



# **Monitoreo y confección de mapas que reflejen la contaminación estacional por astrovirus humano en las aguas del Río Suquía de la Ciudad de Córdoba, Argentina**

**Miguel Oscar Giordano.**

Tesis-Maestría en Salud Pública - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas;  
2015.

Aprobada: 2015

---

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/>

---

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Monitoreo y confección de mapas que reflejen la contaminación estacional por astrovirus humano en las aguas del río Suquía de la Ciudad de Córdoba, Argentina by Miguel Oscar Giordano is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

---

**Maestría en Microbiología con Orientación en  
investigación en salud humana**

***“Monitoreo y confección de mapas que reflejen la contaminación  
estacional por astrovirus humano en las aguas del río Suquía de  
la Ciudad de Córdoba, Argentina”***

Maestrando: Miguel Oscar Giordano

Director de tesis: Dra. Silvia Viviana Nates

**Laboratorio de Gastroenteritis Virales  
Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Córdoba**

## Agradecimientos

A mi directora de maestría la Dra. Silvia V. Nates por el acompañamiento, por la guía en el desarrollo de esta tesis y la producción de este trabajo final que sin su apoyo no sería posible realizar este largo recorrido de aprendizaje.

Al tribunal de tesis Dr. Rafael A. Fernández, Dra. María E. Cobes y Dr. Leonardo J. Ferreyra por su tiempo y sus correcciones en este trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge V. Pavan por su predisposición y asesoramiento sobre todo en el tratamiento estadístico de los datos y apoyo en los momentos difíciles.

Al Dr. Leonardo J. Ferreyra por su apoyo incondicional y desinteresado, por su asesoramiento en el análisis de secuencias, producción y edición de figuras.

A la Dra. Patricia A. Barril por su apoyo en la revisión y discusión de protocolos de biología molecular.

Al Dr. Jorge A. Cámara por su asesoramiento, apoyo y colaboración desinteresada en manejo de los métodos comerciales de extracciones de ácidos nucleicos.

Al Lic. en Genética Verónica Prez por su voluntad, asesoramiento, compaginación y tuning de esta edición del trabajo de tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión, Laura, Gisela, Patri, Patty, Verónica y Andrés compañeros de ruta-virológica, de apoyo incondicional en todo momento.

A mis compañeros de trabajo y de encuentro Pilar, Lula, Mauro, Alicia, Jorge, Pame, Emi, Pedro, Gaby, Gladis, Estela, Roxana, Marcelo, Dani, Luis, Adrián, Viví, Lorena, Marcos, Belén, Brenda, Javier, Patricia, Ximena, Jesi, Celia, Cecilia, Marina, Fernando, Gonzalo.....

A los integrantes del Instituto de Virología que de una forma u otra contribuyeron en el desarrollo de este trabajo de maestría.

A mis amigos, José, Fernando, Marcelo, Beto, Ricardo, Pablo, Chicho, Mónica que me dicen "¡todavía seguís estudiando!".

A mis compañeros de ruta, de emprendimientos y de sueños, Iván, Silvia, Ramoncito, Liliana, Lorena, Consuelo, Silvio y Verónica.

A mis padres Emilia y Raúl, a mis hijos Matías, María Emilia y Emanuel, a mi esposa Domi que me apoya, por la paciencia y otras más, si no esto tampoco sería posible.

A mi bisabuela Delfina, tía abuela Glafira y mis abuelos Haydee y Juan que seguramente estarán orgullosos de este momento al cual estoy llegando, en base a la enseñanza que me inculcaron y de que los logros en la vida se realizan con esfuerzo, tenacidad, y trabajo.

A mi familia política Haydee y Raquel, a mis abuelos del corazón, Jesús y Bitalia que se interesan en mí, me apoyan y se preocupan.

A todas aquellas personas que de alguna forma apoyaron y acompañaron en este camino, por todo esto y por más...

***Gracias por venir, gracias por estar, gracias totales.***

## ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>26</b>
Objetivos generales .....	26
Objetivos específicos .....	26
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>27</b>
Muestreo del río Suquía: .....	27
Muestreo de aguas residuales:.....	28
Concentración de virus a partir de aguas residuales y agua de río.....	28
Extracción de ácidos nucleicos virales.....	29
QIAamp Viral RNA Mini Kit: .....	29
RT-PCR <i>multiplex</i> anidada para la detección de astrovirus en ecosistemas acuáticos.	
Síntesis de ADN complementario .....	29
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
Reacción de PCR <i>multiplex</i> anidada para la amplificación de regiones genotipo variables del ORF-2 de la proteína de la cápside de astrovirus humano .....	31
Secuenciamiento de los productos genómicos obtenidos por PCR .....	32
Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	33
Detección de enterovirus humanos .....	33
Análisis de variables físico-químicas y bacteriológicas .....	33
Físico-químicas: .....	33
Bacteriológicas:.....	34
Tratamiento de datos .....	34
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>35</b>
Análisis de la calidad físico-química y bacteriológica del agua del río Suquía .....	35
Detección de astrovirus humanos (HAstVs) en aguas del río Suquía y aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba .....	43
Análisis comparativo entre carga de bacterias indicadoras de contaminación fecal y detección de genoma de astrovirus .....	48
Detección de genoma viral y viabilidad viral (virus infectivo).....	51
Genotipos de astrovirus humanos (HAstVs) en aguas del río Suquia y aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba .....	53
Análisis de secuencias de astrovirus en el río Suquía y cloacas de Bajo Grande .....	57
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Proyección del trabajo de tesis desarrollado .....</b>	<b>64</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>65</b>

## Resumen

El agua es reconocida como el recurso natural máspreciado de nuestro planeta, el descuido de las fuentes de agua ligado a las actividades humanas, genera contaminación sostenida en el tiempo y lleva como resultado a la disminución en la calidad y cantidad de este recurso esencial. La presencia de patógenos virales en las fuentes de agua tienen un alto impacto socioeconómico tanto en las naciones en desarrollo como en las desarrolladas. La ocurrencia de virus entéricos como rotavirus, astrovirus, norovirus y adenovirus en el ambiente, en aguas y alimentos, ha sido reportada en los países desarrollados y asociada a gastroenteritis de origen viral relacionada con el consumo de agua contaminada con materia fecal.

En Argentina y otros países de Sudamérica no hay regulaciones sobre el monitoreo de virus patógenos en matrices acuosas y existen pocos estudios de monitoreo ambiental de patógenos virales (rotavirus, norovirus, adenovirus, enterovirus) en aguas superficiales de ríos y lagos. Más aún, no se dispone de información sobre el monitoreo ambiental de astrovirus en aguas superficiales en la Argentina.

En este trabajo de tesis se abordó el estudio de astrovirus humano en aguas del río Suquia con los objetivos de: **1.** Evaluar las aguas del río Suquia como potencial fuente de transmisión de astrovirus humano (HastV). **2.** Conocer si el río Suquia está integrado a la historia natural de circulación de astrovirus en nuestro medio.

