalencia de los AstV caninos en los casos de diarrea en cachorros de Uruguay.
- Realizar la clonación y secuenciación de amplicones generados mediante la amplificación del ORF1b de AstV en muestras de agua residual.
- Calcular el riesgo de infección al ser humano debido a la presencia de partículas de HAstV en el agua del Río Uruguay.
- Realizar la reconstrucción de la historia demográfica del genotipo HAstV-1 en América.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, F.X., Pinto, R.M., Villena, C., Gajardo, R., Bosch, A. (1997) Astrovirus survival in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), p.3119–3122.
- Abad, F.X., Villena, C., Guix, S., Caballero, S., Pintó, R.M., Bosch, A. (2001) Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), p.3904-3907.
- Ahmed, S.F., Sebeny, P.J., Klena, J.D., Pimentel, G., Mansour, A., Naguib, A.M., Bruton, J., Young, S.Y., Holtz, L.R., Wang, D. (2011). Novel astroviruses in children, Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), p.2391–2393.
- Appleton, H., Higgins, P.G. (1975) Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, 1(7919), p.1297.
- Aragão, G.C., Oliveira, D.S., dos Santos, M.C., Mascarenhas, J.D.P., de Oliveira, C.S., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B. (2010) Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(1), p.149-158.
- Asplin, F.D. (1965) Duck Hepatitis. *Veterinary Record*, (77), p.487-488.
- Atkins, A., Wellehan, J.F. Jr., Childress, A.L., Archer, L.L., Fraser, W.A., Citino, S.B. (2009) Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Microbiology*, 136(12), p.160-165.
- Aw, T.G., Gin, K.Y. (2010) Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), p.716-730.
- Aw, T.G., Gin, K.Y. (2011) Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), p.903-914.
- Aw, T.G., Howe, A., Rose, J.B. (2014) Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *Journal of Virological Methods*, 210C, p.15-21.
- Babkin, I.V., Tikunov, A.Y., Zhirakovskaia, E.V., Netesov, S.V., Tikunova, N.V. (2012) High evolutionary rate of human astrovirus. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), p.435–442.
- Banos-Lara, M.R., Méndez, E. (2010) Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology*, 401(2), p.322-332
- Barril, P.A., Giordano, M.O., Isa, M.B., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., Castello, A.A., Glikmann, G., Nates, S.V. (2010) Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *Journal of Medical Virology*, 82(7), p.1277-1281.
- Bass, D.M., Upadhyayula, U. (1997) Characterization of human serotype 1 astrovirus neutralizing epitopes. *Journal of Virology*, 71(11), p.8666-8671.
- Basu, G., Rossouw, J., Sebunya, T.K., Gashe, B.A., de Beer, M., Dewar, J.B., Steele, A.D. (2003) Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East African Medical Journal*, 80(12), p.652–655.
- Battisti, C., Salviato, A., Jonassen, C., Toffan, A., Capua, I., Cattoli, G. (2012) Genetic characterization of astroviruses detected in guinea fowl (*Numida meleagris*) reveals a

- distinct genotype and suggests cross-species transmission between turkey and guinea fowl. *Archives of Virology*, 157(7), p.1329–1337.
- Baxendale, W., Mebatsion, T. (2004) The isolation and characterization of astroviruses from chickens. *Avian Pathology*, 33(3), p.364-370.
 - Belliot, G., Laveran, H., Monroe, S.S. (1997a) Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Archives of Virology*, 142(7), p.1323-1334.
 - Belliot, G., Laveran, H., Monroe, S.S. (1997b) Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of Medical Virology*, 51(2), p.101-106.
 - Biđin, M., Biđin, Z., Majnarić, D., Tišljarić, M., Lojkić, I. (2012) Circulation and phylogenetic relationship of chicken and turkey-origin astroviruses detected in domestic ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*). *Avian Pathology*, 41(6), p.555–562.
 - Blomström, A.L., Widén, F., Hammer, A.S., Belák, S., Berg, M. (2010) Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), p.4392-4396.
 - Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), p.495-503.
 - Bosch, A. (1998) Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*, 1(3), p.191-196. Review.
 - Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S. (2010) Astrovirus. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2012.
 - Bosch, A., Guix, S., Pintó, R.M. (2013) Epidemiology of human astrovirus, p.1–18. En Schultz-Cherry, S. (ed.), *Astrovirus research: essential ideas, everyday impacts, future directions*. Springer, New York, NY.
 - Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R.M. (2008) New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), p.295-301. Review.
 - Bosch, A., Pintó, R.M., Guix, S. (2014) Human astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), p.1048-1074.
 - Bosch, A., Pinto, R.M., Villena, C., Abad, F.X. (1997) Persistence of human astrovirus in fresh and marine water. *Water Science and Technology*, 35(11-12), p.243–247.
 - Bridger, J.C. (1980) Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Veterinary Record*, 107(23), p.532-533.
 - Brinker, J.P., Blacklow, N.R., Herrmann, J.E. (2000) Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Archives of Virology*, (145), p.1847–1856.
 - Brown, J.R., Morfopoulou, S., Hubb, J., Emmett, W.A., Ip, W., Shah, D., Brooks, T., Paine, S.M., Anderson, G., Virasami, A., Tong, C.Y., Clark, D.A., Plagnol, V., Jacques, T.S., Qasim, W., Hubank, M., Breuer, J. (2015) Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases*.

- Caballero, S., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pinto, R.M. (2004) Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. *Journal of Virology*, 78(23), p.13285–13292.
- Canelli, E., Cordioli, P., Barbieri, I., Catella, A., Pennelli, D., Ceruti, R., Moreno, A., Lavazza, A. (2012) Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: genetic characterization and longitudinal studies on field conditions. *Avian Diseases*, 56(1), p.173-182.
- Castro, T.X., Cubel Garcia, R.C., Costa, E.M., Leal, R.M., Xavier, Mda. P., Leite, J.P. (2013) Molecular characterisation of calicivirus and astrovirus in puppies with enteritis. *Veterinary Record*, 172(21), p.557.
- Caul, E.O., Appleton, H. (1982) The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *Journal of Medical Virology*, 9(4), p.257-265.
- Choi, S., Lim, S.I., Kim, Y.K., Cho, Y.Y., Song, J.Y., An, D.J. (2014) Phylogenetic analysis of astrovirus and kobuvirus in Korean dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(8), p.1141-1145.
- Chu, D.K., Chin, A.W., Smith, G.J., Chan, K.H., Guan, Y., Peiris, J.S., Poon, L.L. (2010) Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *Journal of General Virology*, 91(Pt 10), p.2457-2462.
- Chu, D.K., Leung, C.Y., Perera, H.K., Ng, E.M., Gilbert, M., Joyner, P.H., Grioni, A., Ades, G., Guan, Y., Peiris, J.S., Poon, L.L. (2012) A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 86(24), p.13772-13778.
- Chu, D.K., Poon, L.L., Guan, Y., Peiris, J.S. (2008) Novel astroviruses in insectivorous bats. *Journal of Virology*, 82(18), p.9107-9114.
- Cloette, T.E., Da Silva, E., Nel, L.H. (1998) Removal of waterborne human enteric viruses and coliphages with oxidized coal. *Current Microbiology*, 37(1), p.23-27.
- Colomba, C., Grazia, S., Giammanco, G.M., Saporito, L., Scarlata, F., Titone, L., Arista, S. (2006) Viral gastroenteritis in children hospitalized in Sicily, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(9), p.570–575.
- Côté, M., Zheng, Y.M., Liu, S.L. (2012) Membrane fusion and cell entry of XMRV are pH-independent and modulated by the envelope glycoprotein's cytoplasmic tail. *PLoS One*, 7(3):e33734.
- Cruz, J.R., Bartlett, A.V., Herrmann, J.E., Caceres, P., Blacklow, N.R., Cano, F. (1992) Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), p.1140–1144.
- Cubitt, W.D., Mitchell, D.K., Carter, M.J., Willcocks, M.M., Holzel, H. (1999) Application of electron microscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *Journal of Medical Virology*, 57(3), p.313–321.
- Dai, Y.C., Xu, Q.H., Wu, X.B., Hu, G.F., Tang, Y.L., Li, J.D., Chen, Q., Nie, J. (2010) Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Archives of Virology*, 155(6), p.977–982.
- Dalton, R.M., Pastrana, E.P., Sánchez-Fauquier, A. (2003) Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *Journal of Virology*, 77(16), p.9094–9098.

- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G. (2011) Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), p.1529-1544.
- De Grazia, S., Martella, V., Chironna, M., Bonura, F., Tummolo, F., Calderaro, A., Moschidou, P., Giammanco, G.M., Medici, M.C. (2013) Nationwide surveillance study of human astrovirus infections in an Italian pediatric population. *Epidemiology and Infection*, 141(3), p.524-528.
- De Grazia, S., Medici, M.C., Pinto, P., Moschidou, P., Tummolo, F., Calderaro, A., Bonura, F., Banyai, K., Giammanco, G.M., Martella, V. (2012) Genetic heterogeneity and recombination in human type 2 astroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), p.3760-3764.
- De Grazia, S., Platia, M.A., Rotolo, V., Colomba, C., Martella, V., Giammanco, G.M. (2011) Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002-2005: emergence of lineage 2c strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), p.97-101.
- Dong, J., Dong, L., Méndez, E., Tao, Y. (2011) Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, (108), p.12681-12686.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y., Phillips, M.J., Rambaut, A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5):e88.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), p.1969-1973.
- Egglestone, S.I., Caul, E.O., Vipond, I.B., Darville, J.M. (1999) Absence of human astrovirus RNA in sewage and environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), p.709-714.
- Eischeid, A.C., Linden, K.G. Molecular indications of protein damage in adenoviruses after UV disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), p.1145-1147.
- Englund, L., Chriél, M., Dietz, H.H., Hedlund, K.O. (2002) Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Veterinary Microbiology*, 85(1), p.1-11.
- Espinosa, A.C., Arias, C.F., Sánchez-Colón, S., Mazari-Hiriart, M. (2009) Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high altitude system. *Environmental Health*, 8(49).
- Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F. (2008) Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42(10-11), p.2618-2628.
- Espul, C., Martínez, N., Noel, J.S., Cuello, H., Abrile, C., Grucci, S., Glass, R., Berke, T., Matson, D.O. (2004) Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 72(1), p.75-82.
- Ferreira, M.S., Xavier, Mda P., Tinga, A.C., Rose, T.L., Fumian, T.M., Fialho, A.M., de Assis, R.M., Carvalho-Costa, F.A., de Oliveira, S.A., Leite, J.P., Miagostovich, M.P. (2012) Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLOS One*, 7(3), e33754.
- Finkbeiner, S.R., Holtz, L.R., Jiang, Y., Rajendran, P., Franz, C.J., Zhao, G., Kang, G., Wang, D. (2009a) Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal*, 6(161).
- Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D., Wang, D. (2008) Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology Journal*, 5(117).

- Finkbeiner, S.R., Le, B.M., Holtz, L.R., Storch, G.A., Wang, D. (2009b) Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerging Infectious Diseases*, 15(3):441-444.
- Finkbeiner, S.R., Li, Y., Ruone, S., Conrardy, C., Gregoricus, N., Toney, D., Virgin, H.W., Anderson, L.J., Vinjé, J., Wang, D., Tong, S. (2009c) Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *Journal of Virology*, 83(20), p.10836-10839.
- Firth, A.E., Atkins, J.F. (2010) Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virology Journal*, 7(17).
- Fong, T.T., Lipp, E.K. (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), p.357-371. Review.
- Francy, D.S., Stelzer, E.A., Bushon, R.N., Brady, A.M., Williston, A.G., Riddell, K.R., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Gellner, T.M. (2012) Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. *Water Research*, 46(13), p.4164-4178.
- Fu, Y., Pan, M., Wang, X., Xu, Y., Xie, X., Knowles, N.J., Yang, H., Zhang, D. (2009) Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *Journal of General Virology*, 90(Pt 5), p.1104-1108.
- Fuentes, C., Bosch, A., Pinto, R.M., Guix, S. (2012) Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *Journal of Virology*, 86(18), p.10070-10078.
- Fumian, T.M., Leite, J.P., Castello, A.A., Gaggero, A., Caillou, M.S., Miagostovich, M.P. (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *Journal of Virological Methods*, 170(1-2), p.42-46.
- Fumian, T.M., Vieira, C.B., Leite, J.P., Miagostovich, M.P. (2013) Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, 11(1), p.110-119.
- Gabbay, Y.B., Chamone, C.B., Nakamura, L.S., Oliveira, D.S., Abreu, S.F., Cavalcante-Pepino, E.L., Mascarenhas, J.D., Leite, J.P., Linhares, A.C. (2006) Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 37(4), p.287-292.
- Gabbay, Y.B., Leite, J.P., Oliveira, D.S., Nakamura, L.S., Nunes, M.R., Mascarenhas, J.D., Heinemann, M.B., Linhares, A.C. (2007a). Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belem, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): identification of two possible new lineages. *Virus Research*, 129(2), p.166-174.
- Gabbay, Y.B., Linhares, A.C., Oliveira, D.S., Nakamura, L.S., Mascarenhas, J.D., Gusmão, R.H., Heinemann, M.B., Macêdo, O., Leite, J.P. (2007b) First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), p.531-534.

- Gaggero, A., O'Ryan, M., Noel, J.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., Mamani, N., Prado, V., Avendaño, L.F. (1998) Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), p.3691-3693.
- Gallimore, C.I., Taylor, C., Gennery, A.R., Cant, A.J., Galloway, A., Lewis, D., Gray, J.J. (2005) Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), p.3890-3894.
- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M., Schwartzbrod, L. (1998) Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), p.4307-4312.
- Geigenmüller, U., Ginzton, N.H., Matsui, S.M. (2002) Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *Journal of General Virology*, 83(Pt 7), p.1691-1695.
- Gerba, C.P. (1984) Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology*, 30(133), p.68. Review.
- Glass, R.I., Noel, J., Mitchell, D., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Pickering, L.K., Dennehy, P., Ruiz-Palacios, G., de Guerrero, M.L., Monroe, S.S. (1996). The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Archives of Virology, Supplement*, (12), p.287-300.
- Gofti-Laroche, L., Gratacap-Cavallier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.M., Zmirou, D. (2003) Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *Journal of Clinical Virology*, (27), p.74-82.
- Grellet, A., De Battisti, C., Feugier, A., Pantile, M., Marciano, S., Grandjean, D., Cattoli, G. (2012) Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), p.214-219.
- Grimm, A.C., Cashdollar, J.L., Williams, F.P., Fout, G.S. (2004) Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, realtime, and integrated cell culture/RT-PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(4), p.269-278.
- Guerrero, M.L., Noel, J.S., Mitchell, D.K., Calva, J.J., Morrow, A.L., Martinez, J., Rosales, G., Velazquez, F.R., Monroe, S.S., Glass, R.I., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G.M. (1998) A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, 17(8), p.723-727.
- Guimarães, F.R., Ferreira, F.F., Vieira, C.B., Fumian, T.M., Shubo, T., Leite, J.P., Miagostovich, M.P. (2008) Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), p.819-823.
- Guix, S., Caballero, S., Bosch, A., Pinto, R.M. (2004) C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *Journal of Virology*, (78), p.13627-13636.
- Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolomé, R., Latorre, C., Rabella, N., Simó, M., Bosch, A., Pintó, R.M. (2002) Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), p.133-139.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, (41), p.95-98.

- Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H. (2013) Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), p.545-554.
- He, X.Q., Cheng, L., Zhang, D.Y., Xie, X.M., Wang, D.H., Wang, Z. (2011) One-year monthly survey of rotavirus, astrovirus and norovirus in three sewage treatment plants in Beijing, China and associated health risk assessment. *Water Science and Technology*, 63(1), p.191-198.
- He, X., Wei, Y., Cheng, L., Zhang, D., Wang, Z. (2012) Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(9), p.5563-5570.
- Ho, S.Y., Phillips, M.J., Drummond, A.J., Cooper, A. (2005) Accuracy of rate estimation using relaxed-clock models with a critical focus on the early metazoan radiation. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), p.1355-1363.
- Holtz, L.R., Bauer, I.K., Jiang, H., Belshe, R., Freiden, P., Schultz-Cherry, S.L., Wang, D. (2014) Seroepidemiology of astrovirus MLB1. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(6), p.908-911.
- Holtz, L.R., Bauer, I.K., Rajendran, P., Kang, G., Wang, D. (2011a) Astrovirus MLB-1 is not associated with diarrhea in a cohort of Indian children. *PLoS One*, 6(12):e28647.
- Holtz, L.R., Wylie, K.M., Sodergren, E., Jiang, Y., Franz, C.J., Weinstock, G.M., Storch, G.A., Wang, D. (2011b) Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. *Emerging Infectious Diseases*, 17(11), p.2050-2052.
- Hoshino, Y., Zimmer, J.F., Moise, N.S., Scott, F.W. (1981) Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. Brief report. *Archives of Virology*, 70(4), p.373-376.
- Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J., Yamamoto, S.P., Goto, K., Tanaka, T., Noda, M. (2014) Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *Journal of Medical Virology*, 86(12), p.2019-2025.
- Jakab, F., Walter, J.E., Berke, T., Matson, D.O., Mitchell, D.K., Szúcs, G. (2003). Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39(2), p.97-102.
- Jenkins, E.T., Jensen, D.M. (2012) The importance of rapid viral suppression in the era of directly acting antiviral therapy for hepatitis C virus. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(4), p.879-891.
- Jeong, A.Y., Jeong, H.S., Jo, M.Y., Jung, S.Y., Lee, M.S., Lee, J.S., Jee, Y.M., Kim, J.H., Cheon, D.S. (2011) Molecular epidemiology and genetic diversity of human astrovirus in South Korea from 2002 to 2007. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), p.404-408.
- Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E.V., Stine, S.E., Glass, R.I. (1993) RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, (90), p.10539-10543.
- Jiang, H., Holtz, L.R., Bauer, I., Franz, C.J., Zhao, G., Bodhidatta, L., Shrestha, S.K., Kang, G., Wang, D. (2013) Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology*, 436(1), p.8-14.

- Jonassen, C.M., Jonassen, T.O., Grinde, B. (1998) A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *Journal of General Virology*, (79), p.715–718.
- Jonassen, C.M., Jonassen, T.O., Saif, Y.M., Snodgrass, D.R., Ushijima, H., Shimizu, M., Grinde, B. (2001) Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *Journal of General Virology*, 82(Pt 5), p.1061-1067.
- Jonassen, C.M., Jonassen, T.T., Sveen, T.M., Grinde, B. (2003) Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Research*, 91(2), p.195-201.
- Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., Zaidi, S.Z., Delwart, E. (2009) Multiple novel astrovirus species in human stool. *Journal of General Virology*, 90(Pt 12), p.2965-2972.
- Kirkwood, C.D., Clark, R., Bogdanovic-Sakran, N., Bishop, R.F. (2005) A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998–2002). *Journal of Medical Virology*, 77(1), p.96–101.
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (2014) Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes-identification of potential viral indicators. *The Science of the Total Environment*, (488-489), p.290-296.
- Kiulia, N.M., Mwenda, J.M., Nyachieo, A., Nyaundi, J.K., Steele, A.D., Taylor, M.B. (2007) Astrovirus infection in young Kenyan children with diarrhoea. *Journal of Tropical Pediatrics*, 53(3), p.206–209.
- Kjeldsberg, E., Hem, A. (1985) Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. Brief report. *Archives of Virology*, 84(1-2), p.135-140.
- Koci, M.D., Seal, B.S., Schultz-Cherry, S. (2000) Molecular characterization of an avian astrovirus. *Journal of Virology*, 74(13), p.6173-6177.
- Kokkinos, P., Ziros, P., Meri, D., Filippidou, S., Kolla, S., Galanis, A., Vantarakis, A. (2011) Environmental surveillance. An additional/alternative approach for virological surveillance in Greece? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), p.1914-1922.
- Koopmans, M.P., Bijen, M.H., Monroe, S.S., Vinje, J. (1998) Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(1), p.33–37.
- Krishna, N.K. (2005) Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunology*, 18(1), p.17-26. Review.
- Kurtz, J.B., Lee, T.W. (1984) Human astrovirus serotypes. *Lancet*, 2(8416), p.1405.
- Kurtz, J.B., Lee, T.W. (1987) Astroviruses: human and animal. *Ciba Foundation Symposium*, (128), p.92–107.
- La Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M. (2012) Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 48(4), p.397-406.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M. (2010) Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 46(3), p.266-273.

- Lan, D., Ji, W., Shan, T., Cui, L., Yang, Z., Yuan, C., Hua, X. (2011) Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China. *Archives of Virology*, 156(10), p.1869–1875.
- Le Cann, P., Ranarijaona, S., Monpoeho, S., Le Guyader, F., Ferre, V. (2004) Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology*, 155(1), p.11–15.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M. (2000) Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), p.3241–3248.
- Lee, R., Lessler, J., Lee, R., Rudolph, K., Reich, N., Perl, T., Cummings, D. (2013) Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, (13), p.446.
- Lee, T.W., Kurtz, J.B. (1981) Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *Journal of General Virology*, 57(Pt 2), p.421-424.
- Li, L., Diab, S., McGraw, S., Barr, B., Traslavina, R., Higgins, R., Talbot, T., Blanchard, P., Rimoldi, G., Fahsbender, E., Page, B., Phan, T.G., Wang, C., Deng, X., Pesavento, P., Delwart, E. (2013) Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), p.1385-1392.
- Limsawat, S., Ohgaki, S. (1997) Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), p.2932-2933.
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R.E., Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. (2012) Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), p.2151-2161.
- Liu, M.Q., Peng, J.S., Tang, L., Zhou, Y., Yang, B.F., Wang, Y.H., Wang, B., Zhou, D.J., Huang, H.J., Ho, W.Z. (2008) Identification of new subtype of astrovirus type 3 from an infant with diarrhea in Wuhan, China. *Virology*, 375(1), p.301–306.
- Lizasoain, A. (2012) Análisis de virus entéricos en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el interior de Uruguay. Tesis de grado en la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Lukashov, V.V., Goudsmit, J. (2002) Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *Journal of General Virology*, 83(Pt 6), p.1397–1405.
- Madeley, C.R., Cosgrove, B.P. (1975) Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 2(7932), p.451-452.
- Malasao, R., Khamrin, P., Chaimongkol, N., Ushijima, H., Maneekarn, N. (2012) Diversity of human astrovirus genotypes circulating in children with acute gastroenteritis in Thailand during 2000-2011. *Journal of Medical Virology*, 84(11), p.1751-1756.
- Maldonado, Y., Cantwell, M., Old, M., Hill, D., Sanchez, M.L., Logan, L., Millan-Velasco, F., Valdespino, J.L., Sepulveda, J., Matsui, S. (1998) Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *The Journal of the Infectious Diseases*, 178(2), p.334–339.
- Marczinke, B., Bloys, A.J., Brown, T.D., Willcocks, M.M., Carter, M.J., Brierley, I. (1994) The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *Journal of Virology*, (68), p.5588–5595.
- Martella, V., Medici, M.C., Terio, V., Catella, C., Bozzo, G., Tummolo, F., Calderaro, A., Bonura, F., Di Franco, M., Bányai, K., Giammanco, G.M., De Grazia, S. (2013) Lineage

- diversification and recombination in type-4 human astroviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, (20), p.330–335.
- Martella, V., Moschidou, P., Catella, C., Larocca, V., Pinto, P., Losurdo, M., Corrente, M., Lorusso, E., Bányai, K., Decaro, N., Lavazza, A., Buonavoglia, C. (2012) Enteric disease in dogs naturally infected by a novel canine astrovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), p.1066-1069.
 - Martella, V., Moschidou, P., Pinto, P., Catella, C., Desario, C., Larocca, V., Circella, E., Bányai, K., Lavazza, A., Magistrali, C., Decaro, N., Buonavoglia, C. (2011) Astroviruses in rabbits. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), p.2287-2293.
 - Matsumoto, T., Wangchuk, S., Tshering, K., Yahiro, T., Zangmo, S., Dorji, T., Tshering, K., Mitui, M.T., Nishizono, A., Ahmed, K. (2013) Complete Genome Sequences of Two Astrovirus MLB1 Strains from Bhutanese Children with Diarrhea. *Genome Announcement*, 1(4).
 - Maunula, L., Kalso, S., von Bonsdorff, C.H., Ponka, A. (2004) Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiology and Infection*, 132(4), p.737–743.
 - Medici, M.C., Tummolo, F., Albonetti, V., Abelli, L.A., Chezzi, C., Calderaro, A. (2012) Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008-2009. *Journal of Medical Virology*, 84(4), p.643–650.
 - Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Elia, G., Banyai, K., De Conto, F., Arcangeletti, M.C., Chezzi, C., Buonavoglia, C., Martella, V. (2014) MLB-1 astrovirus in children with gastroenteritis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 20(1), p.169-170.
 - Medina, S.M., Gutierrez, M.F., Liprandi, F., Ludert, J.E. (2000) Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), p.3481–3483.
 - Meleg, E., Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Melegh, B., Szucs, G. (2006) Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1123-1129.
 - Méndez, E., Aguirre-Crespo, G., Zavala, G., Arias, C.F. (2007) Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *Journal of Virology*, (81), p.10649–10658.
 - Méndez, E., Arias, C.F. (2013) Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM et al (eds.) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.609–628.
 - Méndez, E., Fernández-Luna, T., López, S., Méndez-Toss, M., Arias, C.F. (2002) Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *Journal of Virology*, 76(16), p.7996-8002.
 - Méndez, E., Munoz-Yanez, C., Sanchez-San Martin, C., Aguirre-Crespo, G., Banos-Lara, M.D., Gutierrez, M., Espinosa, R., Acevedo, Y., Arias, C.F., Lopez, S. (2014) Characterization of human astrovirus cell entry. *Journal Virology*, (88), p.2452–2460.
 - Méndez, E., Salas-Ocampo, E., Arias, C.F. (2004) Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *Journal of Virology*, (78), p.8601–8608.
 - Méndez-Toss, M., Griffin, D.D., Calva, J., Contreras, J.F., Puerto, F.I., Mota, F., Guiscafne, H., Cedillo, R., Munoz, O., Herrera, I., Lopez, S., Arias, C.F. (2004) Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), p.151–157.

- Mezzanotte, V., Antonelli, M., Citterio, S., Nurizzo, C. (2007) Wastewater disinfection alternatives: chlorine, ozone, peracetic acid, and UV light. *Water Environment Research*, 79(12), p.2373-2379.
- Miagostovich, M.P., Ferreira, F.F., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Diniz-Mendes, L., Luz, S.L., Silva, L.A., Leite, J.P. (2008) Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), p.375-382.
- Midthun, K., Greenberg, H.B., Kurtz, J.B., Gary, G.W., Lin, F.Y., Kapikian, A.Z. (1993) Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4), p.955-962.
- Monceyron, C., Grinde, B., Jonassen, T.O. (1997) Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Archives of Virology*, (142), p.699-706.
- Morsy El-Senousy, W., Guix, S., Abid, I., Pinto, R.M., Bosch, A. (2007) Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, (73), p.164-167.
- Moser, L.A., Schultz-Cherry, S. (2005) Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunology*, 18(1), p.4-10.
- Mustafa, H., Palombo, E.A., Bishop, R.F. (2000) Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), p.1058-1062.
- Naccache, S.N., Peggs, K.S., Mattes, F.M., Phadke, R., Garson, J.A., Grant, P., Samayoa, E., Federman, S., Miller, S., Lunn, M.P., Gant, V., Chiu, C.Y. (2015) Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult With Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*.
- Nadan, S., Walter, J.E., Grabow, W.O., Mitchell, D.K., Taylor, M.B. (2003) Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), p.747-753.
- Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I., Monroe, S.S. (1995) Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), p.797-801.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O. (2003) Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), p.1629-1632.
- Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., Inouye, S., Grohmann, G.S., Monroe, S.S., Stine, S.E., Carcamo, C., Ando, T., Glass, R.I. (1994) A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *The Journal of the Infectious Diseases*, 170(2), p.439-443.
- Pager, C.T., Steele, A.D. (2002) Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clinical Infectious Diseases*, 35(11), p.1452-1453.
- Palombo, E.A., Bishop, R.F. (1996) Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), p.1750-1753.
- Pantin-Jackwood, M., Spackman, E., Woolcock, P. (2006) Phylogenetic analysis of turkey astroviruses reveals evidence of recombination. *Virus Genes*, (32), p.187-192.

- Pativada, M., Bhattacharya, R., Krishnan, T. (2013) Novel human astrovirus strains showing multiple recombinations within highly conserved ORF1b detected from hospitalized acute watery diarrhea cases in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution*, (20), p.284–291.
- Pativada, M.S., Chatterjee, D., Mariyappa, N.S., Rajendran, K., Bhattacharya, M.K., Ghosh, M., Kobayashi, N., Krishnan, T. (2011) Emergence of unique variants and inter genotype recombinants of human astroviruses infecting infants, children and adults in Kolkata, India. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2(3), p.228–235.
- Payment, P., Locas, A. (2011) Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water*, 49(1), p.4-11
- Phan, T.G., Nordgren, J., Ouermi, D., Simpore, J., Nitiema, L.W., Deng, X., Delwart, E. (2014) New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *Journal of Clinical Virology*, 60(2), p.161-164.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R. (1998) Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), p.4485-4488.
- Pintó, R.M., Abad, F.X., Gajardo, R., Bosch, A. (1996) Detection of infectious astroviruses in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), p.1811-1813.
- Pintó, R.M., Bosch, A. (2008) Rethinking virus detection in food, p.171–188. En Koopman, M., Cliver, D.O., Bosch, A. (ed.), *Foodborne viruses: progress and challenges*. ASM Press, Washington, DC.
- Pintó, R.M., Villena, C., Le Guyader, F., Guix, S., Caballero, S., Pommepuy, M., Bosch, A. (2001) Astrovirus detection in wastewater samples. *Water Science and Technology*, 43(12), p.73–76.
- Pusch, D., Oh, D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E. (2005) Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, 150(5), p.929-947.
- Putzker, M., Sauer, H., Kirchner, G., Keksel, O., Malic, A. (2000) Community acquired diarrhea—the incidence of Astrovirus infections in Germany. *Clinical Laboratory*, 46(5-6), p.269–273.
- Quan, P.L., Wagner, T.A., Briese, T., Torgerson, T.R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., Firth, C., Palacios, G., Baisre-De-Leon, A., Paddock, C.D., Hutchison, S.K., Egholm, M., Zaki, S.R., Goldman, J.E., Ochs, H.D., Lipkin, W.I. (2010) Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), p.918-925.
- Rajal, V.B.; McSwain, B.S.; Thompson, D.E.; Leutenegger, C.M.; Kildare, B.J.; Wuertz, S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41(7), p.1411-1422.
- Reither, K., Ignatius, R., Weitzel, T., Seidu-Korkor, A., Anyidoho, L., Saad, E., Djie-Maletz, A., Ziniel, P., Amoo-Sakyi, F., Danikuu, F., Danour, S., Otchwemah, R., Schreier, E., Bienzle, U., Stark, K., Mockenhaupt, F. (2007) Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infectious Diseases*, 7(104).
- Risco, C., Carrascosa, J.L., Pedregosa, A.M., Humphrey, C.D., Sanchez-Fauquier, A. (1995) Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *Journal of General Virology*, (76), p.2075–2080.

- Rivera, R., Nollens, H.H., Venn-Watson, S., Gulland, F.M., Wellehan, J.F., Jr. (2010) Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *Journal of General Virology*, 91(Pt 1), p.166-173.
- Robertson, M.P., Igel, H., Baertsch, R., Haussler, D., Ares, M., Jr., Scott, W.G. (2005) The structure of a rigorously conserved RNA element within the SARS virus genome. *PLoS Biology*, 3:e5.
- Rodríguez-Díaz, J., Querales, L., Caraballo, L., Vizzi, E., Liprandi, F., Takiff, H., Betancourt, W.Q. (2009) Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 387-394.
- Rovida, F., Campanini, G., Sarasini, A., Adzasehoun, K.M.G., Piralla, A., Baldanti, F. (2013) Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(1), p.110-111.
- Royuela, E., Negro, A., Sanchez-Fauquier, A. (2006) Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *Journal of Virological Methods*, 133(1), p.14-19.
- Sakoda, A., Sakai, Y., Hayakawa, K., Suzuki, M. (1997) Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Science and Technology*, 35(7), p.107-114.
- Samal, S., Kumar, S., Khattar, S.K., Samal, S.K. (2011) A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. *Journal of General Virology*, 92(Pt 10), p.2333-2338.
- Sánchez-Fauquier, A., Carrascosa, A.L., Carrascosa, J.L., Otero, A., Glass, R.I., Lopez, J.A., San Martín, C., Melero, J.A. (1994) Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology*, 201(2), p.312-320.
- Schlindwein, A.D., Rigotto, C., Simões, C.M., Barardi, C.R. (2010) Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science and Technology*, 61(2), p.537-544.
- Sebire, N.J., Malone, M., Shah, N., Anderson, G., Gaspar, H.B., Cubitt, W.D. (2004) Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *Journal of Clinical Pathology*, 57(9), p.1001-1003.
- Shimizu, M., Shirai, J., Narita, M., Yamane, T. (1990) Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(2), p.201-206.
- Silva, P.A., Cardoso, D.D., Schreier, E. (2006) Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Archives of Virology*, 151(7), p.1405-1417.
- Strain, E., Kelley, L.A., Schultz-Cherry, S., Muse, S.V., Koci, M.D. (2008) Genomic analysis of closely related astroviruses. *Journal of Virology*, (82), p.5099-5103.
- Summa, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L. (2012) Pet dogs--a transmission route for human noroviruses? *Journal of Clinical Virology*, 53(3), p.244-247.
- Symonds, E.M., Verbyla, M.E., Lukasik, J.O., Kafle, R.C., Breitbart, M., Mihelcic, J.R. (2014) A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research*, (65), p.257-270.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), p.2725-2729.
- Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R. (2005) Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Research*, 39(15), p.3487-3500.
- Templeton, M.R.; Andrews, R.C.; Hofmann, R. (2008) Particle-associated viruses in water: impacts on disinfection processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, (38), p.137-164.
- Thorne, L.G., Goodfellow, I.G. (2014) Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, (95), p.278-291.
- Todd, E.C., Greig, J.D., Bartleson, C.A., Michaels, B.S. (2007) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 2. Description of outbreaks by size, severity, and settings. *Journal of Food Protection*, 70(8), p.1975-1993.
- Toffan, A., Jonassen, C.M., De Battisti, C., Schiavon, E., Kofstad, T., Capua, I., Cattoli, G. (2009) Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 139(1-2), p.147-152.
- Tzipori, S., Menzies, J.D., Gray, E.W. (1981) Detection of astrovirus in the faeces of red deer. *Veterinary Record*, 108(13), p.286.
- Ulloa, J.C., Gutierrez, M.F. (2010) Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(7), p.569-577.
- van Hemert, F.J., Berkhout, B., Lukashov, V.V. (2007a) Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the *Astroviridae*. *Virology*, 361(2), p.447-454.
- van Hemert, F.J., Lukashov, V.V., Berkhout, B. (2007b). Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Virology Journal*, 4(25).
- Vázquez-Calvo, A., Caridi, F., Sobrino, F., Martín-Acebes, M.A. (2014) An increase in acid resistance of foot-and-mouth disease virus capsid is mediated by a tyrosine replacement of the VP2 histidine previously associated with VP0 cleavage. *Journal of Virology*, 88(5), p.3039-3042.
- Verbyla, M.E., Mihelcic, J.R. (2014) A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research*, (71C), p.107-124.
- Verma, H., Chitambar, S.D., Gopalkrishna, V. (2010) Astrovirus associated acute gastroenteritis in western India: predominance of dual serotype strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(4), p.575-579.
- Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Heinemann, M.B., Leite, J.P., Miagostovich, M.P. (2007) Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 79(7), p.939-944.
- Wait, D.A., Sobsey, M.D. (1983) Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(2), p.379-385.
- Walter, J.E., Briggs, J., Guerrero, M.L., Matson, D.O., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G., Berke, T., Mitchell, D.K. (2001) Molecular characterization of a novel recombinant strain of human

- astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Archives of Virology*, 146(12), p.2357-2367.
- Wang, Q.H., Kakizawa, J., Wen, L.Y., Shimizu, M., Nishio, O., Fang, Z.Y., Ushijima, H. (2001) Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *Journal of Medical Virology*, (64), p.245-255.
 - Wang, Y., Li, Y., Jin, Y., Li, D.D., Li, X., Duan, Z.J. (2013) Recently identified novel human astroviruses in children with diarrhea, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), p.1333-1335.
 - Wigginton, K.R., Kohn, T. (2012) Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Current Opinion in Virology*, 2(1), p.84-89. Review.
 - Willcocks, M.M., Ashton, N., Kurtz, J.B., Cubitt, W.D., Carter, M.J. (1994) Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *Journal of Virology*, 68(9), p.6057-6058.
 - Wolfaardt, M., Kiulia, N.M., Mwenda, J.M., Taylor, M.B. (2011) Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, (49), p.728-731.
 - Woode, G.N., Bridger, J.C. (1978) Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical Microbiology*, 11(4), p.441-452.
 - World Health Organization: Guidelines for drinking-water quality. Edn. 3. Recommendations. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
 - Wunderli, W., Meerbach, A., Gungor, T., Berger, C., Greiner, O., Caduff, R., Trkola, A., Bossart, W., Gerlach, D., Schibler, M., Cordey, S., McKee, T.A., Van Belle, S., Kaiser, L., Tapparel, C. (2011) Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One* 6:e27483.
 - Xiao, C-T., Giménez-Lirola, L.G., Gerber, P.F., Jiang, Y-H., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2013) Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *Journal of General Virology*, 94(Pt 3), p.570-582.
 - Yoo, D., Deregt, D. (2001) A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), p.297-302.
 - Zhao, W., Zhu, A.L., Yuan, C.L., Yu, Y., Zhu, C.X., Lan, D.L., Yang, Z.B., Cui, L., Hua, X.G. (2011) Detection of astrovirus infection in pigeons (*Columbia livia*) during an outbreak of diarrhoea. *Avian Pathology*, 40(4), p.361-365.
 - Zhou, N., Lin, X., Wang, S., Wang, H., Li, W., Tao, Z., Xu, A. (2014) Environmental surveillance for human astrovirus in Shandong province, China in 2013. *Scientific Reports*, 4(7539).
 - Zhu, A.L., Zhao, W., Yin, H., Shan, T.L., Zhu, C.X., Yang, X., Hua, X.G., Cui, L. (2011) Isolation and characterization of canine astrovirus in China. *Archives of Virology*, 156(9), p.1671-1675.

10. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

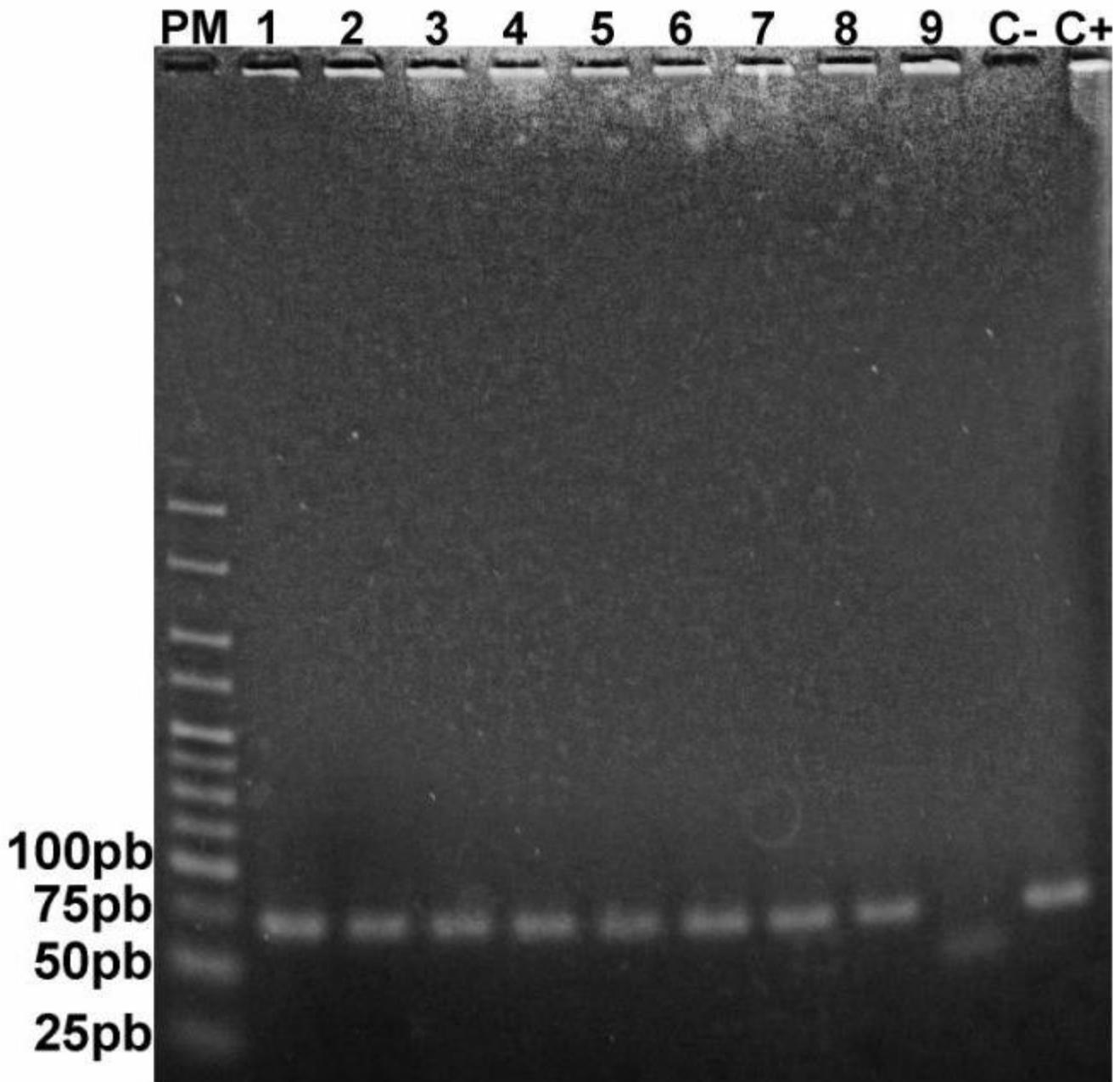
- Victoria, M., Tort, L.F., García, M., **Lizasoain, A.**, Maya, L., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R. (2014) Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6(2), p.116-124.
- **Lizasoain, A.**, Tort, L.F., García, M., Gómez, M.M., Cristina, J., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Victoria, M., Colina, R. (2015) Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. *Food and Environmental Virology*. (aceptado para publicación)

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de cepas utilizadas en el análisis de coalescencia del genotipo HAstV MLB-1.

| Número de acceso a GenBank | País | Año |
|---------------------------------------|-------------|------------|
| FJ222461 | AUSTRALIA | 1999 |
| JN871248 | INDIA | 2003 |
| JN871236 | INDIA | 2003 |
| JN871250 | INDIA | 2003 |
| JN871242 | INDIA | 2003 |
| JN871237 | INDIA | 2003 |
| JN871235 | INDIA | 2003 |
| JN871247 | INDIA | 2003 |
| JN871241 | INDIA | 2004 |
| JN871244 | INDIA | 2004 |
| JN871246 | INDIA | 2004 |
| JN871239 | INDIA | 2004 |
| JN871233 | INDIA | 2004 |
| JN871234 | INDIA | 2004 |
| JN871245 | INDIA | 2005 |
| JN871240 | INDIA | 2005 |
| JN871243 | INDIA | 2005 |
| JN871249 | INDIA | 2005 |
| NC014320 | CHINA | 2005 |
| JN871238 | INDIA | 2005 |
| HQ674650 | EGIPTO | 2007 |
| HQ674648 | EGIPTO | 2007 |
| HQ674649 | EGIPTO | 2007 |
| HQ674647 | EGIPTO | 2007 |
| KF417713 | ITALIA | 2007 |
| FJ402963 | USA | 2008 |
| AB823732 | BUTÁN | 2010 |
| AB823731 | BUTÁN | 2010 |
| KP064302 | URUGUAY | 2012 |

Anexo 2. Ejemplo del gel de agarosa de la electroforesis para la detección del fago PP7.



Fotografía de gel de agarosa al 3% teñido con *GoodView*[®] resultante de una corrida electroforética de los productos de la amplificación del control interno (fago PP7).

PM: Peso Molecular. Carriles 1 a 9: muestras positivas para PP7 (banda de 73 pb). C-: control negativo. C+: control positivo.

Anexo 3. Matrices de identidad nucleotídica de los astrovirus humanos clásicos y emergentes.

| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|---|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A | AB823732_BTN/BtnMLB1-86/2010 | ID | 92,5 | 98 | 91,9 | 99,1 | 98,6 | 99,1 | 97,2 | 99,1 | 98,3 |
| B | FJ402983_USA/WD0016/2008 | 92,5 | ID | 91,7 | 98,3 | 92,2 | 92,2 | 92,2 | 92,5 | 92,2 | 91,9 |
| C | JN871233_IND/CRI19963/2004 | 98 | 91,7 | ID | 91,1 | 98,8 | 99,4 | 97,7 | 97,5 | 98,3 | 96,9 |
| D | KF417713_ITA/PR326/2007 | 91,9 | 98,3 | 91,1 | ID | 91,7 | 91,7 | 91,9 | 91,9 | 91,7 | 90,8 |
| E | JN871238_IND/CRI29421/2005 | 99,1 | 92,2 | 98,8 | 91,7 | ID | 99,4 | 98,8 | 98 | 99,4 | 98 |
| F | JN871235_IND/CRI14492/2003 | 98,6 | 92,2 | 99,4 | 91,7 | 99,4 | ID | 98,3 | 98 | 98,8 | 97,5 |
| G | NC014320_HKG/HK05/2005 | 99,1 | 92,2 | 97,7 | 91,9 | 98,8 | 98,3 | ID | 96,9 | 98,8 | 98 |
| H | FJ222451_AUS/MLB1/1999 | 97,2 | 92,5 | 97,5 | 91,9 | 98 | 98 | 96,9 | ID | 97,5 | 96,1 |
| I | HQ674647_EGY/HS5007/2007 | 99,1 | 92,2 | 98,3 | 91,7 | 99,4 | 98,8 | 98,8 | 97,5 | ID | 98 |
| J | KP064302_URY/A148-ME-12/2012 | 98,3 | 91,9 | 96,9 | 90,8 | 98 | 97,5 | 98 | 96,1 | 98 | ID |

Porcentaje de identidades nucleotídicas de la región parcial del ORF2 para las cepas de astrovirus humanos MLB-1.

| | | A | B | C |
|---|---------------------|-----|-----|-----|
| A | URY/A070-TT-09/2011 | ID | 100 | 100 |
| B | URY/A071-TT-09/2011 | 100 | ID | 100 |
| C | URY/A072-TT-09/2011 | 100 | 100 | ID |

| | | A | B | C |
|---|---------------------|-----|-----|-----|
| A | URY/A134-TT-06/2012 | ID | 100 | 100 |
| B | URY/A135-TT-06/2012 | 100 | ID | 100 |
| C | URY/A136-TT-06/2012 | 100 | 100 | ID |

Porcentaje de identidades nucleotídicas de la región parcial del ORF2 para las cepas de astrovirus humanos clásicos que persistieron a los tratamientos realizados en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Treinta y Tres (muestreo de Setiembre de 2011 y de Junio de 2012).

Anexo 4. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de los astrovirus humanos MLB-1.

| | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 |
|------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|
| FJ222451/AUS/MLB1/1999 | G I P H R S A L N D D E I S S D G D T D D D T D T E D E D E F F G E D P I A A L H A L D | | | | |
| NC014320/CHN/HK05/2005 | G I P H R S A L N D D E V S S D G D T D D D T D T E D E D E F F G E D P M A A L H A L D | | | | |
| AB823732/BTN/BtnMLB1-86/2010 | G I P H R S A L N D D E V S S D G D T D E D T D T E D E D E F F G E D P M A A L H A L D | | | | |
| AB823731/BTN/BtnMLB1-40/2010 | G I P H R S A L N D D E V S S D G D T D E D T D T E D E D E F F G E D P M A A L H A L D | | | | |
| KF417713/ITA/PR326/2007 | G I P H R S A S N D D E V T S D - D T D Y D T D T E D E D E F F G E D P I A A L H A V D | | | | |
| FJ402983/USA/WD0016/2008 | G I P H R S A L N D D E V T S D - D T D Y D T D T E D E D E F F G E D P I A A L H A V D | | | | |

Alineamiento del extremo C terminal de la secuencia aminoacídica deducida de cápside de cepas de astrovirus humano MLB-1 de ambos linajes (en amarillo se marca el linaje MLB-1a y en celeste el linaje MLB-1b). Una barra oscura señala los sitios blanco para el corte de las caspasas celulares durante la maduración de la partícula viral previo al egreso de la célula. Nótese que la falta de un aminoácido en la posición 665 posibilita un sitio adicional de corte para las caspasas.