



Virus entéricos en verduras de hojas verdes en Córdoba, Argentina: frecuencia, identificación de genotipos virales y fuentes hídricas de contaminación y evaluación de riesgo de transmisión viral alimentaria

Verónica Emilse Prez.

Tesis (Doctorado en Ciencias de la Salud)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias
Médicas, 2020

Aprobada: 30 de abril de 2020

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>



Virus entéricos en verduras de hojas verdes en Córdoba, Argentina: frecuencia, identificación de genotipos virales y fuentes hídricas de contaminación y evaluación de riesgo de transmisión viral alimentaria por Verónica Emilse Prez se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.



Universidad Nacional de Córdoba

Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud

**VIRUS ENTÉRICOS EN VERDURAS DE HOJAS VERDES EN
CÓRDOBA, ARGENTINA:
frecuencia, identificación de genotipos virales y fuentes
hídricas de contaminación y evaluación de riesgo de
transmisión viral alimentaria**

Lic. Verónica E. Prez

Directora: Dra. Silvia Viviana Nates

Co-Directora: Dra. Patricia Angélica Barril

Córdoba 2020

Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella - Laboratorio de Gastroenteritis Virales



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO

Dr. Alberto Jorge Eraso. Escuela de Nutrición. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Laura Cecilia Martínez. Profesora Asistente. Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Laboratorio de Gastroenteritis Virales. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Silvia Viviana Nates. Profesora Titular. Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Laboratorio de Gastroenteritis Virales. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PUBLICA

Lugar y fecha:.....

Calificación:.....

TRIBUNAL

.....

Dr. Alberto J. Eraso

Escuela de Nutrición.
Facultad de Ciencias
Médicas. Universidad
Nacional de Córdoba.

.....

Dra. Vilma C. Conci

Investigadora Principal
CONICET. Unidad de
Fitopatología y
Modelización Agrícola.
INTA.

.....

Dra. Alicia Cámara

Profesora Asociada.
Instituto de Virología "Dr. J.
M. Vanella". Facultad de
Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de
Córdoba.

Art 43 del reglamento para carrera de doctorado en ciencias de la salud:

“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta tesis”

El presente trabajo de tesis doctoral fue financiado a través de una beca y subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC).

AGRADECIMIENTOS

Un proyecto de investigación no puede llevarse a cabo de manera aislada sin colaboración y este trabajo no es la excepción, en los apartados que se describen a continuación han participado personas que están extraordinariamente capacitadas en cada una de las actividades que desarrollan, por ello muy agradecida:

A mi directora Silvia, por la confianza inicial depositada, todo su conocimiento compartido y su invaluable apoyo.

A Patri, mi codirectora, quien me hizo conocer el mundo de los Rotavirus, dónde todo comenzó...

A los miembros de la comisión asesora Dr. Alberto Eraso y Dra. Laura Martínez por las recomendaciones y sugerencias siempre oportunas y al tribunal evaluador Dra. Alicia Cámara y Dra. Vilma Conci por la dedicación en las correcciones del manuscrito que mejoraron considerablemente el trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Gastroenteritis Virales, Miguel, Laura, Gise y Patty por sus enseñanzas y el apoyo en este proceso de aprendizaje.

A les conchús... por la ayuda, charlas, abrazos, risas... todo es más fácil con ellos!

Al Instituto de Virología del cual me siento orgullosa de pertenecer y a todos sus integrantes por tener siempre un mate a mano, por los retos en esterilización y por las mejores charlas no científicas de los almuerzos y los pasillos.

A los nuevos y viejos amigos que me dejó el cursado de este doctorado.

A mi compañero de viaje por la paciencia en esta última etapa y por apoyarme y acompañarme en este recorrido.

A mis papás y mi hermano, mis cadetes personales en la búsqueda de muestras para este trabajo, gracias por darme la libertad de elegir. A mi familia chiquita por apoyarme en cada una de mis decisiones y elecciones de vida por el inmenso amor que me dieron y me dan diariamente.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS	13
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	16
2. NOROVIRUS	16
2.1. CLASIFICACIÓN	16
2.2. ESTRUCTURA	17
2.3. EPIDEMIOLOGÍA	19
3. ROTAVIRUS	20
3.1. CLASIFICACIÓN	20
3.2. ESTRUCTURA	21
3.3. GENOMA Y PROTEINAS VIRALES	22
3.4. EPIDEMIOLOGÍA	25
3.5. VACUNAS ANTI-ROTAVIRUS	26
4. ASTROVIRUS	28
4.1. CLASIFICACIÓN	28
4.2. ESTRUCTURA	28
4.3. EPIDEMIOLOGÍA	29
5. ENTEROVIRUS	30
5.1. CLASIFICACIÓN	30
5.2. ESTRUCTURA	31
5.3. EPIDEMIOLOGÍA	32
6. ESCENARIO EPIDEMIOLÓGICO DE TRANSMISIÓN VIRAL POR AGUA Y ALIMENTOS CONTAMINADOS	33
6.1. NORMATIVAS VIGENTES	36
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
HIPÓTESIS	41
CAPÍTULO II	
1. INTRODUCCIÓN	43

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.1. Stock Viral.....	44
2.2. Muestras de vegetales y matriz acuosa	45
2.3. Descontaminación vegetal	45
2.4. Prueba de la EFICACIA de concentración viral de rotavirus.....	45
2.5. Determinación del límite de detección (LD) de la técnica de elución y concentración	47
2.6. Detección y cuantificación del genoma de rotavirus	48
2.7. Análisis estadístico	50
3. RESULTADOS	50
3.1. Evaluación de la eficacia del método de elución y concentración de RV en muestras de verduras y de concentración en muestras de PBS inoculadas.....	50
3.2. Límite de detección	51
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	51
CAPÍTULO III	
1. INTRODUCCIÓN.....	55
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
2.1. SISTEMA DE PRODUCCIÓN URBANA: Chacra La Merced – Canal de irrigación Río Suquía ..	56
2.1.1. Descripción del escenario urbano.....	56
2.1.2. Recolección de las muestras	57
2.2. SISTEMA DE PRODUCCIÓN RURAL: Colonia Caroya, verduras y canales de riego	58
2.2.1. Descripción del escenario rural.....	58
2.2.2. Recolección de las muestras	59
2.3. Variables bacteriológicas.....	59
2.4. Concentración de virus en muestras de agua	60
2.5. Elución y concentración de virus en verduras.....	60
2.6. Detección de enterovirus infectivo (iEV).....	60
2.7. Detección y caracterización de genomas de virus	61
2.7.1. Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc	61
2.7.2. Amplificación y caracterización de genomas virales.....	61
2.7.3. Detección del genoma viral.....	65
2.8. Análisis estadístico	65
3. RESULTADOS	65
3.1. Cinturón Verde: Chacra la Merced – Canal de irrigación Río Suquía	65

3.2. Cinturón Verde: Colonia Caroya – Canales de irrigación	69
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO IV	
1. INTRODUCCIÓN.....	82
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
2.1. Muestras de vegetales	82
2.2. Cuantificación del genoma de rotavirus	83
2.3. Análisis cuantitativo de riesgo microbiológico.....	83
3. RESULTADOS	87
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	89
CONCLUSIONES FINALES Y DESAFÍOS.....	91
CONCLUSIONES FINALES	92
DESAFÍOS.....	94
REFERENCIAS.....	96
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	115
Trabajos publicados en revistas científicas internacionales	116
Comunicaciones en jornadas, simposios y/o congresos.....	117
Trabajos en eventos científicos no publicados	117

RESUMEN

Los virus entéricos como norovirus, rotavirus, astrovirus y enterovirus, pueden introducirse accidentalmente en diferentes pasos en la cadena de producción vegetal, siendo el riego de cultivos un posible vehículo de contaminación. Estos virus pueden ingresar a las aguas superficiales a través de la descarga de aguas residuales tratadas, insuficientemente tratadas o no tratadas. En este punto, la contaminación microbiológica cobra cada vez más relevancia, particularmente en nuestro país, debido a que en las últimas décadas se ha incrementado la fragilidad de los sistemas hídricos, reflejado en las dificultades para la evacuación de aguas residuales, las que muchas veces son vertidas en matrices acuosas superficiales utilizadas para riego. La situación planteada genera un escenario epidemiológico de transmisión viral en el que participan aguas contaminadas utilizadas para riego y alimentos asociados al riego, situación que finalmente impacta en la salud de la población expuesta. Este escenario de transmisión viral también genera un nuevo desafío referido a estimar la magnitud del riesgo de infección viral por consumo de alimentos. Así, las verduras de hoja verde, componentes importantes de las dietas cotidianas, podrían ser uno de los principales alimentos involucrados en la transmisión de virus entéricos, ya que se consumen crudos y generalmente sin un procedimiento exhaustivo de lavado o descontaminación.

Con el objeto de conocer la calidad virológica de verduras de hojas verdes, inferir posibles fuentes de contaminación y evaluar el riesgo de transmisión alimentaria de virus entéricos a población expuesta se analizaron unidades de producción primaria de verduras y sus correspondientes aguas de irrigación en el cinturón verde de la ciudad de Córdoba, Argentina.

Como producto del desarrollo de este trabajo de tesis doctoral se arribaron a las siguientes conclusiones.

Se logró la optimización de una técnica para eluir y concentrar virus a partir de matrices acuosas y verduras que arrojó valores aceptables de recuperación viral y de detección de carga genómica inicial en las matrices analizadas.

La detección de genomas de norovirus, rotavirus, astrovirus humanos y enterovirus infeccioso en las aguas de riego y en las verduras de hoja analizadas sugiere

que la contaminación de estas matrices se produjo durante todo el período estudiado en las dos unidades productivas analizadas del cinturón verde de Córdoba. Basados en la simultaneidad de detección de virus entéricos, en los perfiles genotípicos identificados y en el análisis filogenético de cepas de norovirus en el agua de riego y en las verduras, es posible sugerir que las aguas son la fuente de contaminación de las verduras durante la fase de producción.

La presencia de enterovirus infectivo en las muestras estudiadas indica condiciones adecuadas de matriz para mantener la infectividad de los otros virus analizados por detección genómica. Sumado a esto la detección de enterovirus humano refleja que la contaminación fecal es de origen humano.

La probabilidad media diaria de infección con rotavirus por consumir vegetales crudos lavados, varía en función del lugar de origen de los vegetales, la concentración y prevalencia del virus en estas matrices alimenticias, reflejando la necesidad de un abordaje local de la situación. El valor medio de probabilidad de infección por consumo de verduras producidas en el cinturón verde de la provincia de Córdoba resultó > al 50%.

La presencia de genomas virales y partículas infecciosas en alimentos que, en general, no sufren ningún tratamiento antes del consumo, destacan a estos cultivos como potenciales fuentes de transmisión de virus entéricos a población expuesta.

Estos resultados son los primeros datos para Argentina y desafían a estudios futuros en distintas áreas productivas.

ABSTRACT

Enteric viruses such as norovirus, rotavirus, astrovirus and enterovirus, can be accidentally introduced in different steps in the vegetable production chain, being the irrigation of crops one of the main vehicles of contamination. These viruses can enter to surface waters through the discharge of treated, insufficiently treated or untreated wastewater. At this point, microbiological contamination is becoming increasingly important, particularly in our country, because in recent decades the fragility of water systems has increased, reflected in the difficulties for wastewater evacuation, which many times they are shed into surface aqueous matrices used for irrigation. The situation raised generates an epidemiological scenario of viral transmission in which contaminated water used for irrigation and food associated with irrigation participate, a situation that ultimately impacts the health of the exposed population. This scenario of viral transmission also generates a new challenge related to estimating the magnitude of the risk of viral infection due to food consumption. Thus, green leafy vegetables, important components of daily diets, could be one of the main foods involved in the transmission of enteric viruses, since they are eaten raw and generally without a thorough washing or decontamination procedure.

In order to know the virological quality of green leafy vegetables, infer possible sources of contamination and assess the risk of food transmission of enteric viruses to exposed population, primary vegetable production units and their corresponding irrigation waters were analyzed in the green belt from the city of Córdoba, Argentina.

As a result of the development of this doctoral thesis work, the following conclusions were reached.

The optimization of a technique to elute and concentrate viruses from aqueous matrices and vegetables that yielded acceptable values of viral recovery and initial genomic load detection in the analyzed matrices was achieved.

The detection of norovirus, rotavirus and human astrovirus genomes and infective enterovirus in the irrigated waters and in the leafy vegetables analyzed suggests that the contamination of these matrices occurred during the entire period studied in the two productive units analyzed in the green belt of Córdoba. Based on the simultaneity of

detection of enteric viruses, on the genotypic profiles identified and on the phylogenetic analysis of norovirus strains in irrigation water and on vegetables, it is possible to suggest that water is the source of contamination of vegetables during production phase.

The presence of infective enterovirus in the samples studied indicates adequate matrix conditions to maintain the infectivity of the other viruses analyzed by genomic detection. In addition to this, the detection of human enteroviruses reflects that fecal contamination is of human origin.

The average daily probability of infection with rotavirus by consuming washed raw vegetables varies depending on the place of origin of the vegetables, the concentration and prevalence of the virus in these food matrices, reflecting the need for a local approach to the situation. The average probability of infection due to consumption of vegetables produced in the green belt of the province of Córdoba was > 50%.

The presence of viral genomes and infectious particles in foods that, in general, do not undergo any treatment before consumption, highlight these crops as potential sources of enteric virus transmission to the exposed population.

These results are the first data for Argentina and challenge future studies in different productive areas.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

°C	grados centígrados
µL	microlitro
µg	microgramo
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNdc	Ácido Ribonucleico doble cadena
ARNsc	Ácido Ribonucleico simple cadena
CCID ₅₀	del inglés <i>50% Cell Culture Infectious Dose</i>
cg	copias genómicas
cm	centímetro
EH	estación húmeda
ES	estación seca
EV	enterovirus
g	gramo
HAstV	astrovirus humanos
h	hora
iEV	enterovirus infectivo
km ²	kilómetros cuadrados
L	litro
m	metro
m ³	metros cúbicos
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanómetro
nt	nucleótidos
NMP	número más probable
NoV	norovirus
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>
p/v	peso / volumen
pb	pares de bases
PBS	del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	polietilenglicol
ppm	partes por millón
QMRA	del inglés <i>Quantitative Microbiological Risk Assessment</i>
q-RT-PCR	del inglés <i>quantitative Reverse Transcription of Polymerase Chain Reaction</i>
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos
rpm	revoluciones por minuto
RV	rotavirus
RVA	rotavirus grupo A

seg	segundo
U	unidades
UE	Unión Europea
USA	<i>United States of America</i>

CAPÍTULO I

Virus gastroentéricos y escenario epidemiológico



1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos constituyen un problema creciente de salud pública en todo el mundo. La manifestación clínica más frecuente es la diarrea, afectando principalmente a niños, mujeres embarazadas y ancianos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia anual de diarrea en el mundo es de 1.500 millones de casos, con una mortalidad de 3 millones de niños menores de 5 años de edad. Se estima que el 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos y/o sus toxinas (WHO, 2006). En Argentina los datos publicados de gastroenteritis por transmisión alimentaria son muy escasos (Di Pietro et al., 2004) y solo hay reportado un brote asociado a virus (Gomes et al., 2007). Recientemente se ha dado a conocer a través de medios de difusión general, un brote producido por norovirus que afectó en 30 días a aproximadamente 1200 estudiantes que estaban de viaje de egresados en la localidad de Bariloche, provincia de Río Negro (REC, 2019).

Al presente se han identificado alrededor de 250 agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas, metales y químicos. Entre los patógenos, los virus genéricamente llamados entéricos, en particular los norovirus, pero también otros como los rotavirus y enterovirus, y con menor frecuencia los astrovirus, son los principales agentes etiológicos asociados a ETA, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Fleet et al., 2000; Koopmans and Duizer, 2004; Parada-Fabian et al., 2016; Widdowson et al., 2005). A continuación se describen las principales características de los grupos virales más relevantes asociados a ETAs.

2. NOROVIRUS

2.1. CLASIFICACIÓN

La familia *Caliciviridae* está conformada por los géneros *Norovirus* (NoV), *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus* (ICTV, 2017). Dentro de esta familia los principales patógenos humanos son norovirus y sapovirus, los virus agrupados en los

otros géneros están asociados a infecciones en un amplio rango de animales que incluyen mamíferos no humanos, peces, reptiles e insectos.

2.2. ESTRUCTURA

Los norovirus son viriones no envueltos de entre 38 y 40 nm de diámetro, de estructura icosaédrica. La cápside viral contiene 90 dímeros de la proteína VP1 y algunas copias de la proteína VP2. VP1 tiene dos dominios en su estructura: uno de escudo (S) que rodea al ARN viral; y otro protuberante (P) que contiene los sitios de especificidad antigénica y cuya variabilidad confiere las diferencias entre cepas. VP2 está ubicada en el interior de la partícula y muy probablemente esté involucrada en el ensamblaje de la cápside y la encapsidación del genoma (Vongpunsawad et al., 2013). La proteína VP1 además, tiene la capacidad de auto ensamblarse para formar partículas similares al virus, en un proceso eficiente que no requiere ARN ni de la proteína menor de la cápside VP2 (Figura 1). De esta manera con 30 dímeros de VP1 se forman partículas similares al virus, de tamaño más pequeño y no infectivas (23 nm).

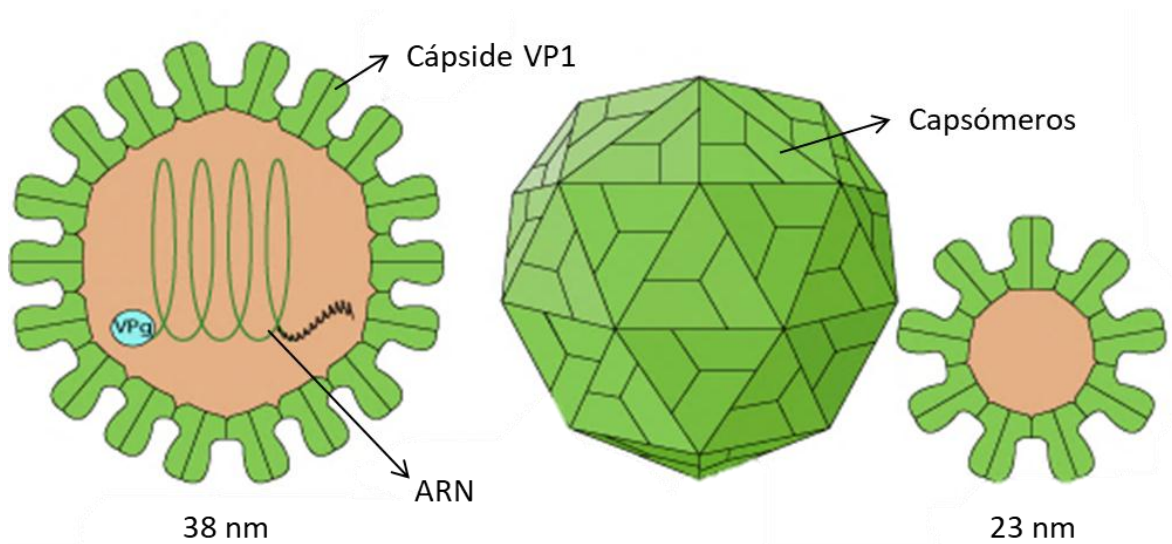


Figura 1. Esquema del virión. (Adaptado de Viralzone: <https://viralzone.expasy.org/>)

El material genético de NoV está organizado en una simple hebra de ARN de polaridad positiva de entre 7,3 y 8,5 kb. En su extremo 5' se encuentra unido a una proteína VPg (proteína de unión al genoma) que lo liga covalentemente a las proteínas de

la cápside y en el extremo 3' terminal se encuentra poliadenilado (Figura 2 A). Las proteínas no estructurales se codifican a partir del extremo 5' del genoma y las estructurales hacia el extremo 3'. Dos regiones conservadas (CR) se encuentran a lo largo del genoma y sirven como plantilla para la traducción de las proteínas estructurales y no estructurales. Presenta tres marcos de lectura abiertos ORF1, ORF2 y ORF3 (ORF, del inglés *open reading frame*) (Figura 2 B). El ORF1 codifica una poliproteína que se escinde después de la traducción en siete proteínas maduras no estructurales (NS1 a NS7) que están involucradas en la replicación viral. El ORF2 codifica la proteína estructural principal (VP1) de aproximadamente 60,000 Da, y el ORF3 codifica una proteína estructural menor (VP2) de entre 12.000 y 29.000 Da (Figura 2 C) (Bull et al., 2005; Glass et al., 2000; Green, 2013; Prasad et al., 1999).

A. Organización genómica



B. Marcos de lectura



C. Distribución de genes



Figura 2. Estructura genómica de NoV: **A:** ARN de sentido positivo unido covalentemente a la proteína (VPg) en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. **B:** Organización genómica de los marcos de lectura. **C:** Organización de la poliproteína codificada en ORF1 y proteínas estructurales.

A excepción de las cepas murinas, los norovirus no replican en líneas celulares, lo que impide su clasificación en distintos serotipos. Por lo tanto, la clasificación de los norovirus se basa en técnicas de biología molecular, que han permitido su organización en 10 genogrupos (GI a GX), en base a la agrupación filogenética de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína VP1. A su vez, cada genogrupo agrupa numerosos

genotipos. Hasta la fecha, 9 genotipos de cápside han sido reconocidos en GI y 27 en GII (Chhabra et al., 2019). El genogrupo GIV incluye 2 genotipos, de los cuales GIV.1 se ha detectado en infecciones en humanos y GIV.2 en especies felinas y caninas. Los genogrupos GI y GII son responsables de la mayoría de las enfermedades diarreicas en humanos, asociados a brotes y a la circulación endémica del virus (Vinje, 2015).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

NoV es reconocido como una de las principales causas de casos esporádicos y brotes de gastroenteritis aguda infecciosa en todos los grupos de edad. Representa más del 90% de las gastroenteritis epidémicas víricas en todo el mundo y un 17% de los casos esporádicos de gastroenteritis aguda en países en desarrollo (Nguyen et al., 2017). Al presente es considerado como la segunda causa más importante (después de rotavirus) de gastroenteritis grave en bebés y niños pequeños en todo el mundo. Sin embargo, cabe destacar que en los países que han introducido la vacuna anti-rotavírica, NoV ha emergido como la causa principal de hospitalización por gastroenteritis aguda infecciosa en la población pediátrica (O’Ryan et al., 2017).

NoV se propaga mediante diversas vías de transmisión, las principales son el contacto de persona a persona y a través de alimentos o agua contaminados, representando la etiología más frecuente de brotes de gastroenteritis asociada al consumo de agua y alimentos en todos los grupos etarios (Figura 3) (Aboubakr and Goyal, 2019). La respuesta inmune a la infección por NoV es pobre y de corta duración, por lo que es frecuente la reinfección con la misma variante viral (Kroneman et al., 2008; Moore et al., 2015).

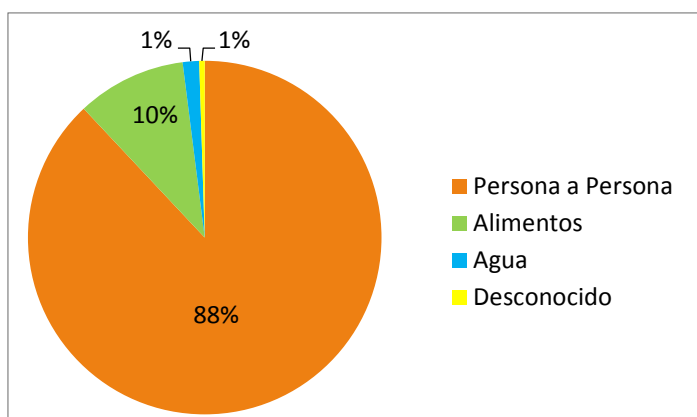


Figura 3. Vías de transmisión informadas a partir de 5.036 brotes de NoV que se produjeron en Europa durante el período comprendido entre 2001 y 2006 (Aboubakr and Goyal, 2019).

El control de brotes producidos por NoV se basa en la prevención de la propagación del virus a otras áreas por parte de personas enfermas (que son altas excretoras del virus), el lavado frecuente de manos y la descontaminación ambiental efectiva. En matrices ambientales y fómites NoV es resistente a detergentes o limpieza a base de etanol, por lo que se requiere una desinfección química adicional, como hipoclorito de sodio o limpiadores a base de peróxido de hidrógeno ó fenoles (Division of Viral Diseases and National Center for Immunization Respiratory Diseases, 2011). Se debe prestar especial atención al procesamiento higiénico de los alimentos debido a la frecuente aparición de brotes de origen alimentario (Moore et al., 2015).

La diversidad de cepas y rápida evolución de los NoVs presentan un desafío constante en el manejo de la enfermedad y en el desarrollo de vacunas. Sumado a esto, al presente, no se dispone de un sistema celular in vitro permisivo para la replicación viral, lo que imposibilita determinar el rango de diversidad serotípica de las cepas circulantes.

3. ROTAVIRUS

3.1. CLASIFICACIÓN

Rotavirus (RV) integra uno de los once géneros dentro de la familia *Reoviridae*, que incluye patógenos humanos, animales y de plantas (Géneros: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Seadornavirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Entomoreovirus*, *Phytoreovirus*, *Fijivirus* y *Oryzavirus*) (ICTV, 2017).

A su vez, el género *Rotavirus* incluye 10 especies o grupos virales denominados con letras de la A a la J (RVA-RVJ) que se clasifican en base a las diferencias antigénicas de la proteína viral más abundante (VP6) (Crawford et al., 2017). Los grupos A, B, C y H han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G sólo en animales (Matthijssens and Van Ranst, 2012). Es ampliamente reconocido a nivel mundial que más del 90% de las infecciones por RV en humanos son causadas por rotavirus del grupo A (RVA).

3.2. ESTRUCTURA

Visualizado al microscopio electrónico, rotavirus (del Latín *rota*: rueda) tiene una apariencia característica similar a una rueda de rayos cortos (Figura 4 A). Son virus desnudos, de simetría icosaédrica, de aproximadamente 100 nm de diámetro, incluyendo espículas. La información genética viral está contenida en 11 segmentos de ARN doble cadena (ARNdc), rodeados por tres cápsides proteicas concéntricas: la externa, la media y la interna o core (Figura 4 B) (Estes and Greenberg, 2013).

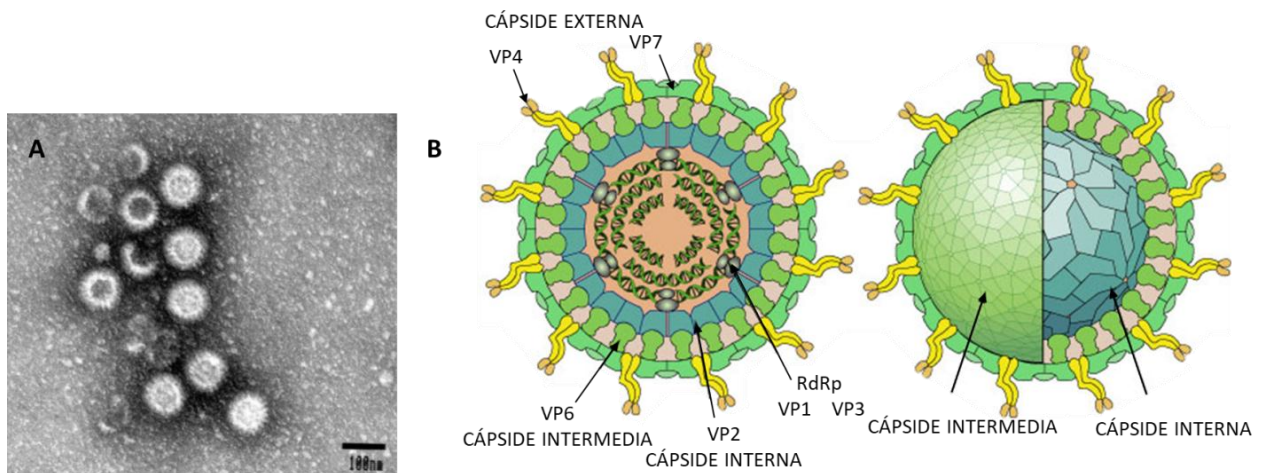


Figura 4. A. Microscopía electrónica de rotavirus. Tinción negativa con acetato de uranilo. (Laboratorio de Gastroenteritis Virales. Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, 2001). **B.** Diagrama esquemático de una partícula de rotavirus compuesta por sus tres cápsides concéntricas (Adaptado de ViralZone: <https://viralzone.expasy.org/>)

Al microscopio electrónico se pueden observar tres tipos de partículas. Las partículas infecciosas completas (viriones) o también llamadas de triple capa con un diámetro de 100 nm, tamaño relativamente grande para un virus icosaédrico no envuelto; las partículas de doble capa no infecciosas, que carecen de la capa externa y se describen como partículas rugosas porque en su periferia muestran subunidades triméricas proyectadas desde la cápside interna; y las partículas de una sola capa que se ven con poca frecuencia y por lo general, carecen de ARN genómico y se agregan. En una muestra de materia fecal de un individuo infectado es posible observar las tres estructuras virales y por lo tanto las distintas morfologías de partícula (McClain et al., 2010).

3.3. GENOMA Y PROTEINAS VIRALES

3.3.1. Genoma viral

El genoma de RV lleva la información en 11 segmentos génicos que segregan independientemente y pueden ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida, en un patrón diferencial de bandas denominado electroferotipo. En la mayoría de los casos, el patrón electroforético está compuesto por cuatro segmentos de ARNdc de alto peso molecular (segmentos 1 al 4), dos segmentos medianos (5 y 6), un triplete distintivo de los segmentos (7 a 9) y dos segmentos más pequeños (10 y 11). El patrón de RVA es comúnmente descrito como 4-2-3-2 (Figura 5).

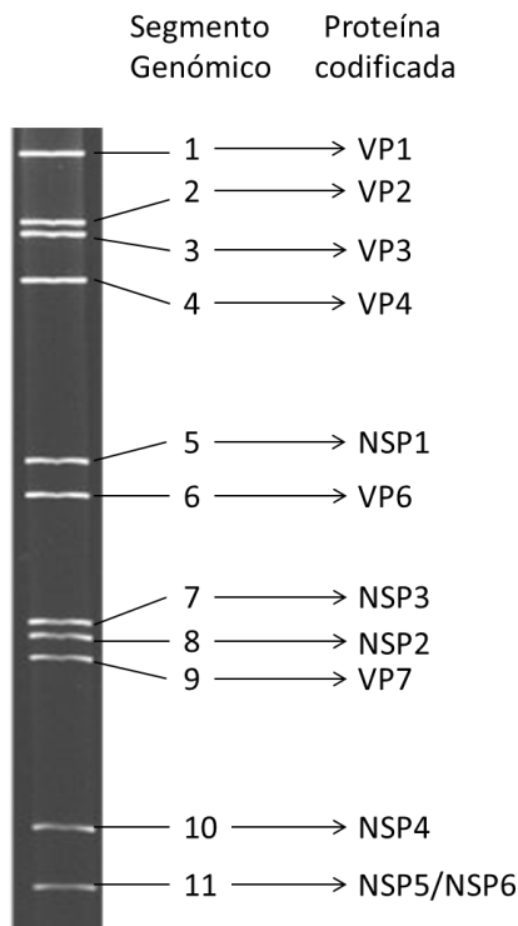


Figura 5. Gel de poliacrilamida mostrando los 11 segmentos genómicos de ARN de y las proteínas que codifican. El tamaño de los segmentos varía entre 3.302 pb en el segmento 1 y 667 pb en el segmento 11.

Cada uno de los segmentos génicos, codifica para una proteína, excepto el segmento 11 que posee dos marcos de lectura abiertos. De las proteínas codificadas, seis son estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6) (Tabla 1) (Estes and Greenberg, 2013).

Tabla 1. Características y función de las proteínas de RV.

Proteína	Ubicación	Características y Funciones
VP1	Núcleo	ARN polimerasa, unión al ARN simple cadena (ARNsc), participa en la transcripción viral junto con VP3 y en la replicación viral junto con VP2
VP2	Cápside Interna	ARN ligasa, unión al ARNdc y ARNsc, requerida para la actividad replicasa de VP1
VP3	Núcleo	Guanidiltransferasa, metiltransferasa, unión a ARNsc, participa en la transcripción viral junto con VP1
VP4	Cápside Externa	Antígeno neutralizante, hemaglutinina, potenciación de la infectividad por proteasa, adhesión a la célula, induce protección
NSP1	No estructural	Unión a ARN, rol en la supresión de la respuesta a interferón, se asocia al citoesqueleto
VP6	Cápside Intermedia	Antígeno de grupo y subgrupo, hidrofóbica, proteína mayoritaria
NSP3	No estructural	ARN ligasa, unión extremo 3' del ARNm viral, involucrada en la regulación de la traducción viral
NSP2	No estructural	ARN ligasa, unión al ARNsc, actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa), involucrada en la formación del viroplasma junto con VP1 y NSP5
VP7	Cápside Externa	Antígeno neutralizante, glicoproteína integrada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), unión al Ca ⁺² , induce protección
NSP4	No estructural	Enterotoxina, glicoproteína de transmembrana del RER, induce protección
NSP5	No estructural	ARN ligasa, unión al ARNsc, fosfoproteína, interacción con VP2, NSP2 y NSP6, involucrada en la formación del viroplasma junto con NSP2
NSP6	No estructural	Interacción con NSP5, presente en viroplasmas y en la mayoría de cepas, unión a ARN

*(Estes and Greenberg, 2013)

3.3.2. Proteínas VP4 y VP7: base de la clasificación genómica

La genotipificación es el sistema más usado para la clasificación de RV. Los genotipos G y P se basan en la diversidad de las secuencias nucleotídicas que codifican dos proteínas de la cápside externa: VP7 y VP4, respectivamente. A la fecha, se han reportado 29 genotipos G y 41 genotipos P en especies de mamíferos y aves (Tabla 2) (Adamo and Contigiani, 2018; Matthijssens et al., 2011; Trojnar et al., 2013).

Tabla 2. Genotipos de circulación más frecuente de RVA según la proteína VP7 (G tipos), la proteína VP4 (P tipos) y su hospedador.

Proteína VP7			Proteína VP4		
Serotipo	Humano	Especie animal	Serotipo	Humano	Especie animal
G1	+	Porcino, bovino	1 ^a	+	-
G2	+	Porcino	1B	+	-
G3	+	Simiano, canino, felino,	2 ^a	+	-
		equino, porcino, murino, conejo	2B	-	Porcino
G4	+	Porcino	3 ^a	+	Felino
G5	+	Porcino, equino	3B	+	-
G6	+	Bovino	4	+	-
G7	-	Aviar, bovino	5 ^a	+	Canino, felino
G8	+	Bovino	5B	-	Simiano
G9	+	Porcino	6	-	Bovino, simiano
G10	+	Bovino, ovino	7	-	Bovino
G11	+	Porcino	8	-	Bovino
G12	+	-	9	-	Porcino
G13	-	Equino	10	-	Murino
G14	-	Equino	11	+	¿?
G15	-	Bovino			

Los segmentos génicos que codifican para las proteínas VP7 y VP4 son segregados independientemente, pudiendo generar una gran variabilidad de combinaciones de G/P tipos. Sin embargo, más del 90% de las infecciones en humanos en el mundo son causadas por los genotipos G1-G4 y G9, en combinación con P[8] y P[4], si bien la prevalencia y distribución de los mismos varía en el tiempo y en cada región (Dennehy, 2008). En Sudamérica la situación refleja predominancias similares a las que se ven a nivel

global, aunque en los últimos años se observaron genotipos inusuales como G5 en Brasil y G12 en algunas ciudades de Argentina (Degiuseppe et al., 2017). En la ciudad de Córdoba en particular, estudios de epidemiología molecular, previos a la introducción de la vacuna anti-rotavirus en el Calendario Nacional de Vacunación han demostrado la circulación continua y dominante en el tiempo del genotipo G1P[8], durante un período de 30 años. En estos estudios se determinó también la circulación frecuente en la población local de los genotipos G2, G4 y P[4], y la emergencia en el tiempo del genotipo G9. El genotipo G3, de circulación común a nivel mundial, fue detectado esporádicamente en la población de Córdoba, emergiendo en frecuencia de detección y tomando una posición más dominante en los últimos años (Barril et al., 2010; Barril et al., 2006).

3.4. EPIDEMIOLOGÍA

RVA es uno de los principales agentes etiológico causantes de diarrea severa en niños menores de 5 años en el mundo. Más de 125 millones de infantes y niños jóvenes desarrollan diarrea por RV cada año a nivel global, resultando en 440.000 muertes, la mayoría en países en vías de desarrollo (Tate et al., 2012). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad causada por RV es similar en niños de países en vías de desarrollo como de países desarrollados. Así lo refleja un estudio realizado en el año 2012 que reveló que la tasa de detección de infección por rotavirus en niños hospitalizados con diarrea fue del 39% en países en vías de desarrollo y del 44% en países desarrollados (Tate et al., 2012). Esto indica que la infección por el virus no está relacionada al nivel socioeconómico de la población y que el suministro de agua limpia y la correcta higiene tiene poco impacto en la transmisión de rotavirus. Aun así, los niños de países en desarrollo muestran una mayor tasa de mortalidad, relacionada a un cuadro clínico de mayor severidad como consecuencia a deficiencias en los sistemas sanitarios y malnutrición infantil. Como ejemplo, en países en vías de desarrollo como Bangladesh, RV es causante de entre 6.000 y 14.000 muertes al año en niños menores a 5 años, mientras que en un país desarrollado como Estados Unidos con aproximadamente el doble de habitantes, el número de muertes es menor a 40 (Raebel and Ou, 1999; Tanaka et al., 2007).

En Latinoamérica se ha estimado que RV ha sido la etiología de aproximadamente 6.300 muertes y cerca de 230.000 hospitalizaciones por año en ausencia de vacunación (Desai et al., 2012). En particular, en Argentina la enfermedad por este virus deja como saldo alrededor de 150.000 consultas ambulatorias por diarrea, 15.000 internaciones y 30 muertes anuales en niños menores de 5 años (Degiuseppe et al., 2013).

3.5. VACUNAS ANTI-ROTAVIRUS

Con el transcurrir de décadas de estudios, en el año 2006 se licenciaron dos vacunas contra rotavirus: Rotarix® (Glaxo Smith Kline Biologicals SA, Rixensart, Bélgica) y RotaTeq® (Merck & Co., Inc., West Point, PA, USA), las cuales se introdujeron casi de inmediato en los programas nacionales de inmunización de algunos países. Luego de que en el año 2009 se demostrara en países en desarrollo la eficacia de estas vacunas orales para la disminución drástica de la mortalidad y hospitalización por RV, la OMS recomienda en forma prioritaria para lactantes, la inclusión de la vacuna contra rotavirus en los programas de vacunación (WHO, 2013). A finales de 2018, 92 países de todo el mundo habían introducido la vacuna contra el rotavirus en sus programas nacionales de inmunización, y otros 6 países lo estaba realizando de forma gradual o regional (Figura 6) (Burke et al., 2019).

Desde la comercialización de estas vacunas, la inmunización universal masiva contra rotavirus ha ido en progreso, con considerables variaciones regionales. La vacuna Rotarix® fue implementada en los programas nacionales de inmunización de diversos países de América Latina (incluyendo Argentina), como así también en Sudáfrica, Australia y algunos países europeos; mientras que RotaTeq® fue introducida en el programa universal de vacunación de Estados Unidos y Finlandia (Burke et al., 2019). En la Tabla 3 se presentan las principales características de estas dos vacunas anti-rotavirus licenciadas a nivel mundial (van Hoek et al., 2012).

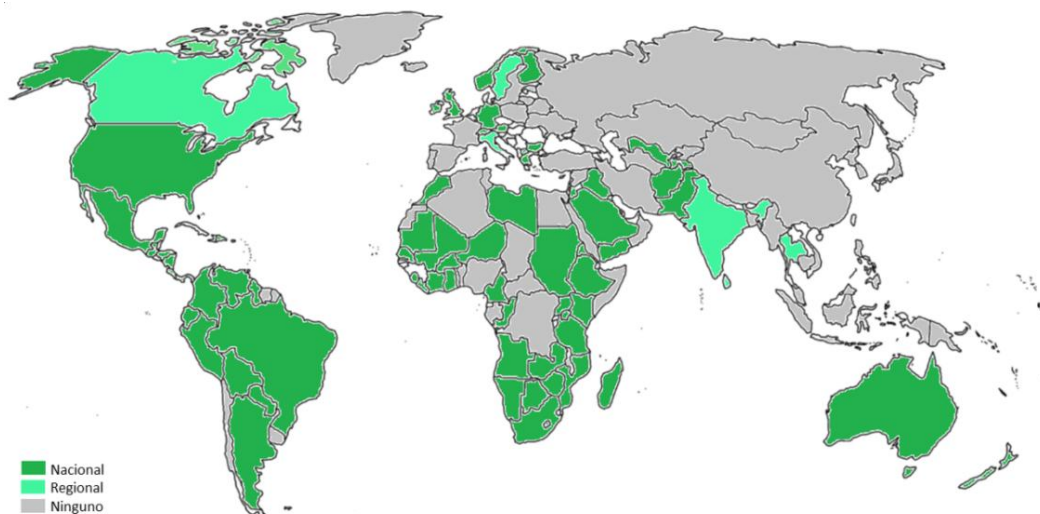


Figura 6. Mapa de introducción de la vacuna contra rotavirus a nivel mundial. En verde oscuro se presentan los países con una introducción a nivel nacional y en verde claro los que presentan una introducción por fases o por regiones. En gris se muestran los países que no han introducido la vacuna en sus calendarios nacionales de vacunación (Burke et al., 2019).

Tabla 3. Características de las vacunas RotaTeq® y Rotarix®.

	ROTATEQ® Pentavalente recombinante humana-bovina atenuada	ROTARIX® Monovalente humana atenuada
Cepa	WC-3	RIX4414
Serotipos	G1, G2, G3, G4 y P[8]	G1 P[8]
Vía de administración	Oral	Oral
Esquema	4-10 semanas entre dosis	4-8 semanas entre dosis
Nº de dosis	Tres	Dos
Respuesta de la vacuna	No replica bien en el intestino, por lo que necesita más dosis, poca protección cruzada frente a otros serotipos	Replica en intestino y confiere protección cruzada natural frente a los serotipos G2, G3, G4 y G9 (88% protegidos después de la 1 dosis)
Nº de pacientes	68.038	63.225
Reducción de la hospitalización por RV	95,8 %.	85 %

Las vacunas anti-rotavirus inducen inmunidad humoral y celular homotípica y heterotípica cruzada contra los diferentes genotipos virales y ha sido formulada con el objetivo de generar protección contra la enfermedad diarreica grave, pero no evita re infecciones por el virus, las cuales se traducen en cuadros clínicos leves y moderados.

En Argentina a partir de enero del 2015 se incorporó la vacuna oral Rotarix® en el Calendario Nacional de Vacunación con el fin de proteger lactantes menores de 6 meses y así disminuir la incidencia, internación y mortalidad por diarrea aguda de etiología rotaviral. La distribución de la vacuna es gratuita y está disponible en todos los centros de salud y vacunatorios públicos del país.

4. ASTROVIRUS

4.1. CLASIFICACIÓN

La familia *Astroviridae* incluye a los géneros *Mamastrovirus* y *Avastrovirus*. Los virus que pertenecen al género *Mamastrovirus* han sido aislados de diferentes especies de mamíferos incluyendo humanos (HAstV), cerdos (PAstV), gatos (FeAstV), ovejas (OAstV), terneros (BoAstV), perros (CaAstV), murciélagos (BAstV), ratas (RAstV), ciervos (CcAstV), y mamíferos marinos como leones marinos (CSIAstV), entre otros. Este género alberga dos genogrupos, GI y GII, con 10 y 9 especies de genotipos, respectivamente. La especie de *Astrovirus humanos* (HAstV) se encuentra dentro del genogrupo I y comprende 8 genotipos (HAstV-1 a HAstV-8). Los virus del género *Avastrovirus* han sido aislados de aves como pavos (TAstV), patos (DAstV), y pollos (CAstV), entre otros (ICTV, 2017; Méndez and Arias, 2013).

4.2. ESTRUCTURA

En 1975, Madeley y Cosgrove describieron virus pequeños de entre 28 y 30 nm de diámetro en las heces de bebés internados con diarrea y vómitos (Figura 7A). Estos virus mostraban una apariencia distintiva de estrella de cinco o seis puntas por la cual acuñaron el término "astrovirus" del griego *astron* que significa "estrella" (Madeley and Cosgrove, 1975).

Los astrovirus son virus desnudos de simetría icosaédrica y su genoma está conformado por una hebra simple de ARN de polaridad positiva. Presentan tres marcos de lectura abierta: ORF1a y ORF1b, ubicados hacia el extremo 5' del genoma, codifican proteínas no estructurales que se presume están involucradas en la transcripción y replicación del genoma del virus; y el tercer marco de lectura, el ORF2, se encuentra en el extremo 3' del genoma y codifica la poliproteína de la cápside. Estructuralmente la cápside de los astrovirus está conformada por las proteínas VP34, VP25 y VP27, siendo estas dos últimas las que dan forma a las espículas que le confieren la estructura estrellada característica (Figura 7B).

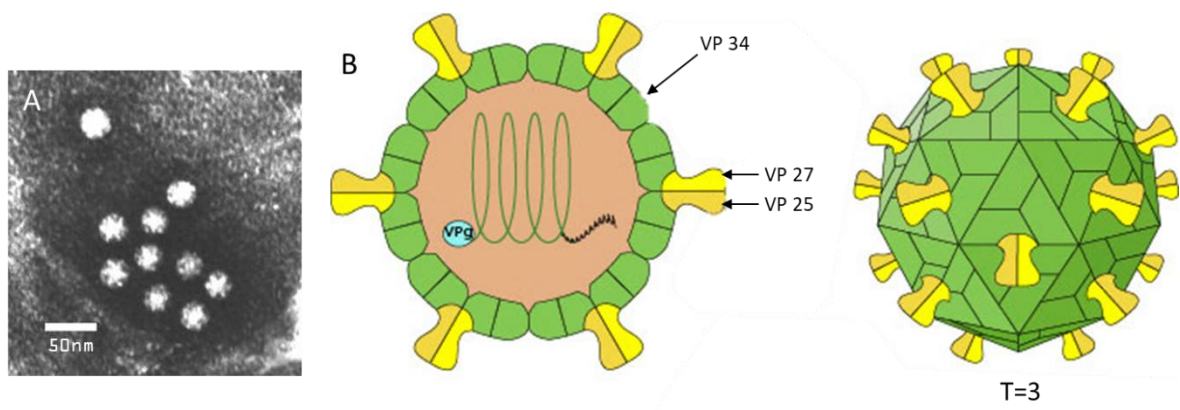


Figura 7. A. Microscopía electrónica de astrovirus. Tinción negativa con acetato de uranilo. B. Diagrama esquemático de una partícula de astrovirus con las espículas que le confieren su forma característica (Adaptado de ViralZone: <https://viralzone.expasy.org/>)

4.3. EPIDEMIOLOGÍA

Los HAsTV se han identificado en casos de diarrea esporádica y están asociados a una amplia gama de entidades clínicas que incluyen diarrea, vómitos, fiebre, dolor abdominal, bronquiolitis y otitis (Méndez and Arias, 2013).

La vigilancia de HAsTV realizada en varios países en el mundo indica que la prevalencia de este virus es variable, desde <1% al 40% de los casos de diarrea, estas variaciones dependen del área geográfica, los períodos de estudio, los grupos de edad y los métodos de detección. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, la tasa de prevalencia de HAsTV es aproximadamente del 10%, un valor que resulta bajo en

comparación a la prevalencia de diarreas por RVA (aproximadamente 40%) y NoV GII (32%) (Chaimongkol et al., 2012; Chhabra et al., 2013). Los HAstV infectan predominantemente a niños, presentando tasas de infección más altas en niños menores de 2 años y con frecuencia, en infecciones mixtas con RVA (Iturriza Gomara et al., 2008).

Entre los HAstV que circulan en la población humana, HAstV1 es el genotipo más prevalente a nivel mundial en niños con diarrea, pero esto también varía según la región geográfica. Por ejemplo en Asia HAstV1 representa más del 80% de las cepas que circulan, mientras que otros genotipos (HAstV2-HAstV8) son poco comunes y responsables de sólo el 1-6% de las infecciones. Se observan tasas de detección más bajas de HAstV1 en América del Norte (30%), América del Sur (43%) y África (46%). HAstV1 junto con HAstV2 y HAstV4 circulan regularmente en Europa, América del Norte y América del Sur, y representan el 89-98% de las cepas de astrovirus, mientras que HAstV5-HAstV8 son poco comunes y representan sólo entre el 2 y 11% de las cepas circulantes. Por el contrario, la distribución de los genotipos de HAstV en África es diferente de la distribución en otras regiones, ya que los genotipos HAstV8 y HAstV5, son el tercer y cuarto tipo más prevalentes después de HAstV1 y HAstV3 (Khamrin et al., 2016).

Al igual que el resto de los virus que se describen en este apartado, la vía de transmisión de astrovirus es fecal-oral, ya sea por contacto directo con personas infectadas o por ingestión de alimentos o aguas contaminadas. Se han aislado HAstV de diversas fuentes ambientales como aguas y alimentos y en algunos casos estos aislamientos han sido relacionados a brotes, en escuelas, guarderías, reclutamientos militares y hospitales, reforzando la idea de que el agua es una de las vías de transmisión y una fuente importante de contaminación (Bosch et al., 2014; Lizasoain et al., 2015; Sezen et al., 2015).

5. ENTEROVIRUS

5.1. CLASIFICACIÓN

La familia *Picornaviridae* incluye al género *Enterovirus* (EV), el cual agrupa 4 especies denominadas con letras de la A a la D (Enterovirus A - Enterovirus D), que suman más de 100 serotipos virales entre ellas, y además este género incluye a las especies de

los Rhinovirus (Pallansch et al., 2013). En la Tabla 4 se presentan las especies y tipos de EV asociados a infecciones en humanos.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de los enterovirus humanos patógenos.

Género	Especie	Tipo
Enterovirus	Enterovirus A	Coxsackie A (Cox A 2-8, 10, 12, 14 y 16) Echovirus 71
	Enterovirus B	Coxsackie B (Cox B 1-6) Echovirus (EV 1-7, 11-21, 24-27, 29-33 69 y 73)
	Enterovirus C	Poliovirus 1-3
	Enterovirus D	Echovirus 68 y 70
	Rhinovirus A-D	Numerosos

5.2. ESTRUCTURA

Los virus agrupados en el género EV se encuentran entre los virus más pequeños conocidos, con un diámetro de entre 20 y 30 nm, presentan una simetría icosaédrica y su cápside contiene el genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Estructuralmente están conformados por cuatro proteínas: VP1, VP2, VP3 y VP4, las tres primeras ubicadas en la superficie externa de la cápside, y son las que median la adhesión y entrada del virus a la célula. La proteína VP4 se encuentra en la cara interna de la cápside y cumple una función importante en la regulación de la replicación viral (Figura 8).

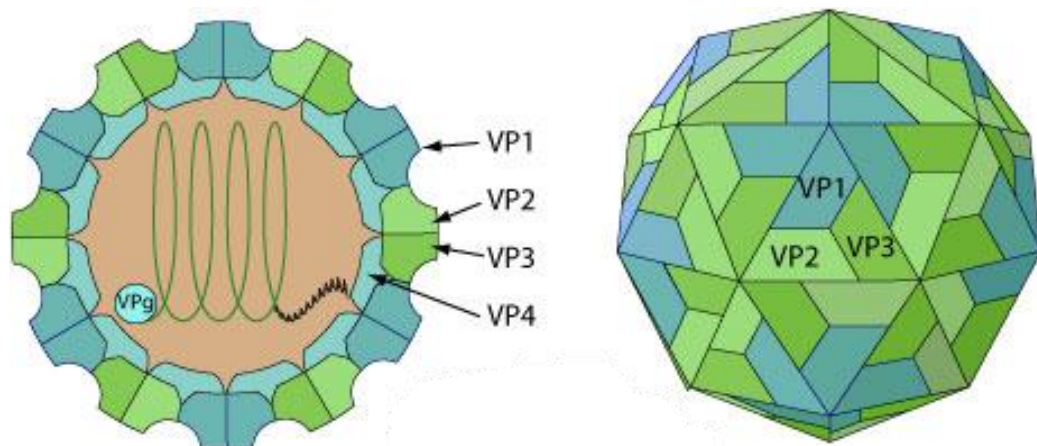


Figura 8. Diagrama esquemático de una partícula de enterovirus (Adaptado de ViralZone: <https://viralzone.expasy.org/>).

5.3. EPIDEMIOLOGÍA

Los EV humanos son agentes ubicuos que causan un amplio espectro de enfermedades en niños, jóvenes y adultos. La diseminación ocurre principalmente a través de la vía fecal oral aunque también se ha reportado en menor medida la transmisión respiratoria. La enfermedad por enterovirus en las poblaciones puede ser esporádica o epidémica y en general se identifica la co-circulación de varios tipos diferentes y sin un patrón particular (Pallansch et al., 2013).

En los climas templados las infecciones por enterovirus predominan en otoño y verano y en los climas tropicales todo el año. El hacinamiento y las condiciones de higiene insuficientes aumentan la transmisión fecal-oral de estos agentes. La transmisión a través del agua se presenta como una extensión de la vía fecal-oral y se ha identificado enterovirus en aguas superficiales y subterráneas en todo el mundo (De Giglio et al., 2017; Lizasoain et al., 2018). En los países industrializados, la transmisión de EV por agua potable es aparentemente poco común, pero es tema de preocupación en salud pública, debido a que las condiciones habituales bajo las cuales el agua potable es clorada pueden ser insuficientes para inactivar los EV. En el caso de las piscinas, el EV se puede detectar en estas aguas incluso después de la cloración en ausencia de coliformes fecales.

Las infecciones por enterovirus están asociadas con un amplio espectro de enfermedades que abarcan desde enfermedades febriles leves hasta miocarditis, meningoencefalitis, poliomiелitis, conjuntivitis hemorrágica, enfermedad de Bornholm, enfermedad de manos, pies y boca, diabetes mellitus y falla multiorgánica neonatal. Las infecciones crónicas están asociadas con afecciones como la polimiositis, la miocardiopatía dilatada y el síndrome de fatiga crónica. La mayoría de las infecciones, particularmente en los niños, son asintomáticas, pero aún resultan en la excreción de grandes cantidades de virus que pueden causar enfermedad clínica en contactos susceptibles.

La poliomiелitis, que años atrás causó altas tasas de morbi-mortalidad, está en vía de erradicación debido al programa de vacunación masiva mundial, pero la circulación ambiental de las cepas vacunales atenuadas que han revertido su neuroatenuación son motivo de preocupación mundial.

Como consecuencia de la alta excreción poblacional de enterovirus, se detectan en grandes cantidades en aguas crudas y suministros de aguas tratadas en todo el mundo. En vista de su presencia frecuente, la resistencia al tratamiento y los procesos de desinfección y la posibilidad metodológica para su detección por técnicas moleculares y celulares, son ampliamente utilizados en la evaluación, control y monitoreo de la calidad del agua (Pallansch et al., 2013).

6. ESCENARIO EPIDEMIOLÓGICO DE TRANSMISIÓN VIRAL POR AGUA Y ALIMENTOS CONTAMINADOS

El agua es el recurso natural máspreciado y esencial para la existencia humana en nuestro planeta. Sin embargo, las aguas superficiales y subterráneas se enfrentan a una gran variedad de factores estresantes que afectan no solo al ecosistema acuático sino también a la salud humana (Lipp et al., 2001). Se han realizado diversos estudios que involucran el análisis de la contaminación microbiana del agua en diferentes partes del mundo y en la mayoría es notable la contaminación por bacterias, protozoos y virus entéricos (particularmente los agentes etiológicos de gastroenteritis como norovirus, rotavirus y astrovirus y específicamente los agrupados en el género *Enterovirus*) (Allmann et al., 2013; Haack et al., 2013; Lee et al., 2014; Widmer et al., 2013). La alta frecuencia de detección de estos virus entéricos en matrices acuosas se debe a que comparten características tales como: son eliminados en grandes cantidades a través de las heces (10^5 a 10^{11} partículas virales por gramo de heces) de individuos infectados; son altamente estables en el medio ambiente porque carecen de envoltura lipídica, pudiendo persistir durante mucho tiempo en las aguas; y son de tamaño extremadamente pequeño, lo que facilita su transporte a través del agua subterránea con distancias de viaje de cientos a miles de metros desde las fuentes de contaminación (Yates et al., 1985). Existen numerosos factores físicos, químicos y biológicos que influyen en la persistencia de estos virus en el ambiente (Tabla 5).

Tabla 5. Factores que influyen en la persistencia^a de los virus entéricos en las aguas

Temperatura	Mayor persistencia a menores temperaturas
Luz	Los rayos UV del sol pueden dañar los ácidos nucleicos provocando formación de dímeros, que se traduce en pérdida de la infectividad
pH	La mayoría de los virus son estables a los valores de pH de las aguas
Sales	Algunos virus están protegidos contra la inactivación de calor por la presencia de ciertos cationes
Materia orgánica	La presencia de aguas residuales resulta en una mayor persistencia
Sedimentos, sólidos en suspensión	La asociación con los sólidos promueve la agregación de las partículas virales prolongando la persistencia
Interfaces aire-agua	A mayor hidrofobicidad mayor probabilidad de ser atraídos por la interface aire agua donde puede ocurrir la desnaturalización de las proteínas de la cápside
Factores biológicos	La microflora acuática suele ser antagonista a la persistencia viral

^a Persistencia: en referencia a mantener la estructura e infectividad viral.

A pesar de la concentración relativamente baja de virus en matrices acuosas, su presencia conlleva riesgos para la salud ya que dosis infecciosas muy bajas, de entre 10 y 100 viriones, son suficientes para generar una infección en una persona expuesta (La Rosa et al., 2012).

Estos virus entéricos son altamente específicos del huésped, lo que implica que su presencia en ambientes acuáticos es una prueba sólida del origen de especie de la contaminación fecal. En algunos casos, diferentes cepas de una especie viral, o incluso diferentes especies de un género viral, pueden infectar a humanos y animales. El grado de especificidad de huésped de los virus entéricos es tal que se utilizan como una herramienta valiosa para distinguir entre la contaminación fecal de origen humano y animal y para identificar la fuente de contaminación fecal.

Los virus entéricos pueden introducirse accidentalmente en diferentes pasos en la cadena de producción vegetal, siendo el riego de cultivos uno de los principales vehículos de contaminación (Crocì et al., 2008). Cabe señalar que los virus pueden ingresar a las aguas superficiales a través de la descarga de aguas residuales tratadas, insuficientemente tratadas o no tratadas. En este punto, la contaminación microbiológica cobra cada vez más relevancia, particularmente en nuestro país, debido a que en las

últimas décadas se ha incrementado la fragilidad de los sistemas hídricos, reflejado en las dificultades para la evacuación de aguas residuales, las que muchas veces son vertidas en matrices acuosas superficiales utilizadas para riego (Prez et al., 2015).

La situación planteada genera un nuevo escenario epidemiológico de transmisión viral en el que participan aguas contaminadas utilizadas para riego y alimentos asociados al riego, situación que finalmente impacta en la salud de la población expuesta. Este nuevo escenario de transmisión viral también genera un nuevo desafío referido a estimar la magnitud del riesgo de infección viral por consumo de alimentos y alerta a poner atención sobre los sistemas sanitarios y pautas de educación de la población (WHO, 2015).

Así, las verduras de hoja verde, que son componentes importantes de las dietas cotidianas, son uno de los principales alimentos involucrados en la transmisión de virus entéricos, ya que se consumen crudos y generalmente sin un procedimiento exhaustivo de lavado o descontaminación.

El Grupo de Referencia de Epidemiología de Enfermedades Transmitidas por Alimentos de la OMS proporcionó en 2015 las primeras estimaciones de incidencia, mortalidad y carga de enfermedades transmitidas por alimentos en términos de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (DALYs del inglés) que es una medida de la carga de la enfermedad expresado como el número de años perdidos debido a la enfermedad o muerte prematura. Se estimó que el riesgo global de las infecciones transmitidas por alimentos contaminados fue de 33 millones DALYs en 2010 del cual el 40% afecta a niños menores de 5 años. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos estima que cada año, aproximadamente, 48 millones de personas en los Estados Unidos se enferman, 128.000 son hospitalizadas y 3.000 mueren a causa de enfermedades transmitidas por alimentos (Bosch et al., 2016).

Estudios recientes en distintas regiones del mundo han demostrado la presencia de virus entéricos en productos alimenticios, ligados directamente a la transmisión viral a población expuesta, lo cual denota la importancia de abordar estudios de estos patógenos en los alimentos (Kokkinos et al., 2012).

6.1. NORMATIVAS VIGENTES

6.1.1. Regulaciones para el control de calidad de aguas

Los parámetros físicos y químicos, junto con indicadores bacterianos (bacterias coliformes), son utilizados actualmente para evaluar la calidad del agua y su uso previsible. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) clasifica a las aguas superficiales según su utilidad:

Clase A: destinadas al abastecimiento de agua potable sin necesidad de tratamiento previo, excepto filtración y desinfección. Aguas destinadas a la propagación y mantenimiento de especies, a fines agrícolas, incluyendo regadío de vegetales de consumo crudo y a usos recreacionales con contacto directo (ej. natación).

Clase B: destinadas a la preservación de la fauna y la flora; aprovechables para regadío de cultivos, deportes acuáticos sin contacto directo, aquellas utilizadas en algunos procesos industriales y pecuarios; y aguas para abastecimiento de agua potable después de un proceso de tratamiento.

Clase C: aguas utilizadas para transporte (navegación fluvial), y con limitada interacción con el medio ambiente.

Clase D: aguas superficiales a preservar en condiciones naturales, por su excepcional calidad o gran valor ecológico (ej. arrecifes de coral).

El documento establece para cada una de ellas valores máximos de parámetros físicos, químicos y bacteriológicos. En el caso particular de las aguas *Clase A*, que son las de interés para este trabajo de tesis, los límites para bacterias coliformes totales son de 1.000 NMP/100 mL y para coliformes fecales 400 NMP/100 mL (FAO, 2000). La presencia de virus entéricos no es considerada dentro de estas regulaciones a pesar de que ha sido bien documentada en diversos estudios, lo que plantea una preocupación relacionada con el riesgo para la salud pública de aquellas poblaciones expuestas a estas aguas (Gerba et al., 2018; Sano et al., 2016).

Al presente, solo EE. UU. incluyó a la familia *Caliciviridae* (género *Norovirus*), en la lista de contaminantes del agua que deben regularse, pero aún la normativa no ha sido puesta en práctica (EPA, 2016).

6.1.2. Regulaciones para el control de calidad de verduras

Varios factores, entre ellos el aumento de la población y la demanda continua de productos de temporada durante todo el año, conducen al comercio mundial de alimentos entre regiones que tienen diferentes marcos regulatorios para estándares de higiene.

La Unión Europea (UE) tiene los estándares de seguridad alimentaria más altos del mundo, intentando garantizar que los alimentos sean seguros para los consumidores. Mediante el Reglamento de Ejecución N° 925/2013 la UE dispone controles intensivos de las importaciones de determinados piensos y alimentos de origen no animal, el cual entre varios otros parámetros físicos, químicos, bacteriológicos y parasitológicos, establece la ausencia de norovirus y virus de la hepatitis A para por ejemplo frutos finos congelados que ingresen al continente. Esta medida fue basada tanto en la frecuencia como en los incidentes alimentarios notificados a través del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), una herramienta clave que garantiza el flujo de información, permitiendo una reacción rápida cuando se detectan riesgos para la salud pública en la cadena alimentaria. Creado en 1979, el RASFF permite que la información se comparta de manera eficiente entre sus miembros (autoridades nacionales de seguridad alimentaria de los Estados miembros de la UE, Noruega, Liechtenstein, Islandia y Suiza). La información intercambiada a través de este sistema ayuda a que los productos contaminados sean retirados del mercado. A modo de ejemplo, durante el año 2018, se reportaron en el RASFF 47 alertas debido a la presencia de virus (norovirus y/o virus de la hepatitis A) en matrices alimentarias como almejas, ostras, frambuesas y lechuga en Europa.

En nuestro país, la calidad de los productos alimenticios es regulada por la Ley 18.284 y su Decreto Reglamentario N° 2.126/71. Los estándares de calidad microbiológica de los alimentos están basados en criterios bacteriológicos, sin incluir a los virus. Esto se debe principalmente a la escasa información sobre la frecuencia de contaminación de alimentos con agentes virales como así también a las dificultades técnicas para la detección de virus en matrices alimenticias (Fleet et al., 2000).

En la Figura 9 se presenta a modo de resumen un esquema del escenario epidemiológico descrito con anterioridad.

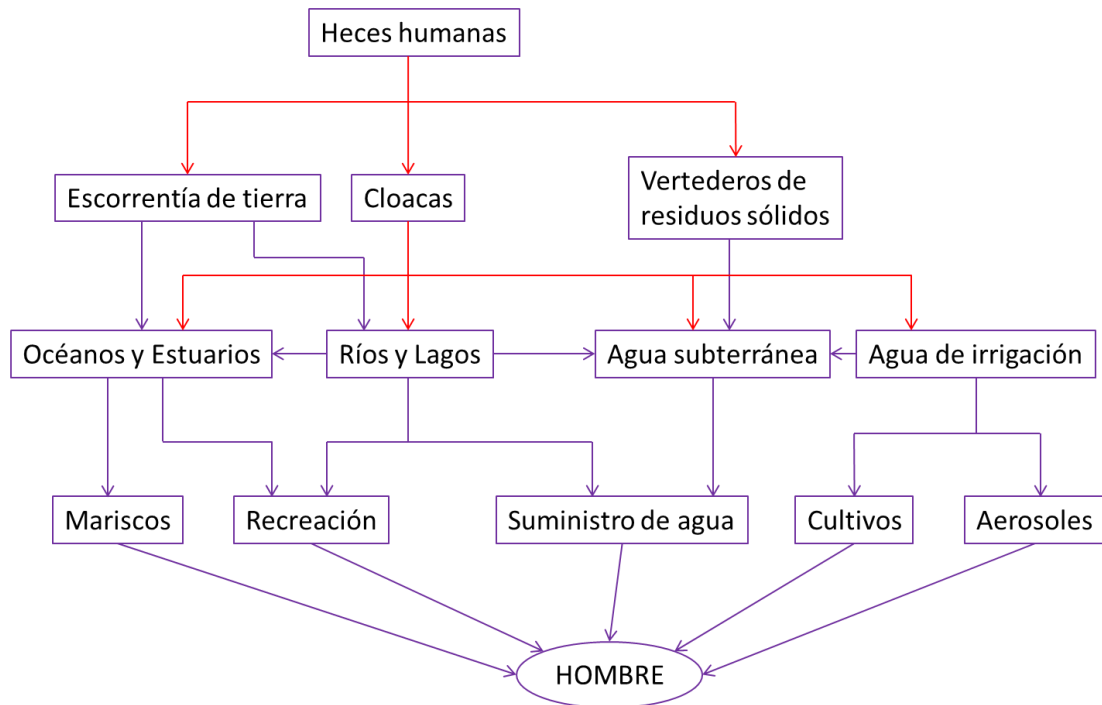


Figura 9. Diagrama de las potenciales vías de transmisión de virus entéricos en el ambiente. (Pallansch et al., 2013)

La prevención de enfermedades virales transmitidas por alimentos requiere en primera instancia de un diagnóstico de situación. Esto implica un estudio descriptivo que estime la frecuencia, caracterización molecular y cuantificación de virus en alimentos. Este estudio descriptivo debe estar ligado a un análisis de las posibles fuentes-causas que han llevado a la introducción de los virus entéricos en el alimento a fin de sugerir medidas de remediación o atenuación. Finalmente, el diagnóstico de situación debe incluir también un análisis de riesgo de transmisión viral alimentaria a la población expuesta por consumo de alimentos contaminados por virus. En el presente trabajo de tesis se abordó el estudio de la calidad virológica de aguas de riego y vegetales asociados en unidades productivas del cinturón verde de la Provincia de Córdoba y se estimó el impacto en salud humana por consumo de estas verduras. Los resultados obtenidos del desarrollo de esta tesis doctoral son los primeros disponibles en Argentina.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS



OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer la calidad virológica de verduras de hojas verdes, inferir posibles fuentes de contaminación y evaluar el riesgo de transmisión alimentaria de virus entéricos a población expuesta en Córdoba, Argentina.

Objetivos Particulares

- Disponer de técnicas de recuperación de virus presentes en verduras de hojas verdes y aguas empleadas para riego.

- Estimar la frecuencia de contaminación por virus entéricos (rotavirus, norovirus, astrovirus y enterovirus) y la correspondencia de cepas virales presentes en verduras de hojas verdes y sus aguas de irrigación.

- Evaluar el riesgo de transmisión alimentaria de rotavirus a población expuesta.

HIPÓTESIS

Hay una alta frecuencia de detección (>20%) y correspondencia genómica de virus entéricos en verduras de hojas verdes y aguas utilizadas para riego, por lo que las aguas de riego constituyen una fuente de contaminación viral de unidades productivas de hortalizas.

Existe una alta probabilidad de infección viral (>0,5) en consumidores de verduras crudas de hojas verdes.

CAPÍTULO II

Recuperación de virus presentes en verduras de hojas verdes y aguas empleadas para riego: optimización e implementación de técnicas de elución y concentración de virus



1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de detección de virus entéricos transmitidos por aguas y alimentos difieren ampliamente de las técnicas de detección de bacterias transmitidas por estas matrices, debido a diferencias estructurales, funcionales y biológicas entre virus y bacterias, que hacen que los virus no puedan cultivarse en los medios utilizados tradicionalmente para la detección de bacterias. En general, la estrategia para abordar el estudio de virus entéricos en aguas y alimentos consta de tres pasos: el primero para aguas es la concentración viral, en el caso de alimentos es la liberación de los virus de la matriz a analizar y posterior concentración de las partículas virales; el segundo, es la extracción del material genético (ARN para la mayoría de los virus transmitidos por estas matrices); y por último la detección molecular y/o celular (De Keuckelaere et al., 2013; Stals et al., 2012).

En este apartado, se pondrá principal atención al primer paso que involucra la elución y concentración de virus. A grandes rasgos, en esta etapa las partículas virales se separan de la matriz alimentaria y se concentran en un pequeño volumen debido a que en general se encuentran en bajo número en los alimentos. En el caso de las aguas, al estar los virus en suspensión en esta matriz, se lleva a cabo directamente una concentración viral. En esta etapa también se eliminan las sustancias inhibidoras que interfieren en el tercer y último paso que es la detección (Le Guyader et al., 2006; Nishida et al., 2007).

Una amplia variedad de procedimientos han sido descritos para la concentración de virus a partir de agua y alimentos. Las técnicas más comúnmente aplicadas se basan en procesos de adsorción-elución, ultrafiltración, ultracentrifugación o precipitación. La eficacia de recuperación viral depende de numerosas variables, como volumen de partida, turbidez y pH de la matriz en estudio y la carga viral presente. Los datos hoy disponibles señalan que es necesario profundizar en el estudio de las variables involucradas en los procesos de elución y concentración de virus para alcanzar la mayor eficacia de recuperación viral.

Como estrategia general, para realizar la elución viral en matrices vegetales se emplea un *buffer* alcalino con un pH entre 9 y 10,5 que permite la liberación de las

partículas virales de la superficie de la matriz alimentaria (Dubois et al., 2002). En combinación con este *buffer* alcalino se utiliza extracto de carne y glicina que reducen, durante la elución, la adsorción no específica del virus a la matriz alimentaria (Kim et al., 2008). Entre los métodos descritos para recuperar virus a partir de agua y alimentos, el método de precipitación con polientilenglicol (PEG) ofrece ventajas operativas y de costo respecto al uso de filtros con cargas o a la ultrafiltración o ultracentrifugación. Es de destacar que el método de precipitación con PEG es el recomendado por la OMS para la recuperación de enterovirus a partir de aguas y alimentos (WHO, 2003).

La precipitación de los virus, luego de la elución de los alimentos y en las matrices acuosas, aumenta la concentración del extracto viral para una detección molecular exitosa. El PEG junto con una alta concentración de NaCl permite la precipitación de estos virus a pH neutro y a altas concentraciones iónicas, minimizando la precipitación de otro material orgánico (Kim et al., 2008; Lewis and Metcalf, 1988).

Con el objetivo de disponer de una metodología eficiente y que permita su implementación sostenida en el tiempo, se abordó el ensayo de diferentes variables en el marco de protocolos de elución y concentración aceptados internacionalmente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Stock Viral

Se utilizó como marcador de eficacia de recuperación la vacuna de rotavirus Rotarix® (GlaxoSmithKline) compuesta por la cepa de rotavirus humano RIX4414 (virus vivos atenuados por pasajes en células Vero) con no menos de 10^6 CCID₅₀ (del inglés 50% *Cell Culture Infectious Dose*), adquirida en farmacias.

La concentración, en copias genómicas (cg) de rotavirus de esta cepa vacunal se determinó por biología molecular mediante q-RT-PCR (del inglés *quantitative Reverse Transcription of Polymerase Chain Reaction*) previo a su inoculación en las matrices alimenticias y acuosas. Para la prueba de eficacia de recuperación viral, se utilizaron 100 μ L de la vacuna, con una carga viral de 3×10^3 cg y para determinar el límite de detección se realizaron diluciones a partir del stock viral para obtener: 1×10^3 cg, 1×10^2 cg, 1×10^1 cg, 1×10^0 cg.

2.2. Muestras de vegetales y matriz acuosa

Como matriz alimentaria se utilizaron hojas de achicoria obtenidas de una verdulería en la ciudad de Córdoba. La verdura se almacenó en bolsas plásticas estériles a 4 °C y se utilizaron dentro de las 24 horas. Como matriz acuosa, se utilizó PBS estéril pH 7,2.

2.3. Descontaminación vegetal

Previo a realizar los ensayos, las hojas de verduras fueron descontaminadas para eliminar toda posible presencia de patógenos en la superficie de la hoja. Brevemente la achicoria se lavó con hipoclorito de sodio (a una concentración final de cloro de 2,5 g/L) durante 30 minutos con agitación continua, seguido de varios lavados con agua destilada para eliminar el cloro, un inhibidor de las técnicas de detección viral. La presencia de cloro residual se evaluó con ortotoluidina (0,2 ppm). Finalmente, las hojas se irradiaron con luz UV en su superficie por 40 min (20 min en cada cara) en un gabinete de seguridad biológica tipo II.

2.4. Prueba de la EFICACIA de concentración viral de rotavirus

2.4.1. Inoculación de muestras vegetales y de agua

Se distribuyeron 100 µL (conteniendo 3×10^3 cg) de suspensión vacunal sobre 40 gramos de achicoria en forma de pequeñas gotas. Luego, se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 h para permitir la adherencia de las partículas a la superficie de las hojas. La matriz acuosa, PBS, se contaminó artificialmente con el mismo volumen de suspensión vacunal. Se utilizaron muestras de verduras descontaminadas e inoculadas con PBS estéril y PBS no inoculado como controles negativos.

2.4.2. Procesamiento de muestras vegetales

Para ensayar la eficacia del método de elución y concentración viral propuesto por Guéveremont et al. (2006) a partir verduras se probaron cuatro variables:

- A) Tratamiento 1: achicoria sin picar y en elución por 1 hora;
- B) Tratamiento 2: achicoria sin picar y en elución por 2 horas;

C) Tratamiento 3: achicoria picada en un tamaño aproximado de 2,5 cm x 2,5 cm y en elución por 1 hora;

D) Tratamiento 4: achicoria picada en un tamaño aproximado de 2,5 cm x 2,5 cm y en elución por 2 horas.

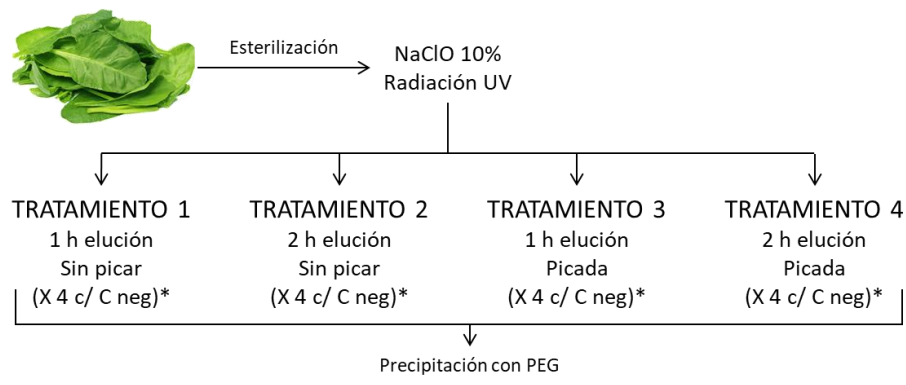
Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo por cuadruplicado con su respectivo control negativo (Figura 1). Brevemente, las muestras de verdura inoculadas (picada o sin picar) se colocaron en recipientes estériles con 1 L de caldo de elución para favorecer la liberación de los virus de la superficie de las hojas. El caldo de elución consta de 2,9% peso/volumen (p/v) de extracto de carne con 6% p/v de glicina a pH 9,5. La elución se realizó en agitación continua a temperatura ambiente por 1 h o 2 h. A continuación, los eluidos de virus se transfirieron a matraces estériles y se suplementaron con PEG 6000 al 10% p/v y NaCl al 2% p/v, y se incubaron en agitación continua durante al menos 2 horas a 4 °C. Luego se centrifugó la solución a 10.000 rpm durante 30 min a 4 °C para promover la precipitación viral. El precipitado viral se resuspendió en 10 mL de PBS estéril (pH 7,2), y finalmente se centrifugó a 8.000 rpm por 15 min quedando el sobrenadante como el concentrado viral (100 X) el cual se conservó a -80 °C hasta su posterior procesamiento de detección y cuantificación viral (Guevremont et al., 2006).

2.4.3. Procesamiento de la matriz acuosa

La concentración de virus en PBS se realizó siguiendo el método descrito anteriormente por Lewis y Metcalf (1988) y Greening et al. (2002), con modificaciones descritas por Huang et al. (2005). Un litro de PBS (inoculado con 3×10^3 cg de vacuna y sin inocular usado como control negativo) se clarificó por centrifugación a 4.000 rpm por 20 min. El sobrenadante obtenido fue conservado a 4 °C para su posterior uso y el precipitado fue resuspendido con una solución de extracto de carne 3% y NaNO₃ 2M (pH 5,5) en una proporción 3:1 respecto al peso del precipitado obtenido. Se eluyeron las muestras durante 1 h a 4 °C con agitación continua a 180 rpm. Luego del tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8.300 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con el primer sobrenadante obtenido en el paso de clarificación y los virus presentes en la mezcla se precipitaron mediante el agregado de PEG 10% (p/v) y NaCl 2% (p/v); las muestras se incubaron a 4 °C durante al menos 2 h con

agitación suave (120 rpm). Luego de la incubación, se centrifugó a 8.300 rpm durante 25 min a 4 °C y los precipitados obtenidos fueron re suspendidos en PBS pH 7,2 (1/100 volumen/volumen). Se ajustó a pH 8 y se eluyó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 8.300 rpm durante 20 min (Greening et al., 2002; Huang et al., 2005; Lewis and Metcalf, 1988). Los sobrenadantes resultantes (concentrados 100 X) se almacenaron a -80 °C.

A) Tratamientos ensayados en la evaluación de Eficacia de recuperación



B) Determinación del Límite de Detección

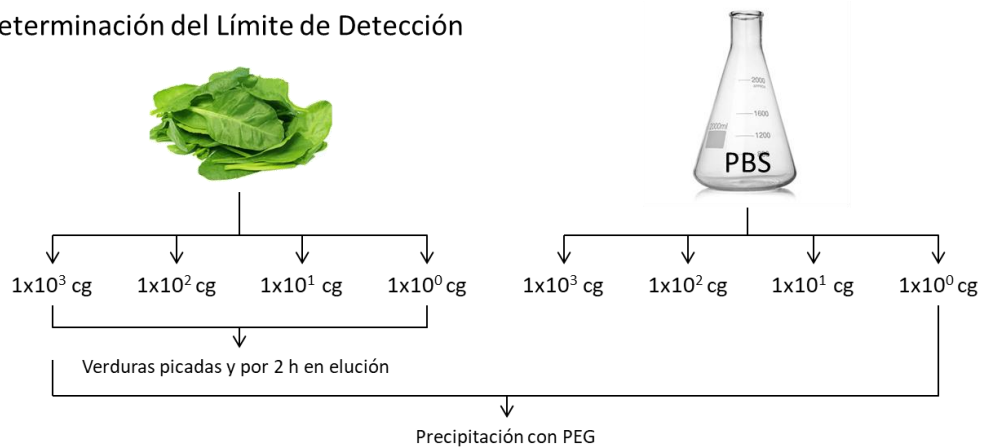


Figura 1: A) Tratamientos aplicados para evaluar la eficacia de la elución y concentración de virus a partir de verduras. *Cada tratamiento se analizó por cuadruplicado con sus respectivos controles negativos. **B)** Determinación del límite de detección en las dos matrices analizadas, cada dilución se analizó por duplicado.

2.5. Determinación del límite de detección (LD) de la técnica de elución y concentración

El límite de detección se refiere a la menor concentración de inóculo de vacuna que se puede detectar luego del procesamiento de la muestra, desde la concentración

hasta la extracción de ARN y la detección mediante RT-qPCR. En otras palabras es la menor concentración inicial a la que se puede detectar el virus en la muestra. Las diluciones analizadas se muestran en la Figura 1. En el caso del método de concentración vegetal, se realizó el tratamiento que mostró la mejor eficacia en la recuperación de RV.

2.6. Detección y cuantificación del genoma de rotavirus

2.6.1. Extracción de ácidos nucleicos

El ARN viral se extrajo a partir de 140 µL del concentrado viral mediante el kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen Inc., Hilden, Alemania). Se siguió el protocolo del fabricante y el ARN viral purificado se eluyó en 30 µL de *buffer* de elución.

2.6.2. RT-qPCR para cuantificación del genoma de rotavirus

Se emplearon 6 µL de ARN obtenido como molde para producir ADNc de una región altamente conservada de la proteína no estructural NSP3 de RV (Tabla 1) siguiendo el procedimiento descrito por Zeng et al. (2008). Brevemente el ARN viral se mezcló con el par de *primers* NSP3F y NSP3R (0,5 µM cada uno) resultando en un volumen final de 10 µL. La mezcla fue incubada durante 5 min a 95 °C y se enfrió en hielo durante 2-5 min. Luego se agregó a los tubos (conteniendo el ARN y los *primers*) 10 µL de la mezcla de reacción para la transcripción reversa, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 1 mM de cada dNTP, 6% DMSO, 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, California, USA), 2 mM DTT y 1 X *buffer* de la enzima. Se realizó la retrotranscripción durante 50 min a 37 °C y se inactivó la enzima durante 15 min a 70 °C.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la cuantificación de rotavirus (Zeng et al., 2008).

Primers y Sonda	Secuencia (5´-3´)	Nucleótidos	Tamaño
NSP3F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	963–988	26
Sonda NSP3	FAM-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB	995–1017	23
NSP3R	GGTCACATAACGCCCTATAGC	1028–1049	22

Las muestras se cuantificaron por duplicado mediante qPCR utilizando el equipo ABI 7500 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). La cuantificación se realizó según lo descrito por Fumian et al. (2010) utilizando los *primers* diseñados por Zeng et al. (2008). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L conteniendo: 2 X TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, California, USA), 0,4 μ M de cada *primer* (NSP3F y NSP3R), 0,2 μ M de la sonda TaqMan® NSP3 y 7,5 μ L de ADNc. La solución obtenida fue sometida al siguiente perfil de ciclado: incubación inicial a 50 °C, 2 min; desnaturalización a 95 °C, 10 min; 45 ciclos de *annealing* a 95 °C, 15 seg y extensión a 56 °C, 1min; y extensión final a 60 °C, 1 min. Para crear las curvas patrón se utilizaron diluciones seriadas (en un rango de 10^1 a 10^6 copias genómicas) de un clon plasmídico conteniendo un inserto del gen NSP3 de rotavirus (pTOPO Invitrogen CA, USA). Los datos de amplificación se recopilaron y analizaron utilizando el Software 7500 v2.0 (Applied Biosystems, CA, USA) (Fumian et al., 2010; Zeng et al., 2008).

Los resultados se consideraron positivos si la curva de amplificación sigmoidal cruzó el umbral antes de los 45 ciclos y los controles positivos y negativos dieron resultados esperados. La eficiencia del ensayo ($10^{(-1/\text{pendiente})}$) se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar generada al trazar el logaritmo del número de copias versus el valor del umbral de ciclo (Ct).

La sensibilidad de la técnica de RT-qPCR fue estimada en ensayos anteriores en 10 cg (Barril et al., 2015).

2.6.3. Evaluación del método de concentración de RV a partir de muestras de vegetales y agua inoculadas

La eficacia del método de concentración de virus en las diferentes matrices y tratamientos se calculó comparando el número de copias genómicas recuperadas de las muestras de verduras y aguas inoculadas respecto al número de copias genómicas presentes en el inóculo inicial (3×10^3 copias genómicas / 100 μ L).

Para estimar el LD, un ensayo se consideró positivo si las dos detecciones resultaron con Ct positivos en la detección viral por qPCR.

2.7. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y los desvíos estándar de cada tratamiento analizado y se utilizó la prueba de Kruskal Wallis no paramétrica para evaluar si existían diferencias significativas entre ellos (Tratamientos A - D). Los valores de *P* inferiores a 0,05 indicaron diferencias significativas para las variables medidas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2018).

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación de la eficacia del método de elución y concentración de RV en muestras de verduras y de concentración en muestras de PBS inoculadas

En la Tabla 2 se presentan los resultados de los cuatro tratamientos analizados en la recuperación de RV por precipitación con PEG a partir de las muestras de verduras y aguas inoculadas. Se observó una alta variabilidad de recuperación dentro de cada tratamiento para las réplicas, lo que se refleja en una amplia desviación estándar. Sólo se observaron diferencias estadísticas entre las eficiencias de los métodos de concentración de RV en la achicoria para el tratamiento A en comparación con los otros tres tratamientos ($P < 0,05$), revelando la eficiencia más baja. El tratamiento D mostró la mayor eficiencia, pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos B y C ($P > 0,05$). Las muestras descontaminadas analizadas arrojaron resultados negativos en todos los tratamientos.

Tabla 2. Resultados de recuperación del método de elución y concentración analizado en achicoria y PBS. El promedio y el desvío estándar (DS) se calcularon a partir de cuatro réplicas de las muestras.

Muestra	Tratamiento	Recuperación de RV*	
		Rango	Promedio ± DS
Achicoria	A) Achicoria sin picar + elución 1 h	13,3 - 21,6%	16,3 ± 3,8
	B) Achicoria sin picar + elución 2 h	14,7 - 79,9%	46,9 ± 27,1
	C) Achicoria picada + elución 1 h	14,7 - 63,5%	52,0 ± 26,6
	D) Achicoria picada + elución 2 h	27,6 - 84,6%	63,0 ± 26,4
PBS	Precipitación con PEG	10,4 - 18,0%	14,4 ± 3,8

* En cada tratamiento evaluado se inocularon 100 µL de vacuna anti-rotavirus conteniendo 3×10^3 copias genómicas.

3.2. Límite de detección

En la Tabla 3 se muestran las frecuencias de detección de RV a partir de los experimentos duplicados de achicoria y PBS contaminadas artificialmente con diluciones de RV. Los resultados obtenidos indican que es posible detectar una carga genómica inicial de 10 cg en la matriz alimentaria y de 100 cg en la matriz acuosa.

Tabla 3. Límite de detección de Rotarix® en achicorias y agua.

Muestra	Achicoria (40 g)				PBS (1 L)			
Cantidad inoculada en cg	10 ³	10 ²	10 ¹	1	10 ³	10 ²	10 ¹	1
N° muestras positivas/total	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	1/2	0/2

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Está ampliamente documentado que el agua y los alimentos pueden actuar como vehículos para la transmisión de virus entéricos a población expuesta (El-Senousy et al., 2013; Koopmans et al., 2008). Debido a esto, es imprescindible contar con técnicas eficaces de elución y concentración de virus entéricos a partir de matrices acuosas y alimentarias, para llegar a obtener los mejores resultados finales (Crocì et al., 2008; De Keuckelaere et al., 2013; Stals et al., 2012). En el desarrollo de esta tesis se evaluó la eficacia del método de elución y concentración de virus a partir de verduras ensayando diferentes variables y al eluido viral se le acopló el protocolo de concentración con PEG, previamente estandarizado en nuestro laboratorio (Mueller et al., 2009).

Para evaluar la performance de las técnicas de recuperación viral comúnmente se utilizan sustitutos de virus que sean lo más parecidos al virus blanco en cuanto a su comportamiento en la matriz a analizar (Crocì et al., 2008; Poma et al., 2013). En este trabajo no se optó por analizar el comportamiento de un virus sustituto, por el contrario se seleccionó como virus blanco de detección la cepa atenuada RIX4414 de rotavirus, para que los resultados a obtener reflejaran la performance de la técnica con un virus entérico. Fue necesario entonces, la completa esterilización de la matriz alimenticia (achicoria) ya

que este virus podría estar presente naturalmente en la matriz seleccionada (Barril et al., 2015; Mizukoshi et al., 2014; Rutjes et al., 2009). La descontaminación se realizó teniendo en cuenta las buenas prácticas de esterilización de alimentos propuestas por el Código Alimentario Argentino y además se agregó una última etapa de descontaminación por radiación ultravioleta en cabina de seguridad biológica para asegurar la completa eliminación de los posibles patógenos presentes en la superficie de las hojas. La efectividad de este procedimiento se observó en la ausencia de rotavirus (menos de 10 cg en 40 g) en achicorias inoculadas con PBS estéril utilizados como control de proceso.

Para la correcta elección del método a implementar en la recuperación de virus a partir de alimentos es importante tener en cuenta la composición de los alimentos que se van a analizar. En el caso de las verduras, que son alimentos a base de agua y carbohidratos, la mejor elección es la elución y concentración viral (Baert et al., 2008; Stals et al., 2012). Dentro de la elución, a su vez, hay una gran variabilidad con respecto a la elección del *buffer* y sus componentes, como por ejemplo el pH (ácido o alcalino) y las concentraciones de extracto de carne y glicina, entre otras (Coudray et al., 2013; Guevremont et al., 2006; Le Guyader et al., 2004). En función de las mejores técnicas y soluciones encontradas en la bibliografía y los materiales y equipamientos disponibles en el laboratorio para realizar la elución viral a partir de muestras vegetales, se decidió ensayar como variables, el aumento de la superficie de contacto de la matriz con el *buffer* y el tiempo en que las muestras permanecían en elución, dejando estable volumen de *buffer*, pH y concentración de extracto de carne y glicina, utilizando los que arrojaron mejores resultados según la bibliografía consultada (Stals et al., 2012). Como resultado de esto se obtuvo que a mayor superficie de contacto con el *buffer* (al estar las hojas de achicoria cortadas) y a mayor tiempo de elución, la recuperación de rotavirus fue mayor.

De acuerdo a la bibliografía disponible, las técnicas de concentración tanto para aguas como para el eluido viral de las verduras, presentan variedad de opciones metodológicas como por ejemplo ultracentrifugación, ultrafiltración, precipitación con PEG y filtración con membranas cargadas (Stals et al., 2012). Estas técnicas presentan diferentes rangos y porcentajes de recuperación viral a partir de un inóculo. Según lo reportado, la técnica más eficaz en aguas es la ultrafiltración con un rango de

recuperación entre 42,73 y 65,26% y continúa en eficacia la precipitación con PEG con un rango de recuperación entre 10,56 y 24,42% (Poma et al., 2013). En eluidos virales a partir de alimentos la filtración con membranas cargadas presenta rangos de detección entre 5,2 y 53,6% (Fumian et al., 2009); y la precipitación con PEG entre un 2,9 y 61,1% (Stals et al., 2012). Los porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación que se realizó en este trabajo son comparables con aquellos que se presentan en la bibliografía tanto para aguas (10,4 - 18,0 %) como para alimentos (13,3 - 84,6%) y en este último caso las variables analizadas permitieron aumentar los valores de recuperación respecto a los obtenidos por otros autores.

La dosis infecciosa de los virus entéricos es muy baja, por lo que una pequeña cantidad de partículas virales presentes en los alimentos es capaz de infectar a quienes los consuman. Resulta entonces necesario conocer el LD de la metodología para la detección de estos virus, para así poder evaluar con mayor precisión los potenciales riesgos para la salud de los consumidores de vegetales contaminados. Los resultados obtenidos en este análisis son semejantes a los obtenidos por otros autores en matrices comparables, mostrando que el método optimizado permite identificar muy bajas cargas virales iniciales en las matrices contaminadas (Coudray et al., 2013; Fumian et al., 2010; Stals et al., 2012).

En la actualidad es posible vincular la seguridad alimentaria con la salud pública mediante la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (Kundu et al., 2018; Owusu-Ansah et al., 2017). Para poder realizar este análisis uno de los requisitos es determinar la exposición a través de la cuantificación de los virus presentes en el vehículo de transmisión, en nuestro caso en las verduras de hoja. Como producto del trabajo desarrollado, se logró optimizar una técnica que arrojó valores aceptables de recuperación viral y de detección de carga genómica inicial en las matrices analizadas. Esto permite disponer de un ensayo estandarizado de detección de virus en matrices alimenticias, para la formulación de pautas que garanticen la calidad virológica de verduras de hojas verdes en escenarios ambientales específicos, para así reducir el riesgo de infecciones virales a población expuesta al consumo de estos vegetales.

CAPÍTULO III

Análisis de la calidad virológica de aguas de irrigación y verduras de hoja asociadas al riego en el cinturón verde de la Provincia de Córdoba, Argentina.



1. INTRODUCCIÓN

La persistencia prolongada en el ambiente es uno de los atributos biológicos de los virus productores de gastroenteritis, que explica la circulación sostenida en ambientes terrestres y acuáticos. La mayoría de las aguas residuales tratadas para bajar la concentración de materia orgánica y disminuir la carga bacteriana, así como las aguas residuales sin tratar, fluyen hacia los cuerpos de agua superficiales, los que a su vez entran en contacto con aguas subterráneas resultando finalmente todos estos cursos de agua potencialmente contaminados con virus y afectando sus posteriores usos. En Argentina, se ha notificado una alta incidencia de virus entéricos, como norovirus (NoV), rotavirus (RV), astrovirus humano (HAstV), virus de las hepatitis A (HAV) y E (HEV) y enterovirus humano (EV) en diferentes entornos de aguas superficiales, utilizadas en general con fines de recreación y/o captación de agua (Aguirre et al., 2019; Barril et al., 2015; Farias et al., 2019; Fernandez et al., 2012; Masachessi et al., 2017; Prez et al., 2015).

La ciudad de Córdoba obtiene los productos derivados de la horticultura del cinturón verde del área central de la Provincia de Córdoba. Un cinturón verde es una política de clasificación de suelos, utilizada en la planificación urbana, para conservar áreas de vegetación salvaje o terreno agrícola alrededor de núcleos urbanos. El cinturón verde local está conformado por pequeñas unidades productivas de 2 a 15 hectáreas, que se explotan de forma intensiva y se encuentran dentro o en la periferia del ejido urbano de las ciudades y cercano a cursos de agua (Figura 1) (AProduCo, 1995).

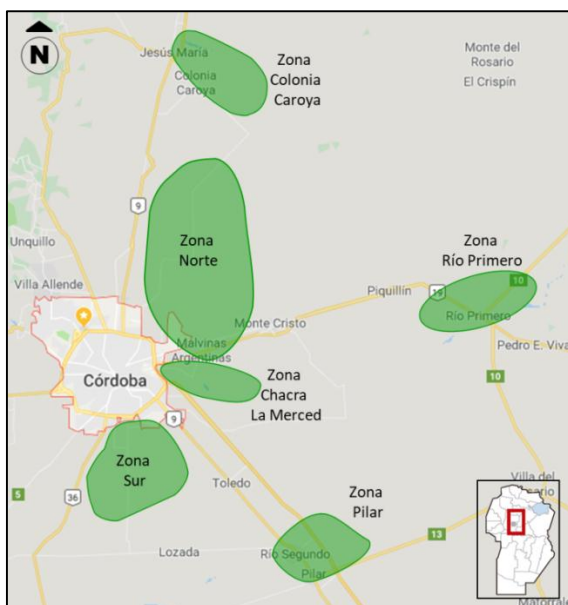


Figura 1. Parches de producción primaria en el cinturón verde del área central de la Provincia de Córdoba. Extraído y modificado de “Situación de contexto del área central bajo riego de la provincia de Córdoba” en La Voz del Interior.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la calidad virológica de verduras de hojas verdes y sus correspondientes aguas de irrigación en dos puntos del cinturón verde de la Provincia de Córdoba: producción urbana en la ciudad de Córdoba y producción rural en la ciudad de Colonia Caroya. Además se determinó la circulación poblacional de virus entéricos en la comunidad de Córdoba y su correlación con virus entéricos en aguas de irrigación y verduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SISTEMA DE PRODUCCIÓN URBANA: Chacra La Merced – Canal de irrigación Río Suquía

2.1.1. Descripción del escenario urbano

La ciudad de Córdoba, capital de la provincia, se ubica en la Región Central de Argentina y tiene aproximadamente 1.317.298 habitantes, con una densidad poblacional de 2.308 habitantes/km² (INDEC, 2010). El río Suquía atraviesa la ciudad de oeste a este con un caudal de agua de 10 m³/seg sujeto a fluctuaciones estacionales. En su recorrido por la ciudad, el río Suquía recibe la descarga de efluentes y aguas residuales industriales no tratados o mal tratados y luego de abandonar la ciudad, recibe las descargas de la planta de tratamiento de líquidos cloacales “Bajo Grande” (Figura 2). Este sistema de cloacas cubre el 61% de la población y en sus instalaciones no se procesan aguas residuales industriales. El procesamiento que las aguas reciben en la planta implica los siguientes pasos: filtración, sedimentación, percolado y desinfección con hipoclorito de sodio.

Luego de que el río Suquía atraviesa el anillo de circunvalación al este de la ciudad, se deriva de él un sistema de canales que se utilizan para irrigar las verduras de las fincas ubicadas en el área del cinturón verde llamado "Chacra La Merced". Uno de los principales canales de riego nace aguas abajo del puente San José del río Suquía, ubicado a 200 m río abajo de la planta de tratamiento de líquidos cloacales “Bajo Grande” (Figura 2). Las hortalizas cosechadas en esta área se comercializan en un mercado mayorista.

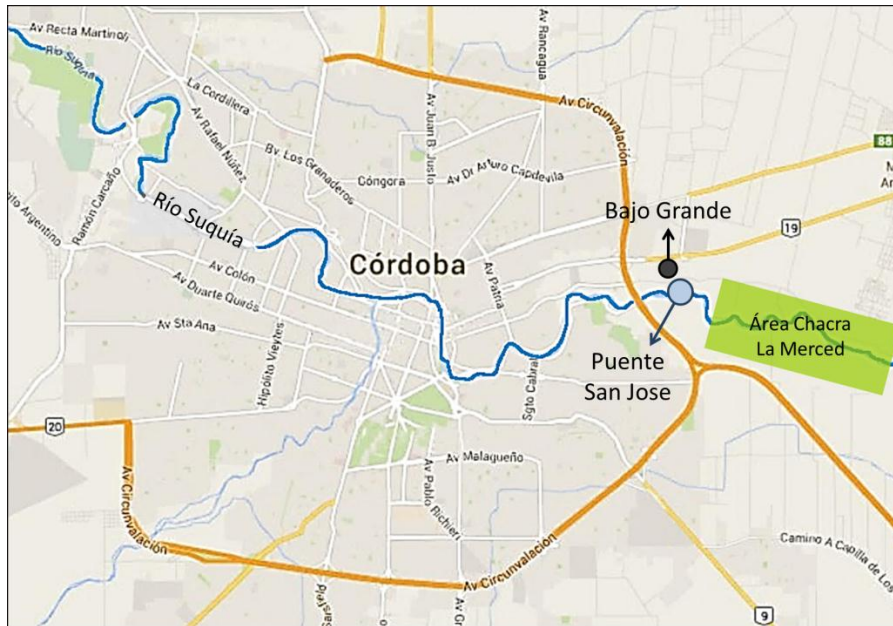


Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo en la Ciudad de Córdoba. Río Suquía remarcado en azul; círculo gris planta de tratamiento de residuos cloacales “Bajo Grande”; círculo celeste Puente San José; recuadro verde área de Chacra La Merced.

2.1.2. Recolección de las muestras

Durante los meses de julio a diciembre de 2012 se recolectaron un total de 37 muestras correspondientes a aguas y hortalizas de tres puntos diferentes: aguas residuales sin tratar de la planta de tratamientos residuales “Bajo Grande” (n = 6), agua del río Suquía en el puente San José (n = 12) y verduras de hojas verdes (n = 19) de una granja ubicada en el área de Chacra La Merced (Figura 2). Las muestras de aguas residuales sin tratar (1,5 L) se recolectaron mensualmente del canal de entrada a la planta municipal. Las aguas de riego (1,5 L) se recolectaron dos veces al mes en el puente San José. Las muestras de agua se tomaron en horas de la mañana en botellas plásticas estériles. El muestreo de vegetales se realizó en una unidad productiva de Chacra La Merced con características comunes a las unidades productivas de la zona, tres veces al mes se recolectaron cinco tipos diferentes de verduras que se consumen crudas: espinaca (*Spinacia oleracea*), lechuga (*Lactuca sativa*), rúcula (*Eruca sativa*), achicoria (*Cichorium intybus*) y acelga (*Beta vulgaris*). Estas verduras (aproximadamente 700 g cada una) fueron adquiridas de acuerdo a la disponibilidad de vegetales en el momento del muestreo. Todas las muestras de aguas residuales, agua de riego y vegetales se

mantuvieron en recipientes individuales estériles a 4-8 °C hasta su llegada al laboratorio, donde se procesaron dentro de las 24 h posteriores a la recolección.

Previamente, en el río Suquía se determinaron, en el área donde se abren los canales de irrigación, cargas bacterianas $> 4,6 \times 10^5$ NMP/100 mL para coliformes totales y $> 1,5 \times 10^5$ NMP/100 mL para coliformes fecales (Prez et al., 2015). Por este motivo y al no modificarse las condiciones sanitarias y ambientales no se realizó un nuevo muestreo.

2.2. SISTEMA DE PRODUCCIÓN RURAL: Colonia Caroya, verduras y canales de riego

2.2.1. Descripción del escenario rural

La ciudad de Colonia Caroya (Departamento Colón, Provincia de Córdoba) se localiza en el centro-norte de la provincia de Córdoba y se ubica a 50 km al norte de la ciudad de Córdoba, cuenta con 20.821 habitantes y una densidad poblacional de 298,7 habitantes/km² (INDEC, 2010). En su trazado urbano Colonia Caroya presenta una distribución poblacional a lo largo de la avenida principal, otorgándole una fuerte estructura lineal rodeada en su extensión por una zona rural de chacras donde se llevan a cabo las actividades de producción primaria como cría de animales, cultivos de soja, maíz, trigo, alfalfa, frutas y verduras (Figura 3). En esta localidad no hay sistema de red cloacal, lo que impidió obtener un muestreo para el estudio de circulación de virus en la comunidad.

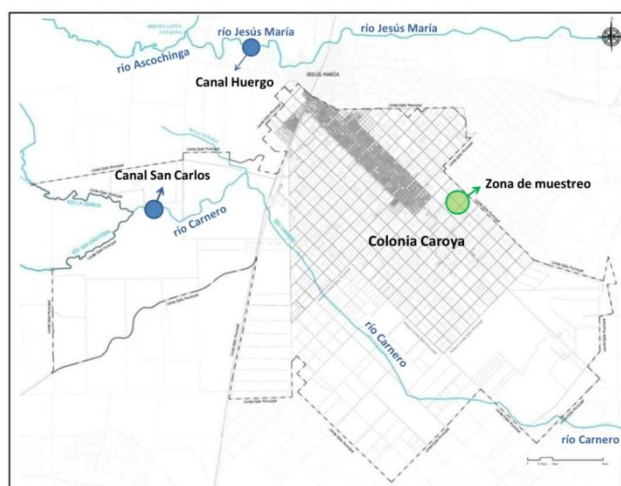


Figura 3. Ciudad de Colonia Caroya con los ríos Carnero y Jesús María remarcados en celeste. Los puntos indican el nacimiento de los canales Huergo y San Carlos que dan origen al sistema de irrigación por acequias de la localidad.

Colonia Caroya es uno de los oasis de riego de la Provincia debido a que toma el agua de dos cuencas: el río Jesús María a través del canal Huergo y el río Carnero por el canal San Carlos. Ambos canales se abastecen de napas subterráneas y proveen de agua a la ciudad, tanto para riego como para consumo humano. Si bien los primeros tramos de ambos canales están entubados, luego al ramificarse en dirección norte y sur, transcurren a cielo abierto por acequias, atravesando barrios marginales hasta las unidades productoras. El canal Huergo se utiliza para la irrigación de las quintas de la zona norte y el canal San Carlos para las quintas de la zona sur (Figura 3). La disponibilidad de uso del agua para cada una de las unidades productoras se reparte en turnos de agua y en general estos turnos ocurren cada quince días.

2.2.2. Recolección de las muestras

Durante el período de julio de 2014 a junio de 2015 se recolectaron un total de 125 muestras en la ciudad de Colonia Caroya correspondientes a aguas de irrigación (24) y verduras de hoja (101). En horas de la mañana y cada quince días se tomaron muestras de aguas (2 L) en botellas estériles, de la compuerta de entrada del canal de agua a la chacra. Semanalmente y de acuerdo a la disponibilidad de vegetales en el momento del muestreo, se recolectaron dos muestras de verduras de aproximadamente 700 g cada una (lechugas de varios tipos n=76 y achicorias n=25) las cuales se colocaron en bolsas estériles. Todas las muestras de aguas y vegetales se mantuvieron en recipientes individuales a 4-8 °C hasta su llegada al laboratorio, donde se procesaron dentro de las 24 h posteriores a la recolección.

2.3. Variables bacteriológicas

Alícuotas de 0,5 L de cada muestra de acequia que irrigan la unidad productora se derivaron al laboratorio de Bioquímica especializada 'Micro Bio Lab' de la localidad de Colonia Caroya para realizar la determinación de coliformes totales y fecales mediante el método del número más probable (NMP).

2.4. Concentración de virus en muestras de agua

La concentración de virus en las muestras de aguas se realizó utilizando el método de precipitación con PEG descrito en el apartado “2.4.3. *Procesamiento de la matriz acuosa*” del Capítulo II.

2.5. Elución y concentración de virus en verduras

La elución viral en vegetales se realizó aplicando el tratamiento D, método que presentó mayor performance y que fue descrito en el Capítulo II apartado “2.4.2. *Procesamiento de muestras vegetales*”. Brevemente, cada muestra de verdura se picó en trozos de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm y se colocó en un recipiente estéril, al cual se le añadió 1,5 L de caldo de elución compuesto por extracto de carne al 2,9% p/v y glicina al 6% p/v a pH 9,5. Se colocó el recipiente en incubación suave (80 rpm) por 2 h a temperatura ambiente. Luego se recuperó el caldo y se añadió una solución de PEG 6000 al 10% (p/v) con NaCl al 2% (p/v) y se llevó a agitación a 4 °C durante toda la noche. Finalmente se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sedimento se suspendió en 15 mL de PBS estéril. El concentrado viral se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento (Guevremont et al., 2006).

2.6. Detección de enterovirus infectivo (iEV)

La infectividad de enterovirus se evaluó mediante la inoculación de los concentrados virales en la línea celular CaCo-2. Previo a la inoculación, los concentrados virales se trataron con cloroformo en proporción 1:1 y se les incorporó antibióticos y antimicóticos (penicilina 10.000 U/mL; estreptomycinina 2,5% y fungizona 250 µg/mL). Luego de este tratamiento, los concentrados de aguas y verduras se analizaron por duplicado siguiendo procedimientos operativos estándares (WHO, 2004). Después de la inoculación, las células se incubaron a 36 °C durante 5 a 7 días en atmósfera de CO₂ al 5%. El efecto citopático se examinó diariamente con un microscopio invertido. La presencia de iEV fue confirmada por un ensayo de inmunofluorescencia directa. La mezcla de anticuerpos utilizada para la detección de EV humano consistió en monoclonales anti-

coxsackievirus tipo A9, anti-coxsackievirus tipo B (B1, B2, B3, B4, B5 y B6), anti-echovirus (serotipos 4, 6, 9, 11, 30 y 34); anti-poliovirus (serotipos 1, 2 y 3) y anti-enterovirus (serotipos 60, 71 y Cox A16) (Chemicon International Temecula, CA, USA).

El límite de detección de enterovirus infeccioso por amplificación en cultivo celular acoplado a un ensayo de inmunofluorescencia directa se determinó previamente en 500 CCID₅₀ (del inglés *Cell Culture Infectious Dose 50%*).

2.7. Detección y caracterización de genomas de virus

2.7.1. Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc

Se utilizaron 140 µL del concentrado final (de aguas y verduras) para extraer el ARN viral mediante el kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen Inc., Hilden, Alemania). Se siguió el protocolo del fabricante y el ARN viral purificado se eluyó en 30 µL de *buffer* de elución.

Se incubaron 18 µL de ARN durante 5 min a 95 °C y se enfrió en hielo durante 2-5 min para producir ADNc. Luego se agregó a los tubos (conteniendo el ARN desnaturalizado) 12 µL de la mezcla de reacción para la transcripción reversa, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 0,25 µg/µL de *random primers*, 1 mM de cada dNTP, 6% DMSO, 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, CA, USA), 2 mM DTT y 1 X *buffer* de la enzima. Se realizó la retrotranscripción durante 50 min a 37 °C y se inactivó la enzima durante 15 min a 70 °C.

2.7.2. Amplificación y caracterización de genomas virales

2.7.2.1. Norovirus

Este ensayo se realizó utilizando los *primers* y las condiciones de ciclado descritas por Kitajima et al. 2010 (Tabla 1). La detección se realizó mediante una *heminested* PCR dirigida a la región del gen de la cápside viral. En la primera ronda, dos pares de *primers* COG1+ y G1SK- y COG2+ y G2SK- amplificaron una región específica para los genogrupos

G1 y GII, dando como resultado fragmentos de 380 y 398 pb respectivamente. Luego, en dos segundas rondas, se generaron amplicones de 329 pb para G1 (*primers* G1SK+ y G1SK-) y 343 pb para GII (*primers* G2SK+ y G2SK-) (Kitajima et al., 2010).

Se utilizó como control positivo materia fecal confirmada NoV positiva por secuenciamiento génico (datos no mostrados).

2.7.2.1.1. Secuenciación y análisis filogenético de norovirus

Las muestras que resultaron positivas para alguno de los genogrupos de NoV se enviaron a purificar y secuenciar con el mismo par de *primers* de la *heminested* PCR, en el laboratorio de servicios Macrogen de Corea (www.macrogen.com). Cada producto de amplificación fue secuenciado en ambos sentidos (5' y 3').

La edición, alineación y comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó utilizando el programa MEGA-X (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versión 10.1. Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las secuencias de cepas patrones publicadas en el *GenBank*, utilizando el programa BLAST. Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias con el programa Clustal W. Las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas fueron calculadas, aplicando como modelo de sustitución nucleotídica el método Kimura-2-parámetros. La significancia estadística de las filogenias inferidas se estimó usando el método *Neighbor-Joining* con un bootstrap de 1000 pseudorrepeticiones.

2.7.2.2. Rotavirus

La amplificación de la región de la proteína VP7 se realizó en una primera PCR con el par de *primers* Beg9 y End9 descritos por Gouvea et al. 1990, el tamaño esperado del amplicón es un fragmento de 1.062 pb. Para la amplificación de secuencias de los genotipos G de mayor prevalencia a nivel mundial se aplicó *heminested multiplex* PCR con End9 y *primers* específicos de genotipo viral. Los *primers* utilizados en la ronda *heminested* fueron aBT1 para determinar G1; aCT2 para determinar G2; aET3 para determinar G3; aDT4 para determinar G4; aAT8 para determinar G8 y aFT9 para determinar G9 (Tabla 1). Los tamaños de los amplicones de reacción que se esperan

obtener son los siguientes: G1, 749 pb; G2, 652 pb; G3, 374 pb; G4, 583 pb; G8, 885 pb y G9, 306 pb.(Gouvea et al., 1990).

La amplificación de la región de la proteína VP4 se realizó en una primera PCR con el par de *primers* Con2 y Con3 descritos por Gentsch et al. 1992, el tamaño esperado es un fragmento de 876 pb. Los productos de la primera reacción de PCR fueron sometidos a una segunda ronda de amplificación con el *primer* genérico Con3 y una mezcla de *primers* internos específicos para secuencias de los genotipos P humanos: 1T-1 y 1T-1D para determinar P[8]; 2T-1 para determinar P[4]; 3T-1 para determinar P[6]; 4T-1 para determinar P[9] y 5T-1 para determinar P[10]. Los tamaños de los productos de reacción esperados son los siguientes: P[4], 483 pb; P[6], 267; P[8], 345 pb; P[9], 391 pb; y P[10], 583 pb (Gentsch et al., 1992; Iturriza-Gomara et al., 2000).

Se utilizó como control positivo la cepa vacunal de rotavirus RIX4414.

2.7.2.3. Astrovirus humano

La detección molecular se realizó mediante una *nested* PCR dirigida a la región C del segundo marco de lectura abierto (ORF2). La primera ronda de PCR se realizó con los *primers* PreCap1 y 12G descritos por Sakamoto et al. 2000., el tamaño esperado es un amplicón de 2.411 pb. Para la amplificación de secuencias de los genotipos de mayor prevalencia de astrovirus humanos, los productos de la primer PCR se sometieron a una segunda ronda de amplificación con el *primer* End y una mezcla de *primers* internos específicos de genotipo HAstV-1 a HAstV-8 (Tabla 1). Los tamaños de los productos de reacción esperados son: HAstV-1, 212 pb; HAstV-2, 158 pb; HAstV-3, 119 pb; HAstV-4, 258 pb; HAstV-5, 388 pb; HAstV-6, 427 pb; HAstV-7, 548pb y HAstV-8, 599 pb (Sakamoto et al., 2000).

Se utilizó como control positivo materia fecal confirmada HAstV positiva por secuenciamiento génico (datos no mostrados).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de norovirus, rotavirus y astrovirus humanos (Gentsch et al., 1992; Gouvea et al., 1990; Iturriza-Gomara et al., 2000; Kitajima et al., 2010; Sakamoto et al., 2000).

Virus	Región genómica	Primer		
		Nombre y (Polaridad)	Secuencia 5'-3'	Posición
NoV	Región N/S de la cápside	COG1 (+)	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5310
		G1SK (-)	CCAACCCARCCATTRTACA	5653-5671
		G1SK (+)	CTGCCCGAATTYGTAATGA	5342-5362
		COG2 (+)	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003-5028
		G2SK (-)	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	5379-5401
		G2SK (+)	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5058-5076
		RV	Gen VP7	Beg9 (+)
End9 (-)	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG			1062-1036
aBT1 (+)	CAAGTACTCAATCAATGATGG			315-335
aCT2 (+)	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG			411-435
aET3 (+)	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG			689-709
aDT4 (+)	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG			480-498
aAT8 (+)	GTCACACCATTGTAAATTCG			178-198
aFT9 (+)	CTAGATGTAECTACAECTAC			757-776
Gen VP4	Con3 (+)		TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32
	Con2 (-)		ATTCGGACCATTTATAACC	868-887
	1T-1 (-)		TCTACTGGATAACGTGC	339-356
	2T-1 (-)		CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494
	3T-1 (-)		TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278
	4T-1 (-)		TGAGACATGCAATTGGAC	385-402
	5T-1 (-)		ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594
1T-1D (-)	TCTACTGGYTTYACNTG	340-356		
HAstV	ORF2	PreCap1 (+)	GGACTGCAAAGCAGCTTCCTG	62-82
		12G (-)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC	2454-2473
		HAstV-1 (+)	AACCAAGGAATGACAATGAC	2166-2185
		HAstV-2 (+)	ACCTGCGCTGAGAACTG	2247-2264
		HAstV-3 (+)	CTGCTTGCATCTGGTCTTTCA	2283-2303
		HAstV-4 (+)	TGATGATGAAGACTCTAATAC	2071-2091
		HAstV-5 (+)	TAGTAACTTATGATAGCC	2014-2031
		HAstV-6 (+)	TGGCCACCCTTGTCCTCAGA	1951-1971
		HAstV-7 (+)	CTAGACAACAACAACCCG	1842-1859
		HAstV-8 (+)	GGTAAGTGGTACCTGCTAACTAG	1753-1775
End (-)	TCCTACTCGGCGTGGCCGC	2377-2359		

2.7.3. Detección del genoma viral

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% seguido de tinción con sales de plata, para lograr una alta resolución de los productos obtenidos (Herring et al., 1982; Laemmli, 1970).

2.8. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis no paramétrica para evaluar si existían diferencias significativas entre los genogrupos / genotipos detectados en las matrices analizadas. Los valores de *P* inferiores a 0,05 indicaron diferencias significativas para las variables medidas, los análisis estadísticos se realizaron con InfoStat (Di Rienzo et al., 2018).

3. RESULTADOS

3.1. Cinturón Verde: Chacra la Merced – Canal de irrigación Río Suquía

3.1.1. Detección de virus entéricos

Al menos uno de los grupos virales estudiados se detectó en todas las muestras de aguas residuales, agua de riego y vegetales de hojas verdes. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Se detectó genoma de NoV y/o RV y/o HAstV en el 100% de las muestras de aguas cloacales y aguas de irrigación y iEV se detectó de manera intermitente y en frecuencia significativamente menor ($\leq 50\%$). En verduras, se detectó genoma de NoV y/o RV y/o HAstV en el 73,6% (14/19) y iEV en el 79% (15/19) de las muestras estudiadas.

Tabla 2. Detección de virus entéricos en muestras de cloacas, aguas de riego y cultivos de hojas verdes.

Muestras (n)	Virus detectados, n (%)			
	NoV	RV	HAstV	iEV
Cloacas (6)	6 (100)	6 (100)	5 (83)	3 (50)
Aguas de Irrigación (12)	8 (67)	9 (75)	9 (75)	4 (33)
Verduras (19)	11 (58)	1 (5)	6 (32)	15 (79)
Lechuga 1	+	-	-	+
Lechuga 2	-	-	-	+
Lechuga 3	-	-	+	+
Lechuga 4	+	-	+	+
Lechuga 5	-	-	-	+
Lechuga 6	-	-	+	-
Lechuga 7	+	+	-	+
Espinaca 1	-	-	-	+
Espinaca 2	+	-	-	-
Espinaca 3	-	-	+	+
Achicoria 1	-	-	-	+
Achicoria 2	+	-	+	+
Rúcula 1	+	-	-	-
Rúcula 2	+	-	-	+
Acelga 1	+	-	+	+
Acelga 2	+	-	-	-
Acelga 3	-	-	-	+
Acelga 4	+	-	-	+
Acelga 5	+	-	-	+

+: muestra positiva; -: muestra negativa

La detección temporal de virus entéricos en las aguas de río utilizadas para el riego y en los vegetales se muestra en la Figura 4. NoV y HAstV se detectaron desde julio a diciembre de 2012 en al menos una muestra de agua de riego analizada por mes, excepto en noviembre; y RV al menos en una muestra de agua de riego analizada por mes, pero no en septiembre. iEV se identificó en una de las dos muestras de agua de riego

recolectadas en julio-septiembre y diciembre y no se detectó en octubre y noviembre. En los vegetales, NoV y iEV se detectaron durante todo el período estudiado en al menos una muestra analizada por mes. HAstV se detectó en verduras en el período agosto-diciembre y RV sólo se detectó en una muestra de lechuga recolectada en noviembre.

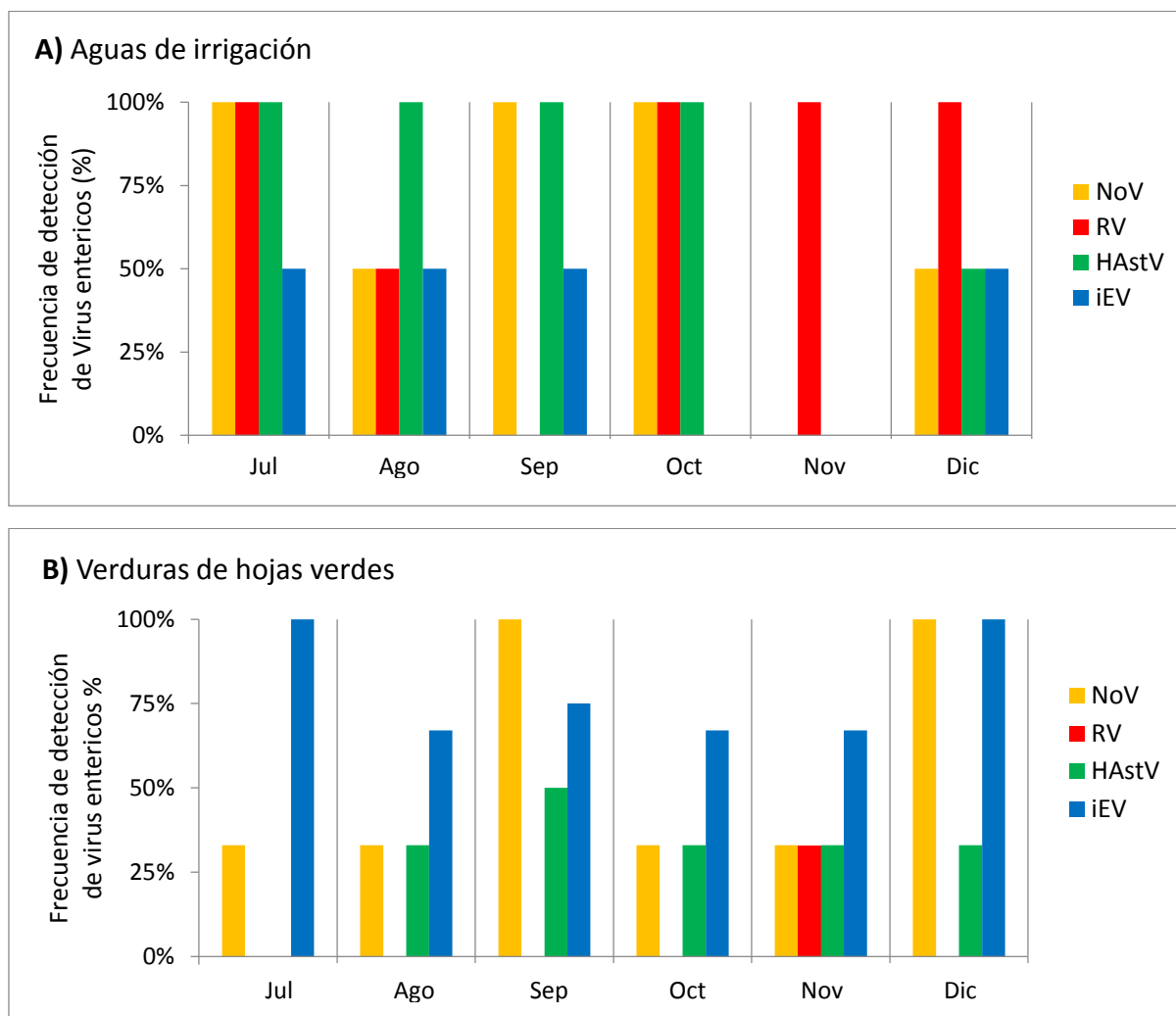


Figura 4. Frecuencia de detección mensual de virus entéricos en **A)** aguas de irrigación del río Suquía y **B)** verduras de hojas verdes recolectadas en Chacra La Merced.

3.1.2. Caracterización molecular

Se detectaron múltiples genotipos y/o genogrupos virales en las muestras de aguas cloacales, que representan las variantes virales que se encuentran en circulación en la comunidad de Córdoba capital. Además, en la mayoría de las muestras de agua de irrigación y en algunas muestras de verduras se identificaron múltiples genotipos y/o genogrupos en la misma muestra. La caracterización molecular de los virus detectados se muestra en la Figura 5.

NoV GI fue el genogrupo más frecuentemente identificado en las aguas residuales y en las verduras, mientras que el GII fue el más detectado en las aguas de riego ($P < 0,05$).

El gen VP7 de RV se caracterizó en todas las muestras positivas para rotavirus. Se observó un patrón similar de distribución de G tipos de rotavirus en aguas residuales y aguas de riego ($P < 0,05$). La única muestra de verdura (lechuga) que fue positiva para RV, resultó G3, siendo este G tipo uno de los más prevalentes en aguas residuales y agua de riego. El gen de la proteína VP4 no se pudo caracterizar en las verduras. En las aguas residuales el P-tipo dominante fue P[8] (43 %) seguido de P[6] (21 %); P[4] y P[10] se detectaron en el 14 % de las muestras y P[9] en el 7%. En las aguas de irrigación solo se pudo caracterizar el P-tipo en tres muestras, siendo P[8] el más frecuente (60 %) y P[4] y P[6] en una frecuencia del 20 % cada uno.

De las seis muestras HAstV positivas en verduras, se caracterizaron cinco genotipos siendo G5 y G7 los tipos dominantes detectados en aguas residuales, aguas de riego y verduras de hoja ($P < 0,05$ respecto al resto de G tipos identificados). También se detectaron otros genotipos de HAstV en las diferentes matrices (G2, G3, G6 y G8).

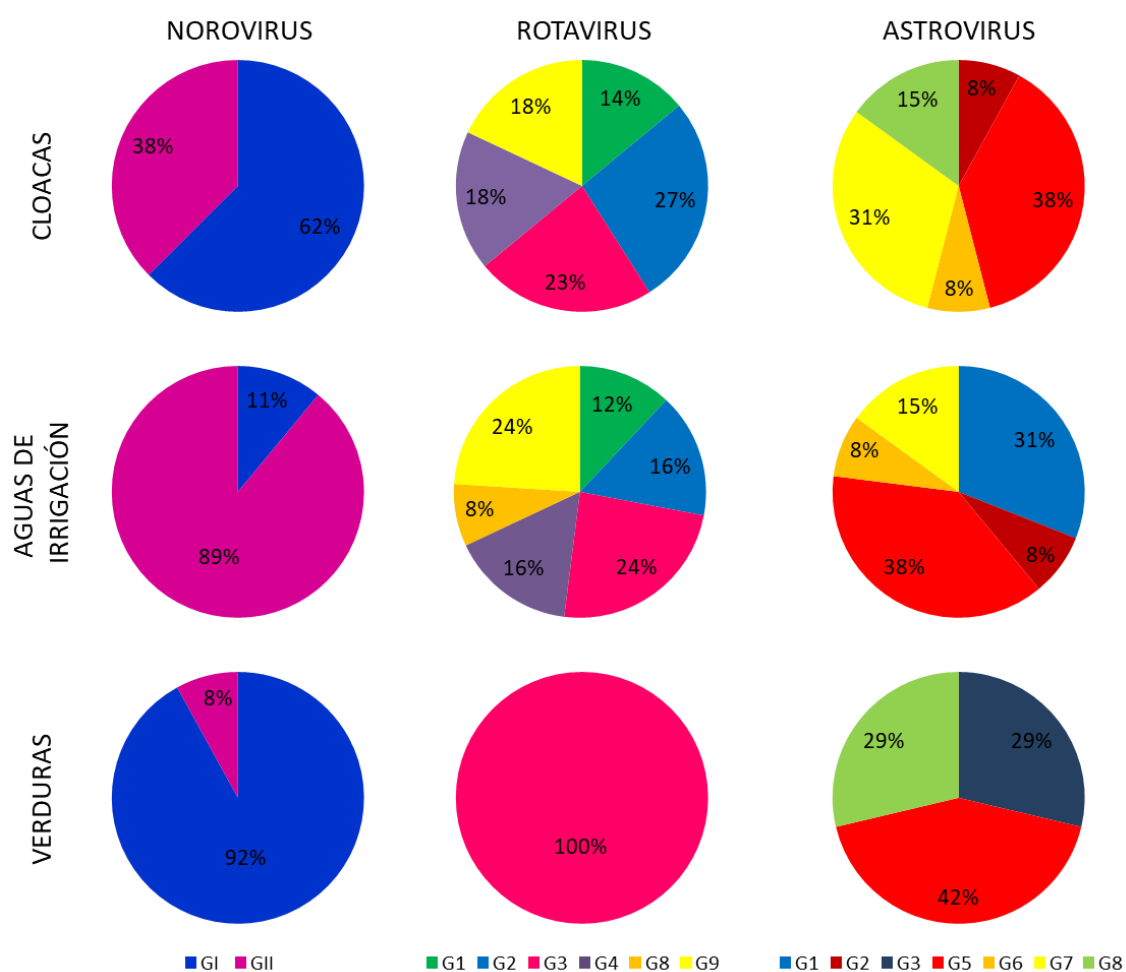


Figura 5. Distribución proporcional de cepas virales detectadas en aguas residuales, aguas de riego y verduras de hojas verdes en Chacra La Merced.

3.2. Cinturón Verde: Colonia Caroya – Canales de irrigación

3.2.1. Niveles de bacterias indicadoras en las aguas de irrigación

El total de las muestras de la acequia fueron positivas para coliformes totales y fecales. Los niveles medios fueron $1,3 \times 10^4$ NMP/100 mL (rango $4,2 \times 10^2$ - $7,2 \times 10^4$) para coliformes totales y $4,4 \times 10^3$ NMP/100 mL (rango 6×10^1 - $1,9 \times 10^4$) para coliformes fecales (Figura 6).

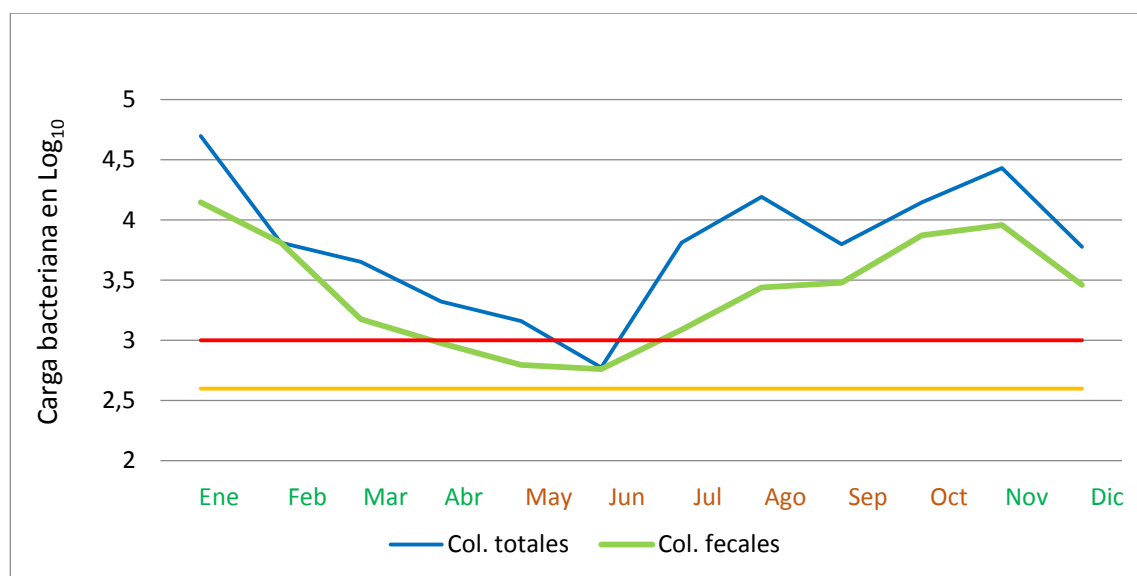


Figura 6. Cargas bacterianas (representadas en Log₁₀ de NMP/100 mL) detectadas en las muestras de acequias. Límites guía bacterianos para aguas de irrigación: coliformes fecales ≤400 NMP/100 mL (log₁₀ 2,6 en línea amarilla) y coliformes totales ≤1000 NMP/100 mL (log₁₀ 3 en línea roja). Meses en verde corresponden a la estación húmeda, meses en naranja corresponden a la estación seca.

Sólo en el mes de junio se detectó carga bacteriana inferior al límite establecido por la FAO para coliformes totales; sin embargo la carga de coliformes fecales superó el nivel guía establecido por la normativa vigente para calidad microbiológica de agua de riego. La carga de bacterias indicadoras de contaminación fecal en las aguas de riego en la estación seca (ES), que se extendió de julio a octubre de 2014 y el período de mayo a junio de 2015, fue: coliformes totales $7,4 \times 10^3$ NMP/100 mL (rango $4,2 \times 10^2$ - $3,1 \times 10^4$) y coliformes fecales $2,5 \times 10^3$ NMP/100 mL (rango 6×10^1 - $8,6 \times 10^3$). Los niveles de carga bacteriana fueron similares en la estación húmeda (EH) respecto a la ES ($P > 0,05$), que incluyó desde noviembre de 2014 hasta abril de 2015: coliformes totales $2,37 \times 10^4$ NMP/100 mL ($2,1 \times 10^3$ - $7,2 \times 10^4$) y coliformes fecales $7,2 \times 10^3$ NMP/100 mL ($9,5 \times 10^2$ - $1,9 \times 10^4$).

3.2.2. Detección de virus entéricos

La Tabla 3 resume las frecuencias de NoV, RV y iEV en aguas de acequia y verduras de hoja verde. El análisis general de frecuencia de detección viral en ambas matrices indicó que NoV fue el patógeno con una tasa positiva de detección más alta (56 %, 70/125), seguida por iEV (36 %, 45/125) ($P>0,05$), mientras que RV fue el patógeno viral menos detectado (22,4 %, 28/125). No se observaron diferencias en la detección del virus entérico en términos del tipo de vegetal de hoja verde (achicoria o lechuga) ($P>0,05$).

Tabla 3. Detección de virus entéricos en verduras de hoja verde y aguas de riego en Colonia Caroya.

Tipo de muestra	n	Virus detectados, n (%)		
		NoV	RV	iEV
Verduras	101	61 (60,4)	23 (22,7)	36 (35,6)
Achicoria	25	18 (72,0)	6 (24,0)	12 (48,0)
Lechuga	76	43 (56,6)	17 (22,4)	24 (31,6)
Aguas de irrigación	24	9 (37,5)	5 (20,8)	9 (37,5)

La detección temporal de virus entéricos en las aguas de acequia utilizadas para riego y en los vegetales de hojas se muestra en la Figura 7. En las aguas de irrigación se observó la presencia de NoV, RV e iEV tanto en la ES como en la EH. En los vegetales de hojas verdes, NoV se detectó durante todo el período estudiado en al menos una muestra analizada por mes, al igual que iEV, salvo para el mes de noviembre. RV resultó positivo en 8 de los 12 meses analizados con detecciones en las dos estaciones.

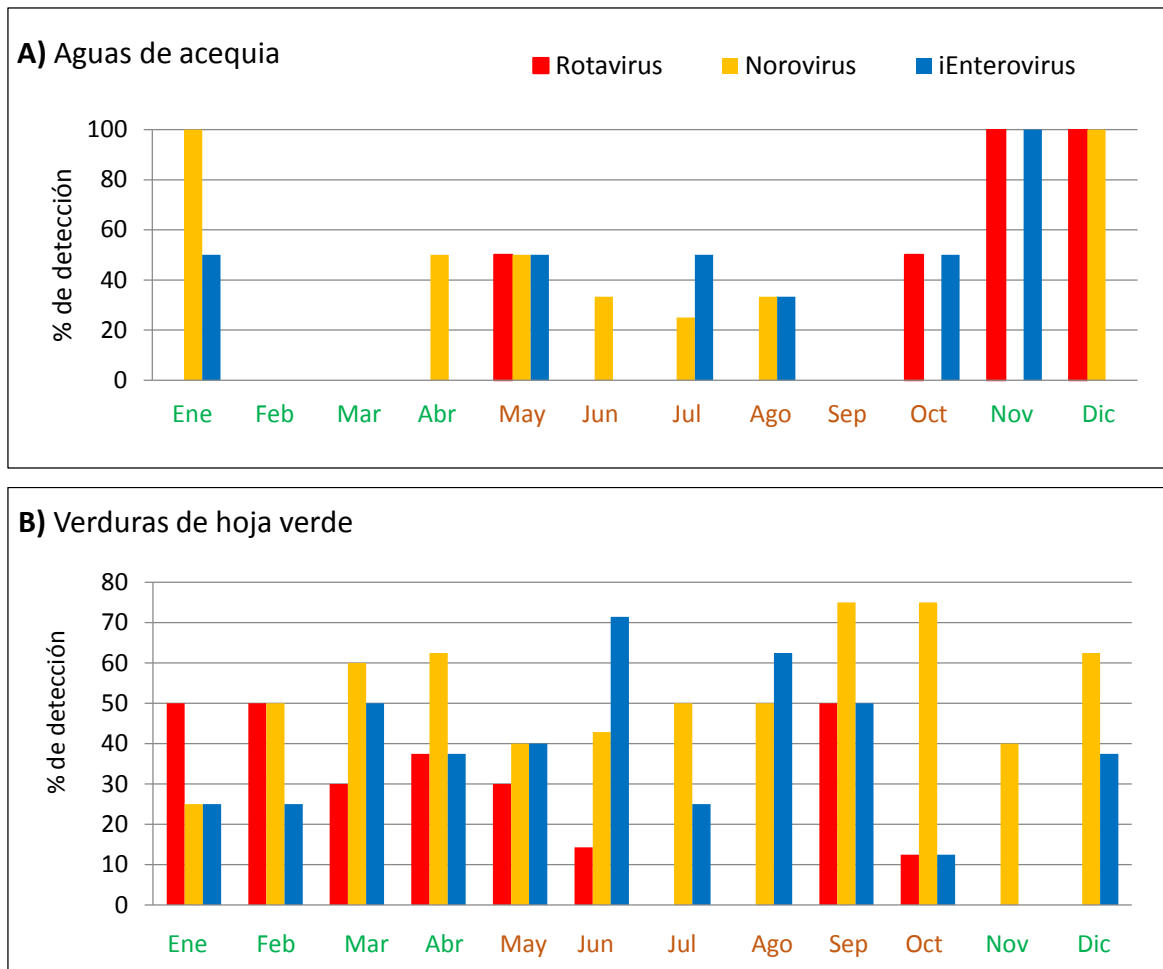


Figura 7. Frecuencia de detección mensual de virus entéricos en **A)** aguas de acequias y **B)** verduras de hojas verdes recolectadas en Colonia Caroya, Córdoba. Meses en color verde corresponden a la estación húmeda, meses en color naranja corresponden a la estación seca.

3.2.3. Caracterización molecular

El 20% de las verduras mostraron múltiples genotipos/genogrupos reflejando la presencia simultánea de diferentes virus y cepas virales en la muestra analizada. NoV GI fue el genogrupo más frecuentemente identificado en muestras de agua de riego (70%, 7/10) y vegetales (48/72, 66,7%) (Figura 8).

El gen VP7 de RV se caracterizó en todas las muestras positivas. Se observó un patrón similar de distribución de G tipos en hortalizas y aguas de riego ($P < 0,05$). G3 fue el genotipo más común en ambas matrices, seguido de G2 y G9 ($P < 0,05$). En muestras

vegetales, también se detectaron G4 y G1. El gen de la proteína VP4 se pudo determinar en 19/23 muestras de vegetales (82,6 %) y en una de las aguas de riego (1/5, 20%). En los vegetales, P[8] fue el P tipo más frecuente, seguido de P[10] y P[4]. También se detectaron P[6] y P[9] (Figura 8).

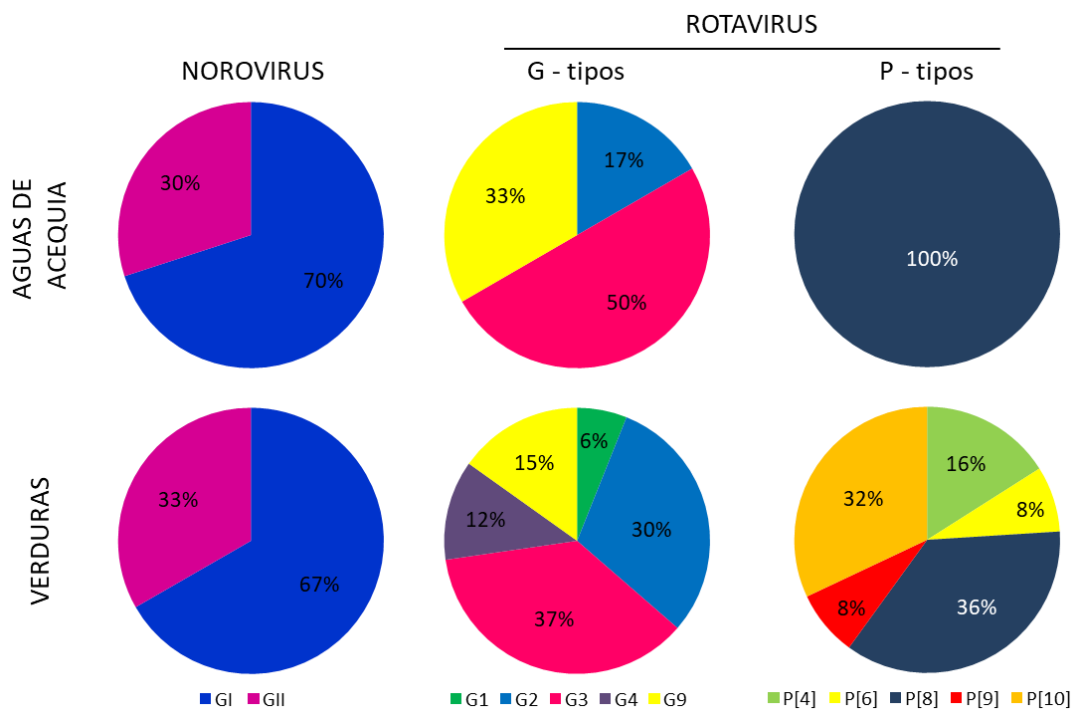


Figura 8. Distribución proporcional de las cepas de norovirus y rotavirus detectadas en aguas de acequias y verduras de hoja verde en Colonia Caroya.

Nueve de las 70 muestras NoV positivas (13%), pudieron ser secuenciadas y analizadas filogenéticamente en un árbol de máxima verosimilitud. A través del análisis filogenético de las cepas genogrupo II de NoV, éstas fueron caracterizadas como genotipo GII.4 variante Sydney 2012 (8/9) en verduras y aguas de irrigación, código de acceso en GenBank MT048671 a MT048678 (Figura 9B). La única muestra que se pudo secuenciar para el genogrupo GI resultó ser genotipo GI.7, que agrupó en el mismo *cluster* con cepas aisladas de brotes en Reino Unido, código de acceso en GenBank MT076466 (Figura 9A).

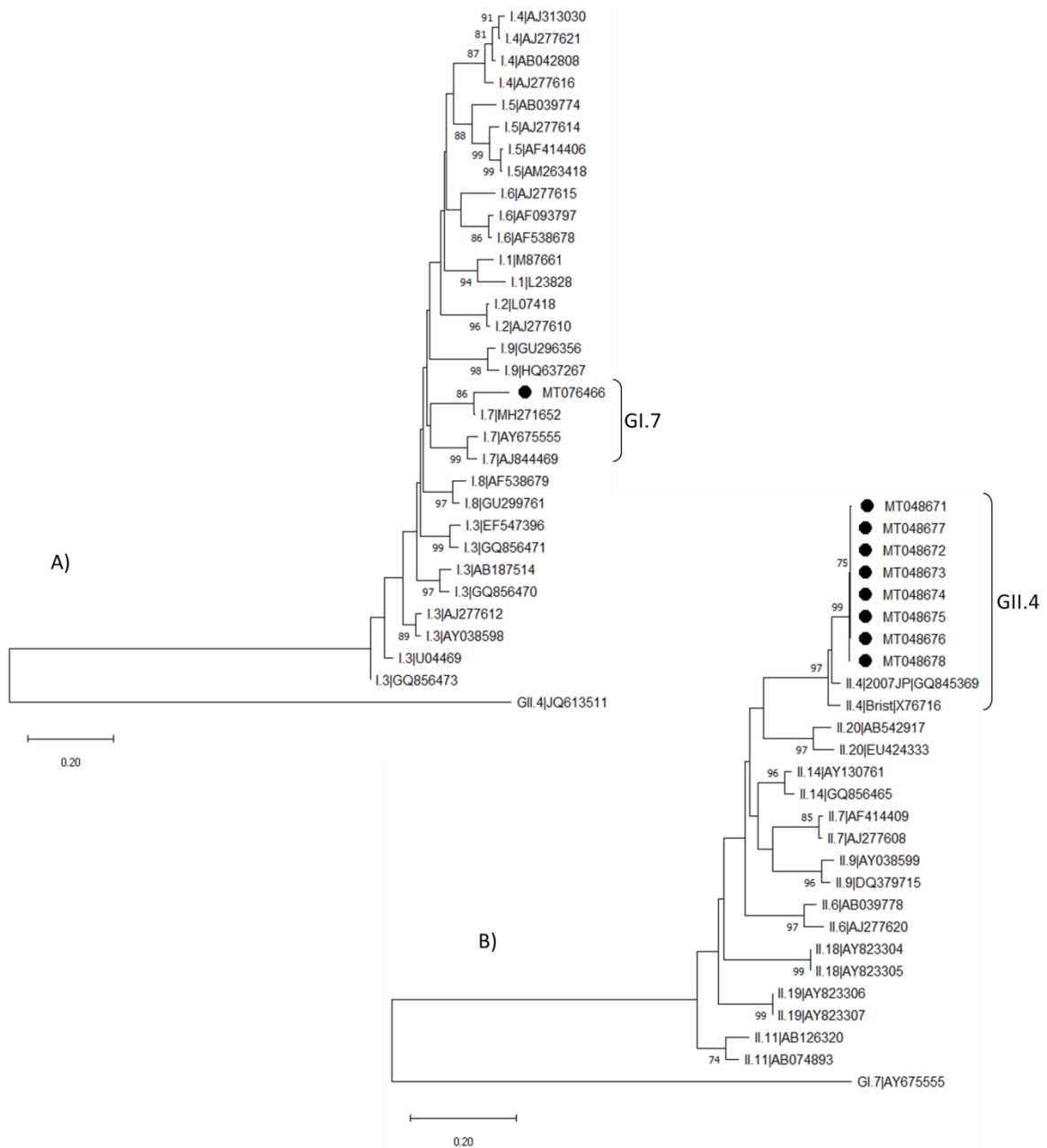


Figura 9. Árboles filogenéticos realizados con secuencias que amplificaron una región del ORF2 de NoV. **A)** NoV GI con 313 nt. Se utilizó como *outgroup* la cepa de NoV GII.4 (código de acceso JQ613511). **B)** NoV GII con 251 nt. Se utilizó como *outgroup* la cepa de NoV GI.7 (código de acceso AY675555). Las cepas detectadas en este análisis se indican con un círculo negro. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* mayores al 70%. La barra indica la distancia que representa 20% de divergencia.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los alimentos, en particular las verduras de hoja, pueden contaminarse con virus en las etapas de pre y post cosecha. En la etapa posterior a la cosecha, la principal fuente de contaminación viral se podría atribuir a los manipuladores de alimentos infectados, que están involucrados en la recolección, el empaque y/o la preparación de los alimentos (Daniels et al., 2000). Bidawid et al. demostraron que el 9,2 % de las partículas de virus infectivas presentes en las manos de trabajadores, pueden transferirse a las verduras durante su manipulación. En general, la contaminación de alimentos en esta etapa es con un solo tipo de virus en particular, que es el mismo que infectó al manipulador de alimentos (Bidawid et al., 2000). En la etapa previa a la cosecha los alimentos pueden contaminarse durante el crecimiento de las hortalizas por contacto con fertilizantes contaminados, aguas residuales y/o el uso de agua de riego contaminada. La contaminación viral en esta etapa se caracteriza por la presencia de virus de diferentes grupos y tipos (Cheong et al., 2009; El-Senousy et al., 2013).

Con respecto a la calidad del agua para riego, el uso de indicadores bacterianos que reflejen la presencia de virus patógenos humanos es actualmente un área de debate internacional. Es evidente a partir de numerosos estudios, que la presencia de indicadores bacterianos "tradicionales" de contaminación fecal no se correlacionan consistentemente con la presencia de virus patógenos en las aguas (Aguirre et al., 2019; Masachessi et al., 2017). La presencia de genomas virales y virus infectivo en áreas donde la contaminación fecal no fue demostrada por indicadores bacterianos, además de sugerir una persistencia prolongada del virus en ambientes acuáticos, denota las deficiencias de estos marcadores (Miagostovich et al., 2008). Estudios previos en el río Suquía demostraron que a medida que el río atraviesa la ciudad, la carga bacteriana en las aguas aumenta, superando ampliamente los niveles guías aceptables para calidad microbiológica. Específicamente, la carga bacteriana en el área donde se abren del río los canales de irrigación para las unidades productivas de chacra la Merced alcanzaron niveles tan altos como $1,1 \times 10^8$ NMP/100 mL para coliformes totales y $1,1 \times 10^7$ NMP/100 mL para coliformes fecales, indicando claramente que estas aguas no deberían ser utilizadas para riego. Sin embargo, a pesar de no cumplirse la normativa vigente, las

unidades productivas de Chacra la Merced (año 2012) hicieron uso de estas aguas, microbiológicamente no aptas, para el riego de vegetales. En el curso del río Suquía, el único punto que reveló carga bacteriana por debajo del nivel guía establecido, fue su nacimiento con aguas tributarias del embalse San Roque. Sin embargo, en este punto se identificó la presencia de virus productores de diarrea (NoV, HAstV y RV) y enterovirus viable (Prez et al., 2015). Respecto a la unidad productiva de Colonia Caroya, el 95% de las aguas de acequia utilizadas para irrigación arrojaron valores de bacterias superiores a los límites guías (coliformes totales >1000 NMP/100 mL y coliformes fecales >400 NMP/100 mL), la única muestra que presentó cargas bacterianas microbiológicamente aceptables (para coliformes totales) fue en el mes de Junio 2015 en la estación seca. Es de destacar que particularmente en estos meses las temperaturas bajan y por lo tanto la actividad biológica del ecosistema de la cuenca hídrica disminuye y junto a ese descenso puede disminuir el componente bacteriano de origen no fecal normalizándose los coliformes totales y manteniéndose altos los coliformes fecales.

Los virus, a diferencia de las bacterias, son parásitos intracelulares obligados, por lo tanto, la contaminación viral de los alimentos no aumentará durante las etapas de producción y procesamiento debido a la replicación viral y los productos contaminados se verán, olerán y tendrán un sabor normal.

Con el objeto de contribuir con información certera sobre contaminación viral en matrices ambientales, en este trabajo de tesis se aplicaron métodos moleculares y celulares para estimar frecuencias de contaminación y caracterizar virus entéricos en aguas residuales, de riego y muestras de verduras asociadas al riego en el cinturón verde de la Provincia de Córdoba, Argentina.

Una desventaja importante de las técnicas de biología molecular utilizadas en la detección de virus es su incapacidad para determinar la viabilidad y la infectividad de los virus detectados. De esta manera, las técnicas moleculares pueden detectar tipos no infecciosos los que no representan una amenaza para la salud. Los tipos no infecciosos en una muestra podrían originarse debido a factores naturales como la luz solar, la temperatura y la humedad que disminuyen o inactivan la infectividad de los virus entéricos. Por lo tanto, la presencia de ácidos nucleicos virales no indica necesariamente

la presencia de virus infecciosos (Hamza et al., 2009). Debido a esto, la detección molecular de virus entéricos no puede confirmar el papel de los vegetales como vehículos transmisores de virus entéricos infecciosos. Para superar esta limitación, en el presente estudio, se analizó la presencia de iEV en el agua de riego y las verduras asociadas. De acuerdo con el límite de detección de iEV de la técnica aplicada (500 CCID₅₀), cada muestra detectada como "iEV positiva" es una fuente potencial de infección. Esta evidencia de viabilidad de EV podría indicar condiciones de matriz adecuadas para mantener la infectividad de los otros virus analizados por detección genómica. Sumado a esto la detección de enterovirus humano refleja que la contaminación fecal es de origen humano.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis revelaron la detección frecuente de NoV, RV, HAstV e iEV en las aguas de riego y en las verduras de hoja analizadas. Esto sugiere que la contaminación de estas matrices se produjo durante todo el período estudiado y en los dos puntos analizados del cinturón verde de Córdoba, indicando que tanto la matriz acuosa como la alimentaria son fuentes potenciales de transmisión viral a población expuesta.

Las aguas residuales de la ciudad de Córdoba, revelaron la circulación continua en la comunidad de NoV, RV y HAstV. iEV se detectó en menor frecuencia (50%) en las muestras de cloacas, lo que podría ser consecuencia de la presencia de sustancias inhibidoras que impiden la amplificación de las partículas virales en los cultivos celulares. NoV genogrupos GI y GII, RV genotipos G1-G4 y G9, y HAstV genotipos G5 y G7 se detectaron en las aguas residuales, reflejando un patrón de especímenes virales que circulan en la comunidad similar al observado en las aguas de riego de la ciudad de Córdoba. Esta situación sugiere posibles descargas de aguas residuales locales no tratadas o mal tratadas en las aguas ambientales. Desafortunadamente, esto parece ser una situación común en diferentes regiones del mundo. Los datos publicados recientemente informaron la presencia de virus en diferentes entornos acuáticos, siguiendo la ruta de la contaminación de las aguas residuales sin tratar a las aguas superficiales (Iaconelli et al., 2015; Rusinol et al., 2015). Además, los resultados obtenidos en esta tesis indican que los genotipos/genogrupos virales que circulan en la comunidad, también se detectan en

hortalizas de hoja verde, lo que sugiere que el agua de riego contaminada sería fuente de contaminación viral vegetal.

En la ciudad de Córdoba iEV se detectó con mayor frecuencia ($P < 0,05$) en vegetales (79%) en comparación con la frecuencia detectada en muestras de aguas residuales (50%) y agua de riego (33%), lo que podría estar relacionado con la afinidad de adhesión de los enterovirus a las hojas verdes (Deboosere et al., 2012; Vega et al., 2005). También, podría deberse a que las verduras se rocían con la misma agua de riego antes de ser comercializadas. Quizás la combinación de ambos factores citados anteriormente podría contribuir a una mayor contaminación de los vegetales con partículas infectivas. Esta particularidad no se observó en la detección de iEV realizada en Colonia Caroya, siendo comparable la frecuencia de iEV en agua de riego (37%) y en verduras (36%).

En los últimos años, se informó la presencia de virus en aguas de riego y verduras asociadas en trabajos realizados en África, Corea del Sur y Egipto (Cheong et al., 2009; El-Senousy et al., 2013; van Zyl et al., 2006). Sin embargo, los artículos publicados informaron limitaciones para establecer el vínculo entre la contaminación viral de las aguas de riego y las muestras de vegetales. Estas limitaciones se refieren a la falta de datos en la caracterización molecular de las cepas virales detectadas en el agua y en las muestras de hortalizas asociadas. También estudios recientes informaron que se detectó RV en 11/134 (8%) de vegetales congelados en la ciudad de México (Parada-Fabian et al., 2016) y en 9/63 (14%) de agua de riego y 1/61 (1,7%) de verduras crudas correspondientes a tres regiones del sur de África (van Zyl et al., 2006). Un estudio realizado en Corea del Sur, monitoreó la aparición de virus entéricos en muestras de agua subterránea y en vegetales cultivados con estas aguas, detectando la presencia de virus en 5/29 (17%) de las aguas subterráneas y en 3/30 (10%) de los cultivos. Adenovirus fue el virus más frecuentemente detectado en cuatro muestras de agua subterránea y tres vegetales; EV y NoV se detectaron en solo una muestra de agua subterránea y una muestra de espinaca, respectivamente, y RV no se detectó durante este estudio (Cheong et al., 2009). Las frecuencias de detección de virus entéricos informadas en los trabajos citados anteriormente son más bajas a las detectadas en el cinturón verde de Córdoba y

confirman el papel de los vegetales como potenciales vehículos transmisores de virus entéricos.

En la localidad de Colonia Caroya, el 56% (70/125) de las muestras analizadas resultaron positivas para NoV, siendo GI el genogrupo más prevalente en las dos matrices (aguas de irrigación y vegetales), pero solo se pudo caracterizar el genotipo viral en una única muestra, correspondiente a una verdura, en la que se identificó el genotipo GI.7. Según la bibliografía disponible esta sería la primer detección en verduras del genotipo GI.7, sin embargo, ya ha sido detectado en matrices ambientales como aguas subterráneas en Corea (Lee et al., 2018), en aguas superficiales en Belem, Brasil (Teixeira et al., 2017), en brotes producidos por aguas (Arvelo et al., 2012; Sekwadi et al., 2018) y en otras congeladas en Irlanda (Rajko-Nenow et al., 2013) Las dificultades en el secuenciamiento de las cepas GI podrían deberse al bajo número de copias del genoma en las muestras positivas y/o al deterioro del genoma por condiciones fisicoquímicas del ambiente. El análisis filogenético de las cepas de NoV GII mostró la circulación del genotipo GII.4 variante Sydney 2012 tanto en acequias como en las verduras asociadas. A nivel mundial el genotipo GII.4 es el más prevalente, estudios anteriores realizados en aguas de la provincia de Córdoba dirigidos a detectar la región del gen de la polimerasa, revelaron la alta circulación de este genotipo (Blanco Fernandez et al., 2011). Un estudio realizado en aguas cloacales en diferentes ciudades de Uruguay también demostró la circulación del genotipo GII.4 variante Sydney 2012 (Victoria et al., 2016). Las cepas en circulación en este punto del cinturón verde de la Provincia de Córdoba son las mismas que circulan en la región, pero lo más importante a destacar es que la cepa GII.4 variante Sydney 2012 que está presente en verduras, es la misma que se detectó en las aguas de irrigación, reforzando la idea de que las aguas son la fuente de contaminación de las verduras.

En función de la ocurrencia de detección de virus entéricos y los perfiles genotípicos identificados en el agua y en las muestras de hortalizas asociadas al riego en los dos puntos del cinturón verde, nuestros resultados permiten sugerir que la contaminación viral de las verduras podría originarse, al menos parcialmente, durante la fase de producción en la huerta. La presencia de genomas virales y partículas infecciosas

en los alimentos que, en general, no reciben tratamiento antes del consumo, subraya que los cultivos verdes pueden actuar como fuentes potenciales de transmisión de virus entéricos a población expuesta.

Los resultados obtenidos del desarrollo de este trabajo de tesis proporcionan los primeros datos para Argentina. Este estudio resalta la necesidad de una vigilancia sostenida en el tiempo de los virus entéricos en los ambientes acuáticos y el vínculo con la contaminación de vegetales en Argentina. Nuestros hallazgos revelan la necesidad de intervención con políticas públicas para el uso de las aguas del río como fuente de riego de vegetales. Esto sería particularmente relevante para reducir el riesgo de virus transmitidos por alimentos debido al consumo de vegetales crudos.

CAPÍTULO IV

Evaluación cuantitativa de riesgo de infección con rotavirus por consumo de verduras contaminadas



1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo III se presentaron resultados que ponen en evidencia la contaminación virológica de aguas utilizadas para irrigación y vegetales asociados a esas aguas, producidos en el área del cinturón verde de la Provincia de Córdoba. Estos resultados sugieren la participación de las aguas de riego en la contaminación viral de vegetales y presupone que el consumo de estos alimentos conlleva un riesgo de infección viral a población expuesta.

La evaluación cuantitativa de riesgo microbiano (*QMRA*, del inglés *Quantitative Microbiological Risk Assessment*) es una técnica de modelado probabilístico utilizada para evaluar “peligros ocultos” en los alimentos y determinar su impacto sobre la salud de individuos expuestos. El análisis de riesgo microbiano implica cuatro fases metodológicas que incluyen la identificación del peligro, la evaluación de la exposición, la modelación de la dosis-respuesta y finalmente la caracterización del riesgo propiamente dicho (Haas et al., 2014). La identificación del peligro consiste en determinar el patógeno de interés; la evaluación de la exposición abarca la definición de la vía de exposición y la determinación de la concentración de patógeno a la que se expondrá el consumidor; el modelado de dosis-respuesta enmarca la probabilidad de infección en función de la dosis de patógeno y finalmente, la caracterización del riesgo reúne los modelos de exposición y dosis-respuesta para estimar la probabilidad de infección o enfermedad (Hamilton et al., 2007). Esta metodología es una herramienta poderosa para estimar el orden de magnitud del riesgo y se ha aplicado con éxito a una variedad de patógenos y escenarios de exposición (Fiona Barker et al., 2013; Mara and Sleight, 2010; Petterson et al., 2001).

El objetivo de este capítulo fue estimar la probabilidad de infección con rotavirus asociada con el consumo de vegetales de hoja verde obtenidos en dos puntos del cinturón verde de Córdoba.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras de vegetales

Como matriz alimentaria se utilizaron las verduras de hoja que se obtuvieron en los dos puntos del cinturón verde de la Provincia de Córdoba: sistema de producción

urbana - Zona Chacra La Merced (n=19) y sistema de producción rural - Zona de Colonia Caroya (n=101), que fueron procesadas y analizadas para detección de rotavirus según se detalló en el Capítulo III de esta tesis.

2.2. Cuantificación del genoma de rotavirus

En las verduras que arrojaron resultado positivo para la detección de rotavirus se analizó la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra siguiendo las condiciones descritas en el apartado “2.6.2. RT-qPCR para cuantificación del genoma de rotavirus” del Capítulo II.

2.3. Análisis cuantitativo de riesgo microbiológico

Haas y colaboradores (2014) identifican cuatro procedimientos formales para determinar el QMRA, a saber:

2.3.1. Identificación del peligro

Rotavirus fue elegido para el QMRA en base a los siguientes criterios: ocurrencia y persistencia en el medio ambiente (Abad et al., 1994); baja dosis infectivas (Graham et al., 1987); posibilidad metodológica de detección y cuantificación (Zeng et al., 2008); disponibilidad de trabajos publicados sobre rotavirus (Parashar et al., 2013; Sanborn and Takaro, 2013); representatividad de un grupo importante de patógenos (Health-Canada, 2019); y la ocurrencia de enfermedades como diarrea y gastroenteritis en la población (Estes and Greenberg, 2013; Giordano et al., 2001; Gomez et al., 1998).

2.3.2. Evaluación de la exposición

El análisis de exposición se basó en los siguientes principios: la concentración genómica promedio de rotavirus en las muestras de verduras, el consumo de verdura por individuo por día en Argentina, la pérdida de carga viral por lavado de las verduras y la viabilidad de los virus (Tabla 1). Para calcular la dosis infectiva diaria, la concentración de rotavirus en una muestra se multiplicó por la prevalencia del virus en los vegetales, la cantidad diaria de consumo de vegetales, la fracción de recuperación viral luego del lavado y la fracción de partículas detectadas capaces de causar una infección.

Las concentraciones genómicas de rotavirus se determinaron por RT-qPCR. Una gran limitación de esta técnica es su incapacidad para determinar la viabilidad y la infectividad de los virus detectados, ya que la presencia de ácidos nucleicos virales no indica necesariamente la presencia de virus infecciosos (Bofill-Mas et al., 2010; Hamza et al., 2009). Para abordar esta limitación, se utilizó en este trabajo la relación previamente estimada por Chigor y colab. (2014) de relación entre copias genómicas y partículas infectivas de rotavirus. No obstante, la relación entre los virus infecciosos y las copias genómicas virales probablemente varía con la matriz de análisis como así también con las distintas combinaciones de *primers* y sondas utilizados para la detección viral (Chigor et al., 2014; Rodriguez et al., 2009; Rutjes et al., 2009; Ward et al., 1984). Por lo tanto, el uso de esta relación acarrea un nivel de incertidumbre desconocido. Los datos de consumo de vegetales por persona por día en Argentina se obtuvieron a través de la revisión de múltiples encuestas nacionales (Giacobone et al., 2018). En este reporte, no se hizo distinción de cultivares sino que se indica el consumo promedio de vegetales, en general, en la población.

2.3.3. Modelo de dosis-respuesta

Para estimar la probabilidad de infección por rotavirus se utilizó el modelo de dosis-respuesta de β -Poisson (Haas et al., 2014), empleando la siguiente ecuación:

$$P_I(d) = 1 - \left[1 + \left(\frac{d}{N_{50}} \right) \left(2^{1/\alpha} - 1 \right) \right]^{-\alpha}$$

donde $P_I(d)$ es la probabilidad o riesgo de infección por transmisión alimentaria para un individuo expuesto a una dosis de patógeno (d); α es un parámetro que caracteriza las relaciones de dosis-respuesta, denominado como constante de infectividad del patógeno; y N_{50} es la dosis infecciosa media o el número de patógenos necesarios para causar una infección en el 50 % de la población expuesta (Tabla 1).

2.3.4. Variabilidad e incertidumbre en los datos

La incertidumbre se introdujo a través del análisis de la distribución de datos por la fuente de muestreo (vegetales de hoja verde crudos). Las simulaciones de Monte Carlo se realizaron para 10.000 iteraciones utilizando el software @Risk 7.6 (Palisade

Corporation, Newfield, Nueva York). En cada iteración, se tomaron muestras de la función de distribución de datos. El resultado del análisis fue el error medio y estándar del riesgo de infección, así como la distribución de frecuencia de las probabilidades de infección. Los valores recalculados se trazaron en un cuadro y gráfico de bigotes para mostrar los valores extremos y el rango de valores medios.

Tabla 1. Parámetros de distribución utilizados para el modelado del QMRA.

Variable	Unidades	Parámetros de distribución y/o valores	Referencias
Concentración de RV en vegetales de:			
- Ciudad de Córdoba	cg/g	Poisson ($\lambda=11$, truncada en 0)	Datos recabados en el presente estudio
- Colonia Caroya		Pert (Mín=74,7; Media=502; Máx=1150)	
Prevalencia de RV en vegetales de:			
- Ciudad de Córdoba		Beta ($\alpha_1=2$; $\alpha_2=19$)	Datos recabados en el presente estudio
- Colonia Caroya		Beta ($\alpha_1=23$; $\alpha_2=79$)	
Reducción de virus por lavado posterior a la cosecha			
	%	Pert (Mín=0,07; Media=0,23; Máx=0,32)	Bae et al., 2011
Virus infectivo: Genoma viral			
		1:10	Chigor et al., 2014
Consumo de vegetales en Argentina			
	g/día	Pert (Mín=100; Media=135; Máx=150)	Giacobone et al., 2018
Dosis-respuesta			
		β -Poisson ($\alpha=0,2531$, $N_{50}=6,17$)	Haas et al., 2014

3. RESULTADOS

La única muestra positiva para RV en Chacra La Merced presento una carga viral de 10,75 cg/g. En Colonia Caroya 23 muestras de las verduras analizadas resultaron positivas para RV con una concentración genómica media de $4,6 \times 10^2$ cg/g ($7,5 \times 10^1 - 1,2 \times 10^3$ cg/g).

Se estimó la probabilidad de infección por rotavirus por consumir vegetales de hoja verde colectados en la Chacra La Merced de la ciudad de Córdoba y en una chacra de la ciudad de Colonia Caroya.

Teniendo en consideración la pérdida de virus por acción del lavado de los vegetales, la relación de virus infectivo a genoma viral y un consumo medio de vegetales en los individuos expuestos de 135 g, la dosis media de rotavirus en vegetales de la ciudad de Córdoba fue de $10,52 \pm 7,78$ cg/día, lo que representó una probabilidad de infección de $0,52 \pm 0,10$ (Figura 1), mientras que la dosis de RV en los vegetales colectados de una chacra de Colonia Caroya fue de $1,16 \times 10^3 \pm 5,15 \times 10^2$ cg/día, resultando en una probabilidad de infección de $0,86 \pm 0,02$ (Figura 1).

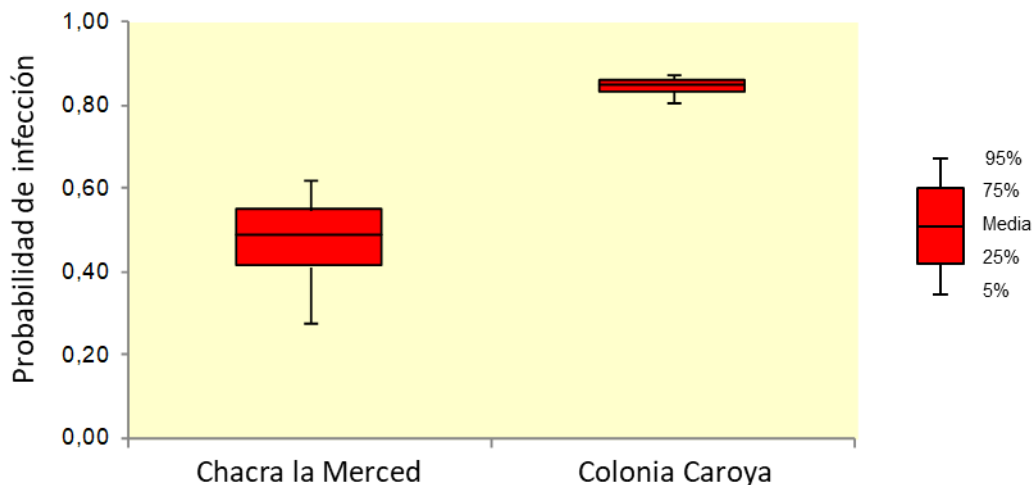
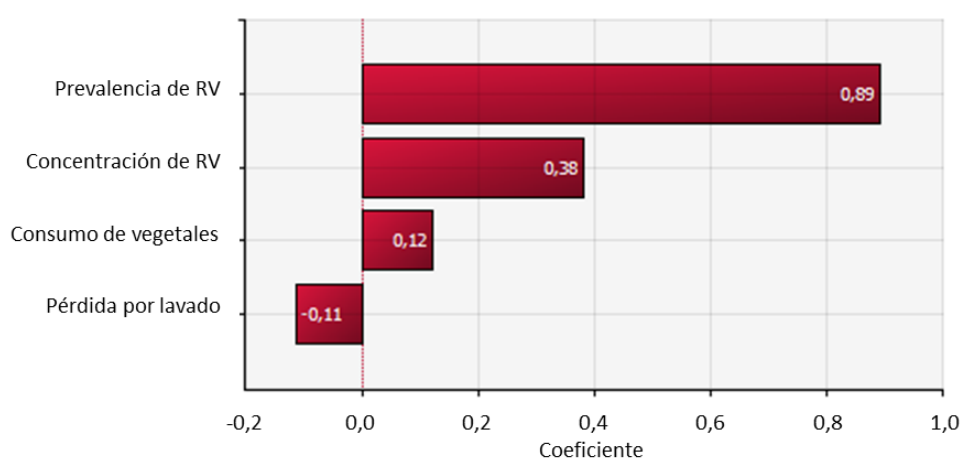


Figura 1. Probabilidad de infección por RV asociado al consumo de vegetales de hoja verde obtenidos de dos puntos del cinturón verde de Córdoba. La probabilidad de infección se establece en el rango 0 – 1.

La sensibilidad de los resultados del modelo de referencia a los valores y parámetros de entrada del modelo, determinados por la correlación de Spearman, reveló que el número medio de probabilidad de infección por rotavirus por consumo de vegetales fue más sensible a la prevalencia y concentración viral en los vegetales, mientras que el tamaño de la porción de vegetales consumida y la reducción viral por lavado de los vegetales no mostraron un impacto importante en el riesgo de infección por transmisión alimentaria (Figura 2).

A)



B)

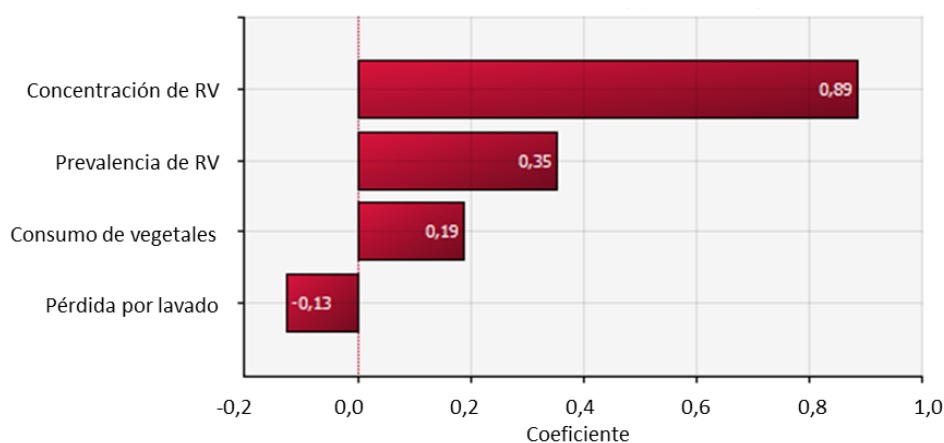


Figura 2. Gráfico de tornado que muestra los parámetros y variables que afectan la probabilidad de infección por rotavirus por consumo de vegetales de hoja verde adquiridos de: **A)** Chacra La Merced, ciudad de Córdoba y **B)** Colonia Caroya. Los coeficientes de correlación de Spearman se obtuvieron a través del análisis de sensibilidad del programa @Risk y se muestran en cada barra.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El *QMRA* es ampliamente utilizado para estimar el riesgo de infección por contacto con diversos organismos indicadores de calidad microbiológica (bacterias y parásitos) en alimentos y aguas de distintos usos (Maffei et al., 2017; Meester et al., 2019; Soderqvist et al., 2019). Sin embargo, solo unos pocos trabajos incluyen el análisis de riesgo por contacto con patógenos virales en matrices alimenticias y acuosas. En Valencia, España, se realizó un análisis de riesgo en brotes de hepatitis A transmitidos por mariscos exportados desde Perú, el cual arrojó valores $>0,8$ de probabilidad de infección (Pinto et al., 2009); en Brasil se analizó el riesgo de infección (que resultó $<0,1$) derivado del consumo de cultivos de verduras regadas con efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Pavione et al., 2013); y en Kumasi, Ghana, un estudio relacionado al consumo de ensaladas de comida callejera reveló valores anuales de 1 en la probabilidad de infección por RV (Barker et al., 2014). En general, el uso de modelos para estimar los riesgos para la salud humana asociados con el consumo crudo de verduras es específico de sitio y de las condiciones presentes en ese escenario local (Pavione et al., 2013).

El consumo de vegetales cosechados de una chacra de Colonia Caroya presentó un riesgo de infección por rotavirus, significativamente más alto (0,86) que el riesgo por consumo de vegetales cosechados en la Chacra la Merced (0,52). Estos resultados indican que la probabilidad media diaria de infección por rotavirus por consumir vegetales crudos lavados, varía en función del lugar de origen de los vegetales, siendo la concentración y prevalencia del virus en estas matrices alimenticias las variables que mayor impacto tienen en la estimación del riesgo.

Numerosas fuentes de incertidumbre pueden proporcionar datos diferentes para estimar el riesgo. Estudios publicados sobre la reducción de virus usando agua de grifo o agua con detergente para lavar vegetales, a través de la inmersión por 1-2 min o por enjuague con un tiempo de contacto de menos de 1 minuto, revelaron valores de reducción de aproximadamente 1 log de virus (Bae et al., 2011). Asumir esta reducción en el valor de la concentración de virus en las verduras podría conducir a subestimar o sobreestimar la probabilidad de infección viral. Sin embargo, es de destacar que en los

resultados obtenidos en el cinturón verde de la Provincia de Córdoba este parámetro del modelado tuvo un impacto bajo en la estimación del riesgo.

Son escasos los datos e información en Argentina respecto al espectro de las afecciones a la salud de la población infectada con rotavirus (esto es, la distribución de la población asintomática y sintomática luego de la infección por rotavirus, la población que requiere atención médica y la que muere). Esto limita el análisis de la caracterización del riesgo para estimar la magnitud del problema de salud pública de la infección por rotavirus, imposibilitando la extrapolación del riesgo de infección individual a impacto de la enfermedad por rotavirus en la comunidad.

Actualmente en nuestro país existen indicadores microbianos que se emplean para evaluar la calidad microbiológica de las verduras, sin embargo, los virus son excluidos de dichos análisis. Los resultados obtenidos en este capítulo remarcan la importancia de formular pautas para garantizar la seguridad virológica de los alimentos que se consumen crudos. Este es el primer reporte en Argentina en el que se aplica un modelo de *QMRA* para establecer los riesgos de infección por rotavirus asociado al consumo de vegetales crudos.

CONCLUSIONES FINALES Y DESAFÍOS



CONCLUSIONES FINALES

Como aporte a la situación en Argentina y en particular a la Provincia de Córdoba en este trabajo de tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones generales:

- Se logró la optimización de una técnica para eluir y concentrar RV a partir de matrices acuosas y verduras que arrojó valores aceptables de recuperación viral y de detección de carga genómica inicial en las matrices analizadas.
- La detección frecuente de NoV, RV, HAstV e iEV en las aguas de riego y en las verduras de hoja analizadas sugiere que la contaminación de estas matrices se produjo durante todo el período estudiado y en las dos unidades productivas analizadas del cinturón verde de Córdoba.
- Las aguas residuales de la ciudad de Córdoba, revelaron la circulación continua de los virus analizados en la comunidad. La particularidad de esto es que los genotipos/genogrupos virales que circulan en la comunidad, también se detectan en las aguas de riego y hortalizas de hoja verde, sugiriendo que el agua de riego contaminada podría ser una fuente de contaminación vegetal con partículas virales.
- La presencia de iEV en las muestras estudiadas podría indicar condiciones de matriz adecuadas para mantener la infectividad de los otros virus analizados por detección genómica. Sumado a esto la detección de enterovirus humano refleja que la contaminación fecal es de origen humano.
- Basados en la simultaneidad de detección de virus entéricos, en los perfiles genotípicos identificados y en el análisis filogenético de cepas de norovirus en el agua de riego y en las muestras vegetales asociadas, es posible sugerir que las aguas son la fuente de contaminación de las verduras durante la fase de producción.
- La probabilidad media diaria de infección por rotavirus por consumir vegetales crudos lavados, varía en función del lugar de origen de los vegetales y la concentración y prevalencia del virus en estas matrices alimenticias. En este caso y bajo las condiciones de este trabajo de tesis la probabilidad media de infección por el consumo de vegetales cosechados de una chacra de Colonia Caroya presentó un riesgo de infección por rotavirus más alto (0,86) que el riesgo por consumo de vegetales cosechados en la Chacra la Merced (0,52).

- La presencia de genomas virales y partículas infecciosas en alimentos que, en general, no sufren ningún tratamiento antes del consumo, destacan a estos cultivos como potenciales fuentes de transmisión de virus entéricos a población expuesta.
- Estos resultados son los primeros datos para Argentina, demostrando que las verduras de hojas verdes están contaminadas con una amplia gama de virus entéricos y que el agua de riego sería una fuente de contaminación.

DESAFÍOS en el escenario epidemiológico de transmisión viral por agua y alimentos contaminados

La infección por virus entéricos en humanos plantea un escenario complejo para el control de la infección por RV, NoV, HAstV y EV debido a las múltiples fuentes a las que los individuos pueden estar expuestos. Estas fuentes involucran a individuos infectados (transmisión persona a persona), pero principalmente a matrices ambientales como agua y alimentos contaminados con virus.

El desafío para mejorar las condiciones virológicas de los recursos hídricos es compleja debido a que está ligado al saneamiento ambiental, en particular al mejoramiento en el sistema de tratamiento y eliminación de excretas en todas sus dimensiones (desde el nivel hogareño hasta las plantas de tratamiento de residuos cloacales) y a una correcta planificación urbana y rural, todo esto orientado a preservar o al menos mitigar el impacto de contaminación antropogénica sobre los recursos hídricos. En la actualidad es un tema instalado en la agenda de salud pública que el deterioro de la calidad virológica de los recursos hídricos tiene un alto impacto en la salud de la población expuesta. Sin embargo, ante la falta de políticas públicas orientadas a controlar/mejorar la calidad microbiológica de las aguas, el desafío se centraría en el control microbiológico incluyendo a los virus de alimentos, en particular las hortalizas que se consumen crudas.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis es posible sugerir que se incorpore a la normativa vigente la detección de genoma de NoV, adhiriendo a la normativa vigente de la Unión Europea y sancionada en los Estados Unidos de América. Esta sugerencia se basa en la alta frecuencia de detección de NoV (> 50%) en verduras producidas en el área del cinturón verde de la Provincia de Córdoba y a la identificación reciente de brotes por NoV asociados al consumo de alimentos en Argentina y en nuestro medio en particular. Esta información, aunque acotada, es comparable a la recabada por la Unión Europea para reglamentar el análisis de NoV en alimentos.

Los desafíos planteados necesitan ser sostenidos por políticas públicas para su implementación y en el mejor de los casos de que se atienda esta problemática, su

implementación sería a largo plazo. Por lo tanto, como desafío inmediato se plantea informar a la población a través de la divulgación de conocimiento, adhiriendo a lo que hoy se denomina divulgación pública de la ciencia. El objetivo es plantear la problemática y dar pautas de higiene alimentaria a los consumidores con el fin al menos de disminuir la potencial carga viral presente en verduras de hojas verdes que se consumen crudas. Como aporte a esta iniciativa planteada, se ofrecen a través de una página web construida para tal fin (www.virusenalimentos.com.ar) los resultados obtenidos del desarrollo de esta tesis doctoral y pautas de comportamiento en higiene para el consumo de hortalizas crudas.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

Abad, F.X., Pinto, R.M., Bosch, A., 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and environmental microbiology* 60, 3704-3710.

Aboubakr, H., Goyal, S., 2019. Involvement of Egyptian Foods in Foodborne Viral Illnesses: The Burden on Public Health and Related Environmental Risk Factors: An Overview. *Food and environmental virology*.

Adamo, M.P., Contigiani, M., 2018. *Virología: Un enfoque integral de las infecciones virales humanas*. Editorial Brujas, Córdoba Argentina.

Aguirre, B.P., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., Biganzoli, P., Grumelli, Y., Panero, M.D., Wassaf, M.M., Pisano, M.B., Welter, A., Mangeaud, A., Re, V., Nates, S.V., Pavan, J.V., 2019. Searching variables to assess recreational water quality: the presence of infectious human enterovirus and its correlation with the main variables of water pollution by multivariate statistical approach in Cordoba, Argentina. *Environmental science and pollution research international* 26, 6586-6601.

Allmann, E., Pan, L., Li, L., Li, D., Wang, S., Lu, Y., 2013. Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. *Journal of virological methods* 193, 327-331.

AProduCo, 1995. *Asociación de Productores de la Provincia de Córdoba*.

Arvelo, W., Sosa, S.M., Juliao, P., Lopez, M.R., Estevez, A., Lopez, B., Morales-Betoulle, M.E., Gonzalez, M., Gregoricus, N.A., Hall, A.J., Vinje, J., Parashar, U., Lindblade, K.A., 2012. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 55, 8-11.

Bae, J.Y., Lee, J.S., Shin, M.H., Lee, S.H., Hwang, I.G., 2011. Effect of wash treatments on reducing human norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. *Journal of food protection* 74, 1908-1911.

Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2008. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International journal of food microbiology* 123, 101-108.

Barker, S.F., Amoah, P., Drechsel, P., 2014. A probabilistic model of gastroenteritis risks associated with consumption of street food salads in Kumasi, Ghana: evaluation of

methods to estimate pathogen dose from water, produce or food quality. *The Science of the total environment* 487, 130-142.

Barril, P.A., Fumian, T.M., Prez, V.E., Gil, P.I., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Ferreyra, L.J., Re, V.E., Miagostovich, M., Pavan, J.V., Nates, S.V., 2015. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environmental research* 138, 409-415.

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, Cordoba, Argentina. *Journal of medical virology* 82, 1277-1281.

Barril, P.A., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Castello, A.A., Rota, R.P., Isa, M.B., Masachessi, G., Ferreyra, L.J., Glikmann, G., Nates, S.V., 2006. Detection of group a human rotavirus G9 genotype circulating in Cordoba, Argentina, as early as 1980. *Journal of medical virology* 78, 1113-1118.

Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., 2000. Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Applied and environmental microbiology* 66, 2759-2763.

Blanco Fernandez, M.D., Torres, C., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Barril, P.A., Isa, M.B., Campos, R.H., Nates, S.V., Mbayed, V.A., 2011. Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Cordoba City, Argentina. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 11, 1631-1637.

Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., La Rosa, G., Iaconelli, M., Muscillo, M., Rutjes, S., de Roda Husman, A.M., Grunert, A., Graber, I., Verani, M., Carducci, A., Calvo, M., Wyn-Jones, P., Girones, R., 2010. Quantification of human adenoviruses in European recreational waters *Water Environment Research* 2, 101-109.

Bosch, A., Pintó, R.M., Giux, S., 2016. Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science* 8, 110–119.

Bosch, A., Pinto, R.M., Guix, S., 2014. Human astroviruses. *Clinical microbiology reviews* 27, 1048-1074.

Bull, R.A., Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging infectious diseases* 11, 1079-1085.

Burke, R.M., Tate, J.E., Kirkwood, C.D., Steele, A.D., Parashar, U.D., 2019. Current and new rotavirus vaccines. *Current opinion in infectious diseases* 32, 435-444.

Coudray, C., Merle, G., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *Journal of virological methods* 193, 96-102.

Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O'Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M.K., 2017. Rotavirus infection. *Nature reviews. Disease primers* 3, 17083.

Croci, L., Dubois, E., Cook, N., de Medici, D., Schultz, A.C., China, B., Rutjes, S.A., Hoorfar, J., Van der Poel, W.H.M., 2008. Current Methods for Extraction and Concentration of Enteric Viruses from Fresh Fruit and Vegetables: Towards International Standards. *Food Anal Methods* 1, 73-84.

Chaimongkol, N., Khamrin, P., Suantai, B., Saikhreang, W., Thongprachum, A., Malasao, R., Ukarapol, N., Kongsricharoern, T., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2012. A wide variety of diarrhea viruses circulating in pediatric patients in Thailand. *Clinical laboratory* 58, 117-123.

Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H., Kim, S.J., 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and environmental microbiology* 75, 7745-7751.

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinje, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of general virology* 100, 1393-1406.

Chhabra, P., Payne, D.C., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Shirley, S.H., Wikswo, M., Nix, W.A., Lu, X., Parashar, U.D., Vinje, J., 2013. Etiology of viral

gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *The Journal of infectious diseases* 208, 790-800.

Chigor, V.N., Sibanda, T., Okoh, A.I., 2014. Assessment of the risks for human health of adenoviruses, hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and three source water dams in the Eastern Cape. *Food and environmental virology* 6, 87-98.

Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of infectious diseases* 181, 1467-1470.

De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., Grassi, T., La Rosa, G., Lucentini, L., Uricchio, V.F., De Donno, A., Montagna, M.T., 2017. Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. *International journal of environmental research and public health* 14.

De Keuckelaere, A., Baert, L., Duarte, A., Stals, A., Uyttendaele, M., 2013. Evaluation of viral concentration methods from irrigation and processing water. *Journal of virological methods* 187, 294-303.

Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., Temmam, S., Loutreul, J., Morin, T., Estienney, M., Belliot, G., Pothier, P., Gantzer, C., Vialette, M., 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food microbiology* 32, 48-56.

Degiuseppe, J.I., Giovacchini, C., Stupka, J.A., Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis, V., 2013. [Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009-2011]. *Archivos argentinos de pediatria* 111, 148-154.

Degiuseppe, J.I., Reale, E.A., Stupka, J.A., Argentine Rotavirus Surveillance, N., 2017. Rotavirus epidemiology and surveillance before vaccine introduction in Argentina, 2012-2014. *Journal of medical virology* 89, 423-428.

Dennehy, P.H., 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical microbiology reviews* 21, 198-208.

Desai, R., Parashar, U.D., Lopman, B., de Oliveira, L.H., Clark, A.D., Sanderson, C.F., Tate, J.E., Matus, C.R., Andrus, J.K., Patel, M.M., 2012. Potential intussusception risk versus health benefits from rotavirus vaccination in Latin America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54, 1397-1405.

Di Pietro, S., Haritchabalet, K., Cantoni, G., Iglesias, L., Mancini, S., Temperoni, A., Labanchi, J.L., Barbarossa, N., Garcia, M.T., Cofre, M., Rosales, S., Herrero, E., Bigatti, R., Orellana, O., Larrieu, E., 2004. [Surveillance of foodborne diseases in the province of Rio Negro, Argentina, 1993-2001]. *Medicina* 64, 120-124.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2018. InfoStat Version 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina <http://www.infostat.com.ar>.

Division of Viral Diseases, National Center for Immunization Respiratory Diseases, 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 60, 1-18.

Dubois, E., Agier, C., Traore, O., Hennechart, C., Merle, G., Cruciere, C., Laveran, H., 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *Journal of food protection* 65, 1962-1969.

El-Senousy, W.M., Costafreda, M.I., Pinto, R.M., Bosch, A., 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *International journal of food microbiology* 167, 74-79.

EPA, 2016. Environmental Protection Agency. Drinking Water Contaminant Candidate List 4-Final. <https://www.federalregister.gov/documents/2016/11/17/2016-27667/drinking-water-contaminant-candidate-list-4-fnal>.

Estes, M., Greenberg, H., 2013. Rotaviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Business/Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: Wolters Kluwer.

FAO, 2000. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Norma de Calidad del Agua y control de descargas. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/dom60779.pdf>.

Farias, A.A., Mojsiejczuk, L.N., Flores, F.S., Aguilar, J.J., Prez, V.E., Masachessi, G., Nates, S.V., 2019. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Cordoba City, Argentina: Prevalence and Detection of Serotypes from 2009 to 2014. *Food and environmental virology* 11, 198-203.

Fernandez, M.D., Torres, C., Poma, H.R., Riviello-Lopez, G., Martinez, L.C., Cisterna, D.M., Rajal, V.B., Nates, S.V., Mbayed, V.A., 2012. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *The Science of the total environment* 437, 262-269.

Fiona Barker, S., O'Toole, J., Sinclair, M.I., Leder, K., Malawaraarachchi, M., Hamilton, A.J., 2013. A probabilistic model of norovirus disease burden associated with greywater irrigation of home-produced lettuce in Melbourne, Australia. *Water research* 47, 1421-1432.

Fleet, G.H., Heiskanen, P., Reid, I., Buckle, K.A., 2000. Foodborne viral illness--status in Australia. *International journal of food microbiology* 59, 127-136.

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, 42-46.

Fumian, T.M., Leite, J.P., Marin, V.A., Miagostovich, M.P., 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *Journal of virological methods* 155, 39-43.

Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K., Bhan, M.K., 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 30, 1365-1373.

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Rock, C.M., 2018. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water research* 133, 282-288.

Giacobone, G., Castronuovo, L., Tiscornia, V., Allemandi, L., 2018. Análisis de la cadena de suministro de frutas y verduras en Argentina. Fundación Inter Americana del Corazón Argentina, 1-56.

Giordano, M.O., Ferreyra, L.J., Isa, M.B., Martinez, L.C., Yudowsky, S.I., Nates, S.V., 2001. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 43, 193-197.

Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leperc-Goffart, I., Hardy, M.E., Estes, M.K., 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of virology* 74, 6581-6591.

Gomes, K.A., Stupka, J.A., Gomez, J., Parra, G.I., 2007. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *Journal of medical virology* 79, 1703-1709.

Gomez, J.A., Nates, S., De Castagnaro, N.R., Espul, C., Borsa, A., Glass, R.I., 1998. Anticipating rotavirus vaccines: review of epidemiologic studies of rotavirus diarrhea in Argentina. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* 3, 69-78.

Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of clinical microbiology* 28, 276-282.

Graham, D.Y., Dufour, G.R., Estes, M.K., 1987. Minimal infective dose of rotavirus. *Archives of virology* 92, 261-271.

Green, K., 2013. Caliciviridae: the Noroviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. ed. Williams & Wilkins, Philadelphia: Wolters Kluwer Health, Lippincott, pp. 582-608.

Greening, G.E., Hewitt, J., Lewis, G.D., 2002. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *Journal of applied microbiology* 93, 745-750.

Guevremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C., Trottier, Y.L., 2006. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *Journal of virological methods* 134, 130-135.

Haack, S.K., Fogarty, L.R., Stelzer, E.A., Fuller, L.M., Brennan, A.K., Isaacs, N.M., Johnson, H.E., 2013. Geographic setting influences Great Lakes beach microbiological water quality. *Environmental science & technology* 47, 12054-12063.

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 2014. *Quantitative Microbial Risk Assessment*, 2nd ed.

Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Xiong, X., Kreidl, S., Benke, K., Maher, P., 2007. Wastewater irrigation: The state of play. *Vadose Zone Journal* 6, 823 – 840.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Uberla, K., Wilhelm, M., 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water research* 43, 2657-2668.

Health-Canada, 2019. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document—Enteric Viruses*. Health Canada, Ottawa, Ontario. www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reportspublications/water-quality.html

Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R., Menzies, J.D., 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of clinical microbiology* 16, 473-477.

Huang, Q.S., Greening, G., Baker, M.G., Grimwood, K., Hewitt, J., Hulston, D., van Duin, L., Fitzsimons, A., Garrett, N., Graham, D., Lennon, D., Shimizu, H., Miyamura, T., Pallansch, M.A., 2005. Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* 366, 394-396.

Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Fratini, M., Muscillo, M., La Rosa, G., 2015. Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food and environmental virology* 7, 316-324.

ICTV, 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Online (10th) Report of the ICTV. , https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/.

INDEC, 2010. Instituto Nacional de Estadística y Censos, Argentina (National Institute of Statistics and Census, Argentina) Results from census 2010 <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>.

Iturriza-Gomara, M., Green, J., Brown, D.W., Desselberger, U., Gray, J.J., 2000. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *Journal of clinical microbiology* 38, 898-901.

Iturriza Gomara, M., Simpson, R., Perault, A.M., Redpath, C., Lorgelly, P., Joshi, D., Mugford, M., Hughes, C.A., Dalrymple, J., Desselberger, U., Gray, J., 2008. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiology and infection* 136, 23-33.

Khamrin, P., Maneekarn, N., Ushijima, H., 2016. Molecular Epidemiology of Astroviruses, in: Svensson, L., Greenberg, H.B., Desselberger, U., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press.

Kim, H.Y., Kwak, I.S., Hwang, I.G., Ko, G., 2008. Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *Journal of virological methods* 153, 104-110.

Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H., 2010. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environmental science & technology* 44, 7116-7122.

Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., Rzesutka, A., Petrovic, T., Vantarakis, A., 2012. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food and environmental virology* 4, 179-191.

Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International journal of food microbiology* 90, 23-41.

Koopmans, M.P.G., Cliver, D.O., Bosch, A., 2008. *Food-Borne Viruses: Progress and Challenges*. ASM Press Washington, DC.

Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Bottiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Hohne, M., Koch, J., Szucs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandez-Pezzi, G., Hedlund, K.O., Koopmans, M., 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of clinical microbiology* 46, 2959-2965.

Kundu, A., Wuertz, S., Smith, W.A., 2018. Quantitative microbial risk assessment to estimate the risk of diarrheal diseases from fresh produce consumption in India. *Food microbiology* 75, 95-102.

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, 397-406.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of clinical microbiology* 44, 3878-3882.

Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L., 2004. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International journal of food microbiology* 97, 179-186.

Lee, C.S., Lee, C., Marion, J., Wang, Q., Saif, L., Lee, J., 2014. Occurrence of human enteric viruses at freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. *The Science of the total environment* 472, 757-766.

Lee, S., Jang, J., Bae, K., Lee, W., Chung, H., Park, S., 2018. Prevalence of human Norovirus by genotype in contaminated groundwater in Korea over the last decade (2007-2016). *Journal of microbiology* 56, 926-931.

Lewis, G.D., Metcalf, T.G., 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and environmental microbiology* 54, 1983-1988.

Lipp, E.K., Farrah, S.A., Rose, J.B., 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine pollution bulletin* 42, 286-293.

Lizasoain, A., Burlandy, F.M., Victoria, M., Tort, L.F.L., da Silva, E.E., Colina, R., 2018. An Environmental Surveillance in Uruguay Reveals the Presence of Highly Divergent Types of Human Enterovirus Species C and a High Frequency of Species A and B Types. *Food and environmental virology* 10, 343-352.

Lizasoain, A., Tort, L.F., Garcia, M., Gomez, M.M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., Victoria, M., 2015. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. *Journal of applied microbiology* 119, 859-867.

Madeley, C.R., Cosgrove, B.P., 1975. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2, 451-452.

Maffei, D.F., Sant'Ana, A.S., Franco, B.D., Schaffner, D.W., 2017. Quantitative assessment of the impact of cross-contamination during the washing step of ready-to-eat leafy greens on the risk of illness caused by Salmonella. *Food research international* 92, 106-112.

Mara, D., Sleigh, A., 2010. Estimation of norovirus and Ascaris infection risks to urban farmers in developing countries using wastewater for crop irrigation. *Journal of water and health* 8, 572-576.

Masachessi, G., Pisano, M.B., Prez, V.E., Martinez, L.C., Michelena, J.F., Martinez-Wassaf, M., Giordano, M.O., Isa, M.B., Pavan, J.V., Welter, A., Nates, S.V., Re, V., 2017. Enteric viruses in surface waters from Argentina: molecular and viable virus detection. *Applied and environmental microbiology*.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology* 156, 1397-1413.

Matthijnsens, J., Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current opinion in virology* 2, 426-433.

McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R., Bellamy, A.R., Harrison, S.C., 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of molecular biology* 397, 587-599.

Meester, M., Swart, A., Deng, H., van Roon, A., Trevisan, C., Dorny, P., Gabriel, S., Vieira-Pinto, M., Johansen, M.V., van der Giessen, J., 2019. A quantitative risk assessment for human *Taenia solium* exposure from home slaughtered pigs in European countries. *Parasites & vectors* 12, 82.

Méndez, E., Arias, C.F., 2013. Astroviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*. Business/Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: Wolters Kluwer.

Miagostovich, M.P., Ferreira, F.F., Guimaraes, 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, 375-382.

Mizukoshi, F., Kuroda, M., Tsukagoshi, H., Sekizuka, T., Funatogawa, K., Morita, Y., Noda, M., Katayama, K., Kimura, H., 2014. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiology and immunology* 58, 536-539.

Moore, M.D., Goulter, R.M., Jaykus, L.A., 2015. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annual review of food science and technology* 6, 411-433.

Mueller, J.E., Bessaud, M., Huang, Q.S., Martinez, L.C., Barril, P.A., Morel, V., Balanant, J., Bocacao, J., Hewitt, J., Gessner, B.D., Delpeyroux, F., Nates, S.V., 2009. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Cordoba Province, Argentina. *Applied and environmental microbiology* 75, 1395-1401.

Nguyen, G.T., Phan, K., Teng, I., Pu, J., Watanabe, T., 2017. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine* 96, e8139.

Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H., Kimura, H., 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiology and immunology* 51, 177-184.

O'Ryan, M., Riera-Montes, M., Lopman, B., 2017. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal* 36, 127-134.

Owusu-Ansah, E.D.J., Sampson, A., Amponsah, S.K., Abaidoo, R.C., Dalsgaard, A., Hald, T., 2017. Probabilistic quantitative microbial risk assessment model of norovirus from wastewater irrigated vegetables in Ghana using genome copies and fecal indicator ratio conversion for estimating exposure dose. *The Science of the total environment* 601-602, 1712-1719.

Pallansch, M.A., Oberste, M.S., Whitton, J.L., 2013. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*. Business/Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: Wolters Kluwer.

Parada-Fabian, J.C., Juarez-Garcia, P., Natividad-Bonifacio, I., Vazquez-Salinas, C., Quinones-Ramirez, E.I., 2016. Identification of Enteric Viruses in Foods from Mexico City. *Food and environmental virology* 8, 215-220.

Parashar, U.D., Nelson, E.A., Kang, G., 2013. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *Bmj* 347, f7204.

Pavione, D.M., Bastos, R.K., Bevilacqua, P.D., 2013. Quantitative microbial risk assessment applied to irrigation of salad crops with waste stabilization pond effluents.

Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research 67, 1208-1215.

Petterson, S.R., Ashbolt, N.J., Sharma, A., 2001. Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation* 73, 667-672.

Pinto, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and environmental microbiology* 75, 7350-7355.

Poma, H.R., Rajal, V.B., Blanco Fernandez, M.D., Barril, P.A., Giordano, M.O., Masachessi, G., Martinez, L.C., Isa, M.B., Freire, M.C., Lopez Riviello, G., Cisterna, D., Nates, S.V., Mbayed, V.A., 2013. Evaluation of concentration efficiency of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PP7 in various water matrixes by different methods. *Environmental monitoring and assessment* 185, 2565-2576.

Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287-290.

Prez, V.E., Gil, P.I., Temprana, C.F., Cuadrado, P.R., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Re, V.E., Pavan, J.V., Nates, S.V., Barril, P.A., 2015. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Cordoba, Argentina. *The Science of the total environment* 538, 220-229.

Raebel, M.A., Ou, B.S., 1999. Rotavirus disease and its prevention in infants and children. *Pharmacotherapy* 19, 1279-1295.

Rajko-Nenow, P., Waters, A., Keaveney, S., Flannery, J., Tuite, G., Coughlan, S., O'Flaherty, V., Dore, W., 2013. Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. *Applied and environmental microbiology* 79, 2578-2587.

REC, 2019. Reporte Epidemiológico de Córdoba. Ya son más de 1.200 los casos de norovirus en San Carlos de Bariloche. <http://www.reporteepidemiologico.com/wp-content/uploads/2019/09/REC-2233.pdf>.

Rodriguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Applied and environmental microbiology* 75, 297-307.

Rusinol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratala, A., Abril, J.F., Silvera, C., Figueras, M.J., Gelati, E., Rodo, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2015. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. *Journal of environmental management* 159, 58-67.

Rutjes, S.A., Lodder, W.J., van Leeuwen, A.D., de Roda Husman, A.M., 2009. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *Journal of applied microbiology* 107, 97-105.

Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q.H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K., Nakaya, S., Ueda, Y., Sugita, K., Motohiro, T., Nishimura, T., Ushijima, H., 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *Journal of medical virology* 61, 326-331.

Sanborn, M., Takaro, T., 2013. Recreational water-related illness: office management and prevention. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 59, 491-495.

Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H., 2016. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environment international* 91, 220-229.

Sekwadi, P.G., Ravhuhali, K.G., Mosam, A., Essel, V., Ntshoe, G.M., Shonhiwa, A.M., McCarthy, K., Mans, J., Taylor, M.B., Page, N.A., Govender, N., 2018. Waterborne outbreak of gastroenteritis on the KwaZulu-Natal Coast, South Africa, December 2016/January 2017. *Epidemiology and infection* 146, 1318-1325.

Sezen, F., Aval, E., Agkurt, T., Yilmaz, S., Temel, F., Gulesen, R., Korukluoglu, G., Sucakli, M.B., Torunoglu, M.A., Zhu, B.P., 2015. A large multi-pathogen gastroenteritis outbreak caused by drinking contaminated water from antique neighbourhood fountains, Erzurum city, Turkey, December 2012. *Epidemiology and infection* 143, 704-710.

Soderqvist, K., Rosberg, A.K., Boqvist, S., Alsanius, B., Mogren, L., Vagsholm, I., 2019. Season and Species: Two Possible Hurdles for Reducing the Food Safety Risk of

Escherichia coli O157 Contamination of Leafy Vegetables. *Journal of food protection* 82, 247-255.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *International journal of food microbiology* 153, 1-9.

Tanaka, G., Faruque, A.S., Luby, S.P., Malek, M.A., Glass, R.I., Parashar, U.D., 2007. Deaths from rotavirus disease in Bangladeshi children: estimates from hospital-based surveillance. *The Pediatric infectious disease journal* 26, 1014-1018.

Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., Network, W.H.-c.G.R.S., 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* 12, 136-141.

Teixeira, D.M., Spada, P.K., Morais, L.L., Fumian, T.M., Lima, I.C., Oliveira, D.S., Bandeira, R.D., Gurjao, T.C., Sousa, M.S., Mascarenhas, J.D., Gabbay, Y.B., 2017. Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belem city, Northern Brazil. *Journal of water and health* 15, 163-174.

Trojnar, E., Sachsenroder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *The Journal of general virology* 94, 136-142.

van Hoek, A.J., Ngama, M., Ismail, A., Chuma, J., Cheburet, S., Mutonga, D., Kamau, T., Nokes, D.J., 2012. A cost effectiveness and capacity analysis for the introduction of universal rotavirus vaccination in Kenya: comparison between Rotarix and RotaTeg vaccines. *PloS one* 7, e47511.

van Zyl, W.B., Page, N.A., Grabow, W.O., Steele, A.D., Taylor, M.B., 2006. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Applied and environmental microbiology* 72, 4554-4560.

Vega, E., Smith, J., Garland, J., Matos, A., Pillaii, S.D., 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *Journal of food protection* 68, 2112-2117.

Victoria, M., Tort, L.F., Lizasoain, A., Garcia, M., Castells, M., Berois, M., Divizia, M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., 2016. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *Journal of applied microbiology* 120, 1427-1435.

Vinje, J., 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology* 53, 373-381.

Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B.V., Estes, M.K., 2013. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *Journal of virology* 87, 4818-4825.

Ward, R.L., Knowlton, D.R., Pierce, M.J., 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of clinical microbiology* 19, 748-753.

WHO, 2003. World Health Organization. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Geneva, Switzerland, <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737.pdf>.

WHO, 2004. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 3th ed., http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/GDWQ2004web.pdf.

WHO, 2006. World Health Organization. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases. Geneva, Suiza, https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fbd_2006.pdf.

WHO, 2013. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 - Recommendations. *Vaccine* 31, 6170-6171.

WHO, 2015. World Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, Suiza, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf.

Widdowson, M.A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J.S., Monroe, S.S., Glass, R.I., 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging infectious diseases* 11, 95-102.

Widmer, K., Van Ha, N.T., Vinitnantharat, S., Sthiannopkao, S., Wangsaatmaja, S., Prasetiati, M.A., Thanh, N.C., Thepnoo, K., Sutadian, A.D., Thao, H.T., Fapyane, D., San, V.,

Vital, P., Hur, H.G., 2013. Prevalence of Escherichia coli in surface waters of Southeast Asian cities. *World journal of microbiology & biotechnology* 29, 2115-2124.

Yates, M.V., Gerba, C.P., Kelley, L.M., 1985. Virus persistence in groundwater. *Applied and environmental microbiology* 49, 778-781.

Zeng, S.Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E.D., Puustinen, L., Vesikari, T., 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of virological methods* 153, 238-240.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS



Trabajos publicados en revistas científicas internacionales

+

Science of the Total Environment 637–638 (2018) 665–671



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Short Communication

Tracking enteric viruses in green vegetables from central Argentina: potential association with viral contamination of irrigation waters



V.E. Prez ^{a,b,*}, L.C. Martínez ^a, M. Victoria ^c, M.O. Giordano ^a, G. Masachessi ^{a,b}, V.E. Ré ^{a,b}, J.V. Pavan ^a, R. Colina ^c, P.A. Barril ^{b,d}, S.V. Nates ^a

^a Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Enfermera Gordillo Gómez s/n – Ciudad Universitaria, CP 5000 Córdoba, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET, Argentina

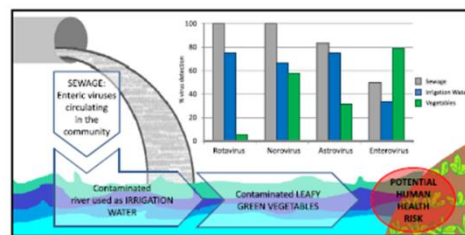
^c Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte, Centro Universitario de Salto, Universidad de la República, Rivera 1350, Salto, Uruguay

^d Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI A.C.), Expedicionarios del Desierto 1310, CP8309 Centenario, Neuquén, Argentina

HIGHLIGHTS

- Enteric virus was frequently detected in vegetables, irrigation waters and sewage.
- Irrigation water is a possible source of viral contamination in raw vegetables.
- Viral variants in the community were similar in vegetables and irrigation waters.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2018

Received in revised form 3 May 2018

Accepted 4 May 2018

Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Food-borne viruses

Sewage

Enterovirus

Norovirus

Rotavirus

Astrovirus

ABSTRACT

Consumption of green vegetable products is commonly viewed as a potential risk factor for infection with enteric viruses. The link between vegetable crops and fecally contaminated irrigation water establishes an environmental scenario that can result in a risk to human health. The aim of this work was to analyze the enteric viral quality in leafy green vegetables from Córdoba (Argentina) and its potential association with viral contamination of irrigation waters. During July–December 2012, vegetables were collected from peri-urban green farms ($n = 19$) and its corresponding urban river irrigation waters ($n = 12$). Also, urban sewage samples ($n = 6$) were collected to analyze the viral variants circulating in the community. Viruses were eluted and concentrated by polyethylene glycol precipitation and then were subject to Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to assess the genome presence of norovirus, rotavirus and human astrovirus. The concentrates were also inoculated in HEp-2 (Human Epidermoid carcinoma strain #2) cells to monitor the occurrence of infective enterovirus. The frequency of detection of the viral groups in sewage, irrigation water and crops was: norovirus 100%, 67% and 58%, rotavirus 100%, 75% and 5%, astrovirus 83%, 75% and 32% and infective enterovirus 50%, 33% and 79%, respectively. A similar profile in sewage, irrigation water and green vegetables was observed for norovirus genogroups (I and II) distribution as well as for rotavirus and astrovirus G-types. These results provide the first data for Argentina pointing out that green leafy vegetables are contaminated with a broad range of enteric viruses and that the irrigation water would be a source of contamination. The presence of viral genomes and infective particles in food that in general suffer minimal treatment before consumption underlines that green crops can act as potential sources of enteric virus transmission. Public intervention in the use of the river waters as irrigation source is needed.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Enfermera Gordillo Gómez s/n – Ciudad Universitaria, CP 5000 Córdoba, Argentina.

E-mail address: vppez@fcm.unc.edu.ar (V.E. Prez).

Comunicaciones en jornadas, simposios y/o congresos

1. **Prez VE.** Mesa redonda: *Calidad virológica de verduras de hojas verdes y aguas de irrigación en Córdoba. Argentina.* II CONGRESO CIENTÍFICO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICA 2019 “Un Punto de Encuentro y Proyección”. Junio 2019 Córdoba, Argentina.
2. **Prez VE, Martínez LC, Masachessi G, Giordano MO, Barril PA, Nates SV.** *Rotavirus y enterovirus: ¿desde las aguas de riego hasta las verduras de hoja?* XXXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Diciembre 2018 Valle Hermoso, Córdoba, Argentina.
3. **Prez VE, Martínez LC, Masachessi G, Giordano MO, Barril PA, Nates SV.** *Rotavirus and enterovirus: through irrigation waters to green vegetables.* 13th International dsRNA Virus Symposium. September 2018, Houffalize, Belgium.
4. **Prez VE, Martínez LC, Victoria M, Masachessi G, Farías AA, Giordano MO, Pisano MB, Re VE, Paván JV, Barril PA, Nates SV.** *Detección de virus entéricos en verduras de hojas verdes comercializadas en la ciudad de Córdoba, Argentina.* XII Congreso Argentino de Virología. Septiembre de 2017 Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
5. **Prez VE, Martínez LC, Masachessi G, Giordano MO, Ré VE, Barril PA, Pavan JV, Nates SV.** *Risk of rotavirus infection associated with the consumption of raw vegetables.* III Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental. Junio 2016 Salta, Argentina.
6. **Prez VE, Martínez LC, Masachessi G, Giordano MO, Ré VE, Pavan JV, Nates SV, Barril PA.** *Evaluation of a virus recovery method for detecting Rotavirus on chicory.* III Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental. Junio 2016 Salta, Argentina.
7. **Prez VE, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Paván JV, Nates SV, Barril PA.** *Eficacia del método de concentración de rotavirus en aguas y verduras de hojas verdes.* XVI Jornadas de Investigación Científica. Octubre 2015 Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, Argentina.

Trabajos en eventos científicos no publicados

Prez VE, Martínez LC, Masachessi G, Farías AA, Giordano MO, Barril PA, Nates SV. *Identification of enteric viruses in green vegetables from Córdoba, Argentina.* 3rd International Conference on Global Food Security. December 2017 Cape Town, South Africa.