A los fines de cumplir los objetivos planteados se analizaron un total de 28 muestras de agua recolectadas en 7 puntos representativos del río Suquia, cubriendo el muestreo desde el nacimiento (Dique San Roque) hasta que el río abandona la Ciudad de Córdoba (Cantera San José). El muestreo fue llevado adelante durante el año 2010, colectando en cada sitio una muestra de agua por estación (total: 4 muestras por sitio

de muestreo). Simultáneamente se recolectaron mensualmente muestras de agua residual cruda del caño maestro que llega a la planta urbana de Bajo Grande que recolecta las excretas de aproximadamente el 50% de la población de la Ciudad de Córdoba. En las muestras de río se determinó la carga bacteriana de coliformes totales y fecales, y variables físico-químicas como sólidos suspendidos, demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxígeno, fracciones de nitrógeno inorgánico disuelto: amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), y ortofosfato. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis multivariado de conglomerado con el objeto de agrupar sitios de muestreo con similitud en calidad físico-química y bacteriológica del agua. El dendograma resultante agrupó los sitios de monitoreo en 4 clusters diferentes. El total de las muestras recolectadas (aguas del río y efluentes cloacales) fueron concentradas 100 veces utilizando un método estandarizado de centrifugación, elución y precipitación con polietilenglicol, para la detección de enterovirus viable en cultivos celulares e inmunofluorescencia indirecta y genoma de astrovirus por retrotranscripción- reacción anidada en cadena de la polimerasa (RT- PCR *multiplex* anidada). De acuerdo al análisis de conglomerado la determinación de virus se realizó en 4 puntos diferenciados de muestreo (nacimiento del río, 2 puntos centrales del recorrido del río por la ciudad y uno final cuando abandona la Ciudad de Córdoba). Las muestras que resultaron positivas para genoma de astrovirus fueron genotipificadas por una PCR *multiplex* anidada para los HAstV 1-8 y comparados sus perfiles y frecuencias genotípicas detectados en aguas del río y residuales. Dos muestras del genotipo de astrovirus humano (HAstV-1) (una de río y otra de agua residual) fueron secuenciadas y analizadas comparativamente en sus secuencias nucleotídicas,

aminoacídicas y origen evolutivo, con otras cepas del genotipo HAstV-1 aisladas en distintas regiones del mundo.

Los resultados de este trabajo de tesis de HAstVs en muestras ambientales son los primeros disponibles en nuestro país, arrojando las siguientes conclusiones:

**1.** La presencia de astrovirus potencialmente infeccioso es un evento frecuente en las aguas del río Suquía (rango de detección entre 50-100%), lo que hace que esta matriz acuosa sea una fuente potencial de infección por astrovirus a población expuesta durante todo el año.

**2.** La alta frecuencia de detección de astrovirus (91,6%) en aguas residuales refleja que son virus de circulación endémica en nuestro medio.

**3.** La detección de cepas de astrovirus humanos genotipo 1 en aguas del río y residuales de la Ciudad de Córdoba, con alta identidad genómica (98%) y aminoacídica (94%) y con un ancestro evolutivo común, señala a la contaminación fecal humana como fuente de contaminación viral de aguas del río Suquia.

**4.** La distribución y frecuencia comparable ( $p < 0.05$ ) de genotipos de HAstVs identificada en aguas residuales y del Suquía sugiere que el río estaría incorporado como fuente de transmisión viral, a la historia natural de circulación del virus en nuestro medio.

**5.** La presencia de genoma de astrovirus en sitios de monitoreo que muestran bajo nivel de contaminación fecal por indicadores bacterianos sugiere una prolongada persistencia de este grupo de virus entéricos en el ambiente. Este genoma viral podría ser utilizado como marcador de contaminación fecal de las aguas.

**6.** Se propone como estrategia de monitoreo de la calidad bacteriológica y viral para las aguas del Suquía, un muestreo anual en 4 sitios del río, un punto inicial (Dique San



Roque), dos centrales (Villa Warcalde y Vado Sargento Cabral) y uno final (Cantera San José), incluyendo en este análisis, a las variables  $\text{DBO}_5$ ,  $\text{NH}_4^+$ , coliformes totales, coliformes fecales y astrovirus.

**7.** Los resultados de este trabajo de tesis podrían ser tomados como datos de base para la implementación de políticas públicas tendientes a evaluar acciones de saneamiento de las aguas del río Suquia.

## **Abstract**

Water is the most precious natural resource on Earth; neglected water sources associated with anthropogenic activities generate sustained contamination over time and results in a reduction in quantity and quality of this essential resource. The presence of pathogenic virus in water sources has a high socioeconomic impact, both in developing and developed countries. The occurrence of enteric virus, such as rotavirus, astrovirus, norovirus and adenovirus, in the environment, water and food has been reported in developed countries associated with viral gastroenteritis related to consumption of fecal-contaminated water.

In Argentina as well as in other South American countries, there are regulations not requiring monitoring of pathogenic viruses in water matrices, and few studies have focused on environmental monitoring of viral pathogens (rotavirus, norovirus, adenovirus, enterovirus) in surface waters of rivers and lakes. Moreover, there is no information available on environmental monitoring of astrovirus in surface waters in Argentina.

This thesis work focuses on the study of human astrovirus in the waters of the Suquía river, with the general aims of: **1.** evaluating the waters of Suquía river as a potential source of transmission of human astrovirus (HastV), and **2.** Knowing if Suquía river is integrated to the natural history of astrovirus circulation in our environment.

To meet the aims of this work, a total of 28 water samples were collected from 7 representative points along Suquía river course, with sampling covering from the riverhead (San Roque Dam) to the site where the river leaves the city of Córdoba (San José quarry). Sampling was conducted during 2010 by collecting a water sample from each site per season (total: 4 samples per sampling site). In addition, samples of crude

residual were taken from the principal pipeline that reaches the Bajo Grande wastewater treatment plant, where wastewater from about 50% of the population of Córdoba city is collected. Load of total and fecal coliform bacteria was determined in river samples, as well as physicochemical variables, such as suspended solids, biochemical oxygen demand (DBO<sub>5</sub>), chemical oxygen demand, dissolved inorganic nitrogen fractions: ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), and orthophosphate. The results obtained were subjected to a multivariate clustering analysis with the aim of grouping sampling sites according to their similarity in physicochemical and bacteriological water quality. The resulting dendrogram grouped the monitored sites into four different clusters. All of the collected samples (river water and wastewater) were concentrated 100 times using the standardized method of centrifugation, elution and precipitation with polyethylene glycol, to detect viable enterovirus in cell culture by indirect immunofluorescence and astrovirus genome by reverse transcription nested in polymerase chain reaction (RT-nested multiplex PCR). According to the cluster analysis, the virus was determined at four sampling points (riverhead, two central points of the river course across the city, and a final point at the site where the river leaves Córdoba city). The samples that resulted positive for astrovirus genome were genotyped and the genotypic profiles and frequencies detected in river water and wastewater were compared. Two samples of HAstV-1 genotype (one from the river and the other from wastewater) were sequenced and analyzed by comparing their nucleotide and amino acid sequences as well as their evolutionary origin with other strains of the human astrovirus genotype 1 (HAstV-1) isolated from different regions of the world.

The results of this thesis work are the first records available for our country, and allow us to draw the following conclusions:

- 1.** The presence of potentially infective astrovirus is a frequent event in Suquía river waters (detection range between 50-100%), making this aqueous matrix a strong potential source of astrovirus infection for the population exposed year round.
- 2.** The high frequency of astrovirus detection (91.6%) in wastewater reveals that these are virus of endemic circulation in our environment.
- 3.** The detection of human astrovirus genotype 1 (HAstV-1) in river water and wastewater in the city of Córdoba, with high genomic (98%) and amino acid (94%) identity and with a common evolutionary ancestor indicates that human fecal pollution is a source of viral contamination in the waters of Suquía river.
- 4.** The distribution and comparable frequency ( $p < 0.05$ ) of HAstVs genotypes identified in wastewaters and Suquía river water suggest that the river would be incorporated as a source of viral transmission to the natural history of the virus circulation in our environment.
- 5.** The presence of the HAstV genome at monitoring sites that show low fecal contamination by bacterial indicators suggests a long persistence of this enteric virus group in the environment. This viral genome might be used as a fecal water contamination indicator.
- 6.** As a monitoring strategy of bacteriological and viral quality of Suquía river waters, we propose an annual sampling at four sites along the river course: San Roque Dam (where the Suquía river borns), Villa Warcalde and Sargento Cabral ford (two central points of the river course across the city) and San José Quarry (where the river runs off

Córdoba city), including the variables  $\text{DBO}_5$ ,  $\text{NH}_4^+$ , total coliforms, fecal coliforms and astrovirus in the analysis.

**7.** The results of this thesis work might be used as baseline information for implementing public policies to evaluate sanitation actions of the Suquía river waters.

## Introducción

El agua es reconocida como el recurso natural máspreciado de nuestro planeta. Sin embargo, los cursos de agua avanzan hacia un proceso de deterioro progresivo por el alto grado de contaminación, alterando los mecanismos de depuración natural y limitando su uso como fuente de recreación y provisión de agua. El aumento de la población y la deficiente calidad de agua han traído como consecuencia un significativo incremento de la morbilidad y mortalidad humana. Más de 2,2 millones de personas mueren cada año por enfermedad asociada a la calidad de agua y a las condiciones sanitarias en países en desarrollo (Straub y Chandler, 2003). Se ha estimado que cerca de un cuarto de todas las camas de los hospitales del mundo son ocupadas por personas que presentan infecciones de origen hídrico (Wyn-Jones y col., 2001). Esto incluye no sólo el agua usada para beber y para propósitos recreacionales sino también para usos en la agricultura y en procesos de lavado de alimentos crudos. Así, las poblaciones que hacen uso de los cursos de agua, quedarían expuestas al riesgo de infección por agentes patógenos, en particular por virus (Pusch y col., 2005). Esto se debe a que muchas especies virales después de su replicación en el tracto gastrointestinal, son excretadas en altas concentraciones en las heces humanas (entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas virales por gramo de materia fecal), dando como resultado una alta carga viral en las aguas residuales de las poblaciones urbanas (Rao y Melnick, 1986). La carga viral en cloacas es el resultado del virus excretado por toda la población infectada, esto incluye a los individuos sintomáticos y asintomáticos.

Como consecuencia de una deficiente estructura sanitaria, las aguas residuales crudas alcanzan los cursos de aguas superficiales, dando lugar a aguas con potencialidad de transmitir virus patógenos. Sin embargo, es importante destacar, que aún bajo

condiciones sanitarias óptimas para la eliminación de excretas, como son los sistemas de redes cloacales, los asentamientos poblacionales también contribuyen a la contaminación viral de aguas superficiales. Esto se debe a que los procedimientos actuales de tratamiento y de desinfección en las plantas de aguas residuales, están limitados a reducir el número de bacterias, sin tener estándares para monitorear virus. Bajo estas condiciones, los afluentes tratados al ser vertidos en matrices acuosas, tendrían la habilidad de contaminar con virus las aguas ambientales como lagos y ríos, causando potencialmente un riesgo para la salud pública (Pusch y col., 2005).

Los virus excretados por heces son agentes etiológicos de distintos tipos de enfermedades humanas como las gastrointestinales (agentes etiológicos: rotavirus, astrovirus, adenovirus serotipo 40/41 y norovirus), las hepatitis virales (agentes etiológicos: virus de las hepatitis A y E) y las enfermedades neurológicas (agente etiológico: enterovirus). Una ingestión de agua con 10 a 100 partículas virales infectivas es suficiente para causar infección en el hospedero expuesto (Gutiérrez-Aguirre y col., 2009).

El estudio de virus en agua es un área en franco crecimiento, pero limitada a laboratorios de alta y media complejidad. Esto se debe a que la detección de virus en agua requiere como primer paso la concentración de la muestra, como consecuencia de la alta dilución del virus en la matriz acuosa. La selección del procedimiento de concentración es un paso esencial para el análisis de agua. Hay múltiples procedimientos disponibles para concentrar virus en agua, basados en las diferentes propiedades de las partículas virales y cada procedimiento puede tener variaciones metodológicas. El método de adsorción-elución está basado en las propiedades de las partículas virales como la polaridad y la hidrofobicidad, permitiendo la adsorción de

virus en una gran variedad de matrices . La adsorción de virus a filtros microporosos se produce por las interacciones electrostáticas entre los virus y los filtros y con la adición de sales se pueden reforzar las interacciones hidrofóbicas pH-dependientes. Los virus adsorbidos pueden ser eluidos en pequeños volúmenes y así concentrados durante este proceso. Otro método es la precipitación con polietilenglicol (PEG), demostrada como una técnica simple, rápida y relativamente eficiente para la concentración de virus en matrices acuosas. El polietilenglicol es un polímero sintético soluble en agua que es ampliamente usado en virología. La precipitación de proteínas con PEG se debe principalmente a un efecto de exclusión de volúmenes. Las proteínas son estéricamente excluidas de regiones que en el solvente ocupa el PEG y cuando la solubilidad límite de las proteínas es excedida, precipitan. La ultrafiltración es un método de separación basado en el tamaño de los poros de las membranas o cartuchos. La selección del tamaño del poro permite en simultáneo remover y concentrar partículas como virus, bacterias y parásitos de grandes cantidades de agua. Cada uno de los métodos arriba citados, tiene una determinada eficiencia de recuperación de virus en el material concentrado, que depende de una amplia variedad de factores tales como la estructura y tamaño del virus a concentrar, la concentración viral de partida y la complejidad de la matriz acuosa. Es muy importante la evaluación de tal eficiencia a los fines de la correcta interpretación del resultado de detección viral. Sin embargo no es posible operativamente la evaluación de la metodología de concentración para cada uno de los virus, por lo que se recurre a utilizar virus sustitutos (Poma y col., 2013).

Luego del proceso de concentración, la detección de virus tradicionalmente se realiza por métodos que emplean cultivos celulares. La ventaja de esta metodología es que se



obtiene información de la presencia de virus viable (infectivo) en el agua estudiada. En contrapartida, la desventaja es que requiere largos períodos de tiempo para obtener resultados y se restringe a virus que puedan replicarse en cultivos de células afines. En los últimos años la biología molecular ha tenido grandes avances, en particular con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitiendo una rápida y específica detección de los ácidos nucleicos virales (Girones y col., 2010). La aplicación como rutina de los métodos de biología molecular, ha incrementado la detección de virus entéricos como contaminantes ambientales (Miagostovich y col., 2008; Rodriguez-Diaz y col., 2009; Zhou y col., 2014; Lizasoain y col. 2015). A partir de la década pasada, distintos investigadores han reportado en diferentes matrices acuosas la presencia de virus entéricos, incluyendo a los enterovirus (Tsai y col., 1994; Pusch y col., 2005), virus de la hepatitis A y E (Smith, 2001; Pusch y col., 2005), norovirus (Pusch y col., 2005), astrovirus (Espinosa y col., 2008), rotavirus (Pusch y col., 2005) y adenovirus serotipos 40/41 (Pusch y col., 2005) tanto en países desarrollados como en desarrollo, brindando evidencias de que la presencia de virus en agua es una problemática global.

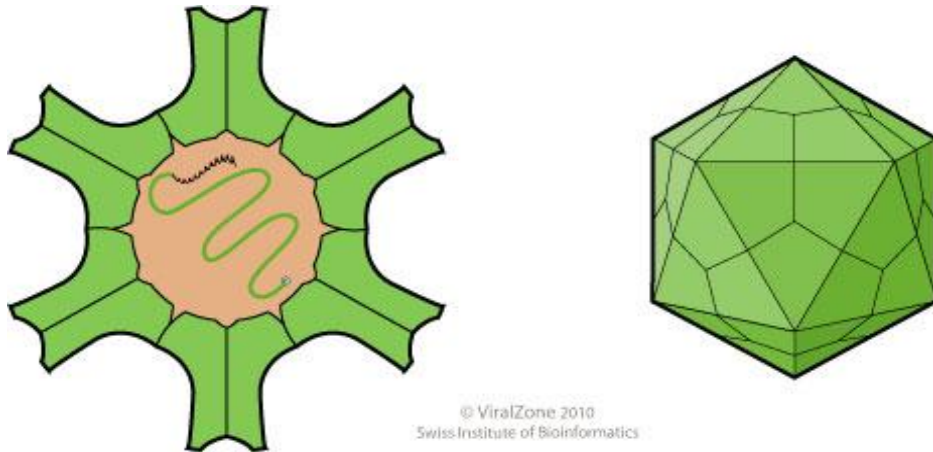
En nuestro país, la legislación vigente según especificaciones del Código Alimentario Argentino (CAA, artículo 982) y resolución de la Dirección de Agua y Saneamiento (DAS 608/93) establecen para el control de contaminación microbiana de las aguas para consumo humano y recreacionales, el uso de indicadores bacteriológicos tales como las coliformes totales (CT) y fecales (CF). Sin embargo recientes estudios han demostrado que el análisis de coliformes totales y/o coliformes fecales no siempre se correlaciona con la presencia o ausencia de virus en estas aguas, ya que se ha

reportado que los virus entéricos son más resistentes que las bacterias a la desinfección (Fomiga-Cruz y col., 2005; Pusch y col., 2005).

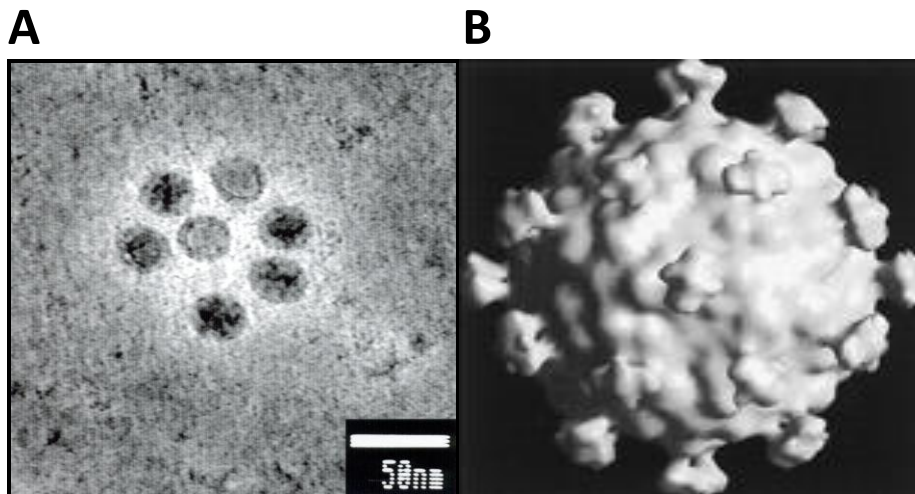
Entre los virus identificados en matrices acuosas, los astrovirus han sido investigados en muestras ambientales provenientes de ríos, lagos y lodo de diferentes partes del mundo como Europa, USA, Sudamérica y África (Gofti-Laroche y col., 2003; Le Cann y col., 2004; Meleg y col., 2006; Miagostovich y col., 2008). Estos virus se transmiten por contacto directo de persona a persona vía fecal-oral y también pueden transmitirse por la ingestión de agua de consumo o de uso recreacional contaminada. Son virus resistentes a las condiciones ambientales y pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo a temperatura ambiente (Cubitt, 1991; Glass y col., 1996). Asimismo los astrovirus se muestran como uno de los virus más resistente a los tratamientos físicos y químicos, manteniendo su infectividad a 60°C por 10 minutos y su resistencia al tratamiento de pH ácido (Kurtz y Lee, 1987; Risco y col., 1995). Aún con estas características particulares, son uno de los virus menos estudiados en aguas superficiales y recreacionales en el mundo (Pinto y col., 1996; Nadan y col., 2003; Espinosa y col., 2008) y no se dispone de datos para nuestro país.

Los astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes etiológicos de gastroenteritis viral en el año 1975 por Appleton y Higgins en un brote de diarrea y vómitos en una sala neonatal. En este estudio se observó al microscopio electrónico la presencia de partículas virales de morfología distinta a otros virus conocidos hasta el momento como rotavirus o calicivirus. El término astrovirus fue propuesto por Madeley y Cosgrove (1975) meses más tarde a su descubrimiento debido a que estos virus pequeños de 28 nm de diámetro, con estructura icosaédrica y sin envoltura (Figura 1 y 2 B), a veces presentan el aspecto característico de estrella al microscopio

electrónico. Dicha morfología determinó su nombre, procedente del griego astrón o estrella (Figura 2 A). Sin embargo, la identificación de los astrovirus necesita de una acertada interpretación del operador ya que generalmente solo el 10% de las partículas virales presentan el formato de una estrella de 5 o 6 puntas.



**Figura 1.** Esquema de la estructura de la partícula de astrovirus: virus desnudo, esférico con una cápside de 35nm con simetría icosaédrica T=3. (Figura modificada de Viral Zone 2010, Swiss Institute of Bioinformatics).



**Figura 2. A:** Partículas de astrovirus (del griego astrón: estrella) visualizadas por microscopía electrónica de transmisión (ME) de una muestra fecal de un niño con diagnóstico de diarrea aguda. Estos virus tienen una estructura interna que asemeja a una estrella de 5 o 6 puntas con un tamaño de 28 a 34 nm de diámetro según escala al pie de la microfotografía. **B:** Crio-electromicroscopía y reconstrucción tridimensional del astrovirus serotipo 1, el virus presenta una cápside central de 33 nm y 30 espículas con una longitud de 5 nm desde la cápside alcanzando un tamaño de diámetro total de 43 nm. Figura **A.** microfotografía tomada del trabajo “Constelación de astrovirus” (Giordano y col., 2000). **B.** (Fields Virology. 2007).

Aunque inicialmente no se los valoró como agentes etiológicos importantes de gastroenteritis aguda, en los últimos años han llegado a ser considerados como la segunda causa de gastroenteritis viral, principalmente en niños menores de 5 años de edad (Glass y col., 1996; Espul y col., 2004; Giordano y col., 2004; Espinosa y col., 2008; De Benedictis y col., 2011) y un agente frecuente de diarrea en adultos mayores e inmuno-comprometidos (Ferreira y col., 2010). La enfermedad es de resolución espontánea y corta duración, y la incidencia es máxima en época invernal. Dado que la enfermedad es de sintomatología leve, muchos casos no se notifican y es entonces posible que la carga de enfermedad por astrovirus en humanos esté subestimada. En la Tabla 1 se presenta estimativamente la frecuencia de síntomas derivados de la infección por astrovirus en humanos y el *score* de severidad de la enfermedad por astrovirus.

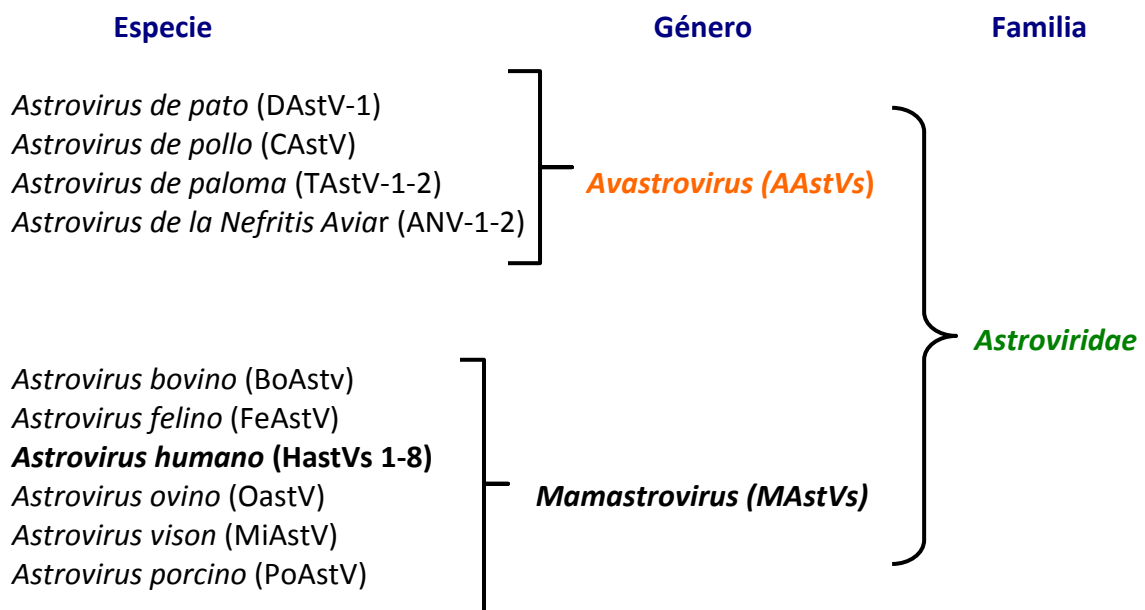
**Tabla 1. Síntomas clínicos de una infección HAstV <sup>a</sup>**

• Diarrea	72-100 %
• Duración de la diarrea	2-3 días
• Máximo numero de deposiciones en 24h	4
• Diarrea sanguinolenta	0 %
• Dolor abdominal	50 %
• Vómitos	20-70 %
• Fiebre	20-25 %
• Deshidratación leve	24-30 %
• Deshidratación grave	0-5 %
• Hospitalización	6 %
• Bronquiolitis	33 %
• Otitis	13 %
• Severidad <i>score</i> <sup>b</sup> (1-20)	5

<sup>a</sup>adaptado de Walter y Michell, 2003. <sup>b</sup> sistema de score sobre 20 puntos máxima severidad y 1 punto mínimo Ruuska y Vesikary, 1990.

Posterior a la descripción de los astrovirus en población humana, también fueron identificados en heces de animales domésticos. La primera descripción fue realizada en cabras y vacunos con diarrea por Snodgras y Gray en 1977 y Woode y Bridger en 1978. Al presente la lista de especies animales susceptibles a la infección por astrovirus está expandida e incluye animales domésticos y salvajes, especies aviarias y mamíferos en ambientes terrestres y acuáticos. En la década del '80 (Gough y col., 1984) en base a observaciones clínicas y virológicas se asoció la presencia de astrovirus con hepatitis fatal en patos. Esta fue la primera evidencia de localización extraintestinal de la infección.

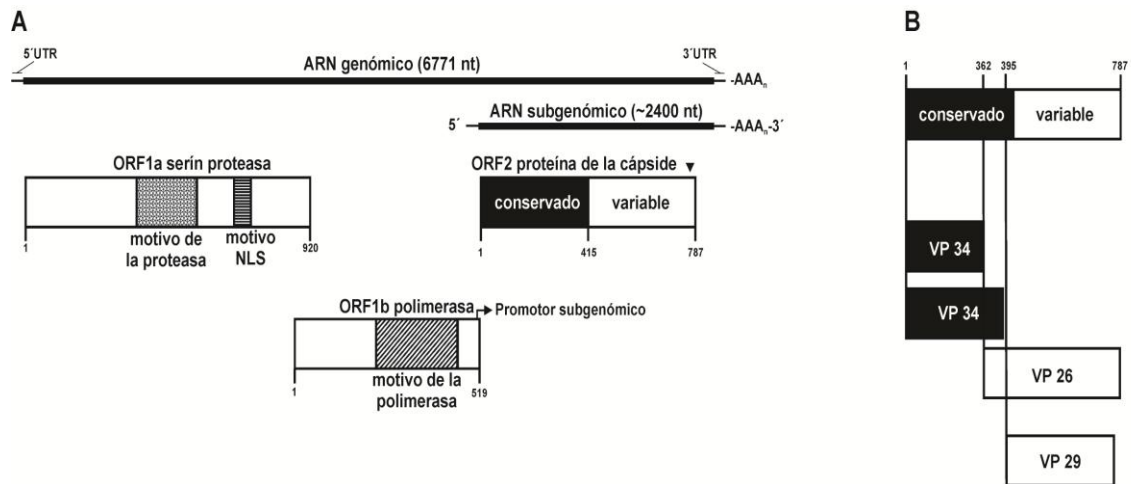
Recién en el año 1993 el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) estableció la familia *Astroviridae*. Esta familia, a su vez, establece para los astrovirus dos géneros: los *Mamastrovirus* (MAstVs) y *Avastrovirus* (AAstVs) que infectan especies de mamíferos y aves respectivamente (Méndez y col., 2007). El siguiente esquema resume los astrovirus oficialmente clasificados por el ICTV, (Figura 3).



**Figura 3.** Especies de astrovirus oficialmente clasificadas por el Comité Internacional de Taxonomía Viral.

A su vez, dentro del género *Mamastrovirus* los astrovirus que infectan humanos (específicos de especie) se clasifican en serotipos en base a homologías en secuencias parciales y totales de las regiones nucleotídicas de los marcos de lecturas abiertas llamados ORFs. En humanos se han establecidos 8 serotipos, existiendo una excelente correlación entre serotipo y genotipo. Se dispone de las secuencias parciales y totales de las 8 cepas prototipos de astrovirus en la base de datos genéticos del GenBank.

El genoma de los astrovirus esta constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 6,8 a 7,9 kb de longitud y poliadenilado en el extremo 3'. El ARN genómico tiene tres ORFs (Figura 4A). El ORF-1a está precedido por una secuencia no codificante (5' UTR) de una longitud entre 80 y 85 bases dependiendo del serotipo. Las secuencias ORF-1a y ORF1-b, localizadas en el extremo 5' codifican proteínas no estructurales, una serin-proteasa y una ARN polimerasa dependiente de ARN, respectivamente implicadas en la replicación viral. El ORF-2, localizado en el extremo 3', codifica una proteína de 87 kDa que por proteólisis da lugar al menos a tres proteínas estructurales componentes de la cápside del virus: VP26, VP29 y VP34 (Figura 4 B). Durante el ciclo replicativo viral se sintetizan moléculas de ARN subgenómico de polaridad positiva de aproximadamente 2,8 kb de longitud a partir del extremo 5' del ARN genómico de polaridad negativa. El ARN subgenómico es utilizado para la síntesis de las proteínas estructurales de la cápside (Monroe y col., 1991). En el extremo 3' del genoma hay una secuencia no codificante llamada 3'UTR y una cola de una treintena de adeninas.



**Figura 4.** Organización genómica y morfogénesis de la cepa prototipo Oxford de astrovirus humano genotipo1 (HAstV-1). **A:** Las líneas negras muestran la longitud en nucleótidos del ARN genómico y subgenómico. Los marcos de lectura abiertos denominados ORF se ilustran en formatos de rectángulos conteniendo los motivos de las proteínas. El ORF-1a para el motivo de la serin proteasa, indicando el relleno en círculos. El ORF-1b codifica para la polimerasa viral y el motivo está representado en su ubicación en relleno en líneas diagonales. El ORF-2 codifica para la proteína de la cápside, el primer tramo del segmento pintado de negro pertenece al motivo altamente conservado de la proteína de todos los miembros de la familia *Astroviridae* (aminoácidos del 1-415), el segundo tramo del segmento es el motivo altamente variable visible en blanco (aminoácidos 416-787) entre todos los serotipos de astrovirus. El triángulo invertido indica el sitio de clivaje de la caspasa, conservado entre todas las cepas de astrovirus. **B:** La proteína estructural de la cápside del HAstV-1 es inicialmente sintetizada como una proteína precursora de 87kD ensamblada en las partículas y clivada en cascada con tripsina en tres productos de 34, 29 y 26 kDa. Las proteínas se denominan (VP 34, 29 y 26). Krishna, 2005.

Respecto a los avances en desarrollos metodológicos para la detección de astrovirus, un paso muy importante que abrió puertas a un mejor conocimiento de los astrovirus como agentes etiológicos de diarrea, lo dieron Kurtz y Lee en 1981 cuando consiguieron aislar y propagar con éxito una cepa de astrovirus humano en células HEK (células embrionarias de riñón de origen humano). Este hecho permitió disponer de amplificadores virales para la inoculación de ratones y así la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales, que posibilitaron el desarrollo del diagnóstico de astrovirus por enzoinmunoensayo (EIA) (Herrmann y col., 1988; 1990). En la actualidad existe un kit comercial para diagnóstico de astrovirus manufacturado por la empresa DAKO, el "IDEIA™ Astrovirus EIA", equivalente al ensayo inmunoenzimático

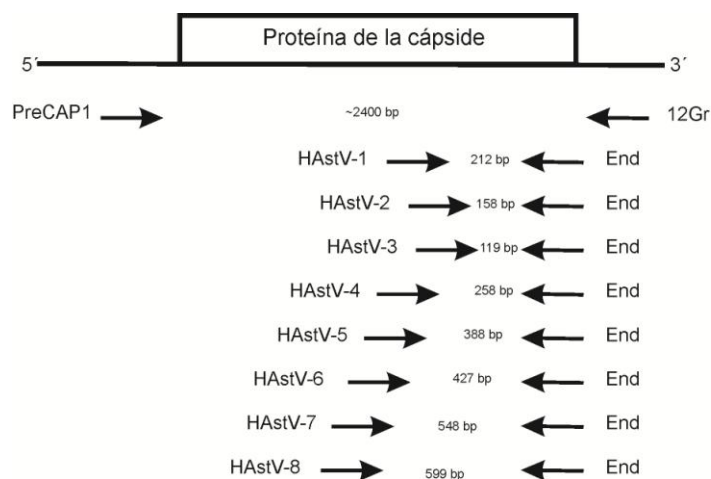
desarrollado por Herrmann y col. En general, ambos ensayos inmunoenzimáticos tienen una sensibilidad comparable y superior a la técnica microscópica, con un límite de sensibilidad del 91% y una especificidad del 98% comparada con la inmunomicroscopía electrónica (IME). Si bien estas metodologías pueden ser utilizadas para el diagnóstico clínico, no alcanzan la sensibilidad requerida para la detección del virus en muestras ambientales.

Con el desarrollo de la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) como método estandarizado en los laboratorios de investigación y diagnóstico para cualquier tipo de muestra, ya sea de origen fecal o ambiental, se han abierto las puertas para realizar estudios tanto epidemiológicos como filogenéticos en base al análisis de las secuencias de los genomas de los virus detectados. Las principales ventajas de la RT-PCR frente al resto de los métodos de detección son su elevada sensibilidad, la no limitación de reactivos como en el caso de los inmunoensayos y la posibilidad de genotipificar. Por otro lado, y al igual que la mayoría de los métodos de diagnóstico basados en la detección de proteínas o del genoma, presenta el inconveniente de no diferenciar entre partículas virales viables de las que no lo son, diferenciación importante en la epidemiología ambiental. Existen en la actualidad diferentes RT-PCR diseñadas para la detección de astrovirus y se las puede diferenciar en dos tipos: RT-PCR genéricas (detectan todos los genotipos) y RT-PCR específicas de genotipo. En cualquier caso, el tamaño del fragmento obtenido no supera los 700 pares de bases (pb), y por norma general se estima que el límite de detección de las distintas RT-PCR oscila entre las 10 a 100 partículas virales. Entre todos los pares de cebadores disponibles, se destaca el par Mon269/Mon270 descrito por Noel y col., (1995). La buena correlación entre la secuencia del amplicón y el serotipo del virus ha



hecho que esta RT-PCR sea utilizada en un gran número de estudios epidemiológicos como base para realizar la genotipificación molecular de las muestras (Palombo y Bishop, 1996; Gaggero y col., 1998; y Guix y col., 2002). Hoy en día se dispone en el GenBank de una gran cantidad de secuencias nucleotídicas de esta región (aproximadamente 1.600 secuencias).

A diferencia de las PCR genéricas, las RT-PCR específicas de genotipo se centran en amplificar zonas específicas de la región 3' del ORF2. La gran variabilidad de esta región permite genotipificar los virus en función del tamaño del amplicón obtenido sin necesidad de realizar secuenciación de ácidos nucleicos. Así, Sakamoto y col. (2000) diseñaron una RT-PCR *multiplex* anidada que se basa en la utilización de un cebador común a todos los genotipos y una mezcla de cebadores específicos de genotipo de manera que se puedan distinguir los diferentes genotipos de astrovirus en función del tamaño del amplicón obtenido (Figura 5).



**Figura 5.** Par de cebadores utilizados en la amplificación por RT-PCR. PreCAP 1 y 12Gr se utilizan para la retrotranscripción y primera PCR que amplifica la proteína de la cápside. Los cebadores HAstV-1, HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4, HAstV-5, HAstV-6, HAstV-7, HAstV-8 y End son empleados en la segunda PCR *multiplex* anidada. (Figura modificada de la publicación de Sakamoto y col., 2000).

La detección y caracterización de virus en aguas superficiales cobra aún mayor relevancia cuando es posible comparar los virus identificados en la matriz acuosa con virus que circulan en la población. Las aguas residuales urbanas son una excelente fuente para el estudio de virus excretados en una comunidad (individuos sintomáticos y asintomáticos) (Barril y col., 2010). En nuestro medio, las aguas residuales de la planta de tratamiento de Bajo Grande que llegan de la Ciudad de Córdoba, recogen las excretas de aproximadamente el 50% de la población urbana-periurbana (Censo Provincial 2010), ofreciendo una fuente de muestreo representativa de virus que circulan en nuestro medio.

Entre los cursos de agua que atraviesan zonas urbanas y periurbanas, el río Suquía ha tomado en los últimos años una marcada relevancia debido a la promoción para el uso de sus riberas como espacio recreacional. Además hay un creciente desarrollo inmobiliario ubicado próximo a la costanera del río, lo que estimula al uso del espacio verde. Finalmente el río es utilizado muy frecuentemente para pesca y deporte acuático por la población de bajos recursos económicos, implicando un íntimo contacto entre las aguas del río y la población expuesta.

La cuenca hídrica del río Suquía tiene su nacimiento en la Quebrada de Bamba, Dique San Roque, atravesando en su recorrido la totalidad de la Ciudad de Córdoba en un sentido direccional oeste-este. Por otra parte, el río Suquía desde hace décadas sufre una contaminación por factores antrópicos, profundizando su fragilidad en los últimos años debido a frecuentes descargas clandestinas de residuos sólidos urbanos-periurbanos y aguas residuales sin tratar, además de recibir los afluentes tratados de las plantas municipales de tratamiento de Inaudi y Bajo Grande. Esta condición, hace que las

aguas del río Suquía constituyan una posible fuente de infección a población expuesta y de diseminación de astrovirus a la comunidad.

El propósito de este estudio es monitorear la presencia de astrovirus humano (HAstV) en aguas del río Suquía. Con este fin se realizó un muestreo estacional durante el año 2010, recolectando muestras de aguas desde el nacimiento del río hasta que abandona el Gran Córdoba. Paralelamente se procesaron muestras cloacales mensuales de la planta urbana de tratamiento de Bajo Grande para comparar los genotipos de astrovirus presentes en aguas del río con los genotipos de astrovirus que circulan en la población general.

A los fines de obtener una evidencia indirecta de que la detección de genoma de astrovirus se correspondería con astrovirus viable (infectivo), se determinó en el total de las muestras de agua de río y dique la presencia de enterovirus viable. Se eligió este sistema viral porque los enterovirus incluyen un amplio grupo viral con alta capacidad para replicar en células permisivas.

Los resultados de esta investigación proveen información acerca de la integración de las aguas del río Suquía a la historia natural de la circulación de astrovirus en nuestro medio, señalando que las aguas son fuente potencial de transmisión hídrica viral a la población expuesta. Este es el primer estudio ambiental en nuestro país que demuestra la presencia de astrovirus humanos en muestras de río y cloacas.

## Objetivos

### ***Objetivos generales***

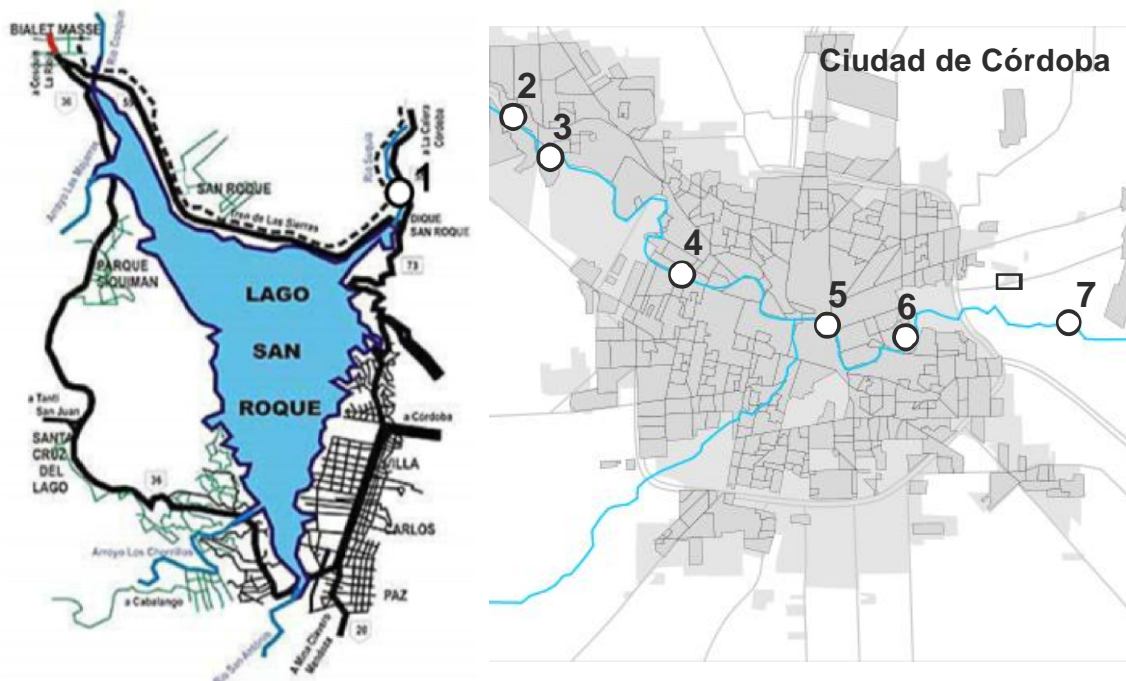
- ✚ Evaluar las aguas del río Suquía como potencial fuente de transmisión de astrovirus humano.
- ✚ Conocer si el río Suquía está integrado a la historia natural de circulación de astrovirus en nuestro medio.

### ***Objetivos específicos***

- ✚ Concentrar virus a partir de muestras de aguas residuales y superficiales colectadas en la planta de Bajo Grande y río Suquía respectivamente.
- ✚ Determinar la frecuencia de detección genómica de astrovirus humanos y enterovirus viable en aguas del río y aguas residuales crudas.
- ✚ Identificar los genotipos de astrovirus humano circulantes en aguas residuales y aguas del río Suquía de la Ciudad de Córdoba.
- ✚ Realizar un análisis comparativo entre el perfil molecular y secuencia nucleotídica de genotipos de astrovirus detectados en el río Suquía y los de circulación poblacional en las aguas residuales de la planta urbana de Bajo Grande.
- ✚ Caracterizar el perfil estacional de circulación de astrovirus humanos en el río y compararlo con el de circulación poblacional (aguas residuales).
- ✚ Elaborar mapas que reflejen la contaminación estacional con astrovirus en el río Suquía.
- ✚ Estudiar la dinámica estacional y anual de las variables físico-químicas y bacteriológicas en las aguas del río Suquía.
- ✚ Realizar un análisis comparativo entre presencia de bacterias (coliformes totales y fecales) y astrovirus en aguas del río Suquía.

## Materiales y Métodos

**Muestreo del río Suquia:** Se realizó para el análisis físico-químico, bacteriológico y virológico de las aguas del río, en 28 muestras recolectadas durante el año 2010 en las cuatro estaciones del año, tomando como momento muestral entre los 40-50 días de iniciada la estación (punto muestral medio estacional), en 7 puntos del río Suquia: 1. Naciente del río, Quebrada de Bamba, Dique San Roque; 2. Villa Warcalde; 3. Vado San Antonio ; 4. Puente Zipoli; 5. Puente Centenario; 6. Vado Sargento Cabral y 7. Cantera San José. El muestreo de aguas de río fue sub-superficial, recolectando las muestras a una profundidad de 0,20 m de la superficie del río. Los puntos a muestrear fueron seleccionados por considerarse representativos de áreas geográficas de la Ciudad de Córdoba donde más frecuentemente concurre la población que accede al río. Los puntos muestrales son mostrados en la Figura 6.



**Figura 6.** Sitios de muestreo: 1. Dique San Roque; 2. Villa Warcalde; 3. Vado San Antonio; 4. Puente Zipoli; 5. Puente Centenario; 6. Vado Sargento Cabral; 7. Cantera San José. □ Planta urbana Bajo Grande.

**Muestreo de aguas residuales:** Se analizaron para la detección de astrovirus y enterovirus viable, 12 muestras de afluentes cloacales obtenidas mensualmente durante el año 2010 (Enero-Diciembre) los segundos martes de cada mes (punto muestral mensual) y recolectadas del caño maestro que llega a la planta urbana de tratamiento de residuos cloacales de Bajo Grande, Ciudad de Córdoba señalada en el mapa presentado en la Figura 6.

En ambos muestreos se recolectaron 1.500 ml de agua por muestra y se conservaron a -40°C hasta su procesamiento.

### ***Concentración de virus a partir de aguas residuales y agua de río***

Las aguas cloacales y aguas del río Suquía colectadas se concentraron 100 veces (100X) por centrifugación y precipitación con polietilenglicol (PEG-6000), siguiendo el procedimiento de Lewis y Metcalf, (1988). La metodología empleada se basa en el proceso de centrifugación y precipitación con PEG-6000 método recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2003). Brevemente, las aguas se clarificaron por centrifugación a 4.000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron a 4°C para su posterior uso y los precipitados se eluyeron con una solución de extracto de carne al 3% y NaNO<sub>3</sub> 2M (pH 5,5) en una proporción 3:1 respecto al peso del precipitado obtenido. Se eluyeron las muestras durante 1 hora a 4°C con agitación continua a 180 rpm. Luego del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 8.300 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con el primer sobrenadante del paso de clarificación y los virus presentes en la mezcla se precipitaron mediante el agregado de PEG 10% (peso/volumen) y NaCl 2% (peso/volumen), incubando las muestras a 4° C durante al menos 2 horas con agitación suave (120 rpm). Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 8.300 rpm

durante 25 minutos a 4°C. Los precipitados se resuspendieron en tampón balanceado de fosfatos (PBS) pH 7,2 (1/100 volumen/volumen). Se ajustó el pH a 8,0 y se eluyeron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 8300 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes resultantes (concentrados 100X) se almacenaron a -80°C. En ensayos previos realizados en nuestro laboratorio el método de concentración por PEG demostró una eficiencia de recuperación viral aproximada del 25%, utilizando como virus sustituto al bacteriófago PP7 (Poma y col., 2013).

### ***Extracción de ácidos nucleicos virales***

***QIAamp Viral RNA Mini Kit:*** Se realizó la extracción del ARN de las muestras de agua a partir de 140µl del concentrado viral mediante el kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos extraídos fueron eluidos en un volumen final de 30µl.

### ***RT-PCR multiplex anidada para la detección de astrovirus en ecosistemas acuáticos. Síntesis de ADN complementario***

Tres µl del volumen final del ARN eluido de la columna de extracción de ácidos nucleicos (30ul) se emplearon como molde para producir ADN complementario (ADNc) del ORF-2 siguiendo el procedimiento descrito por Sakamoto y col., (2000). La síntesis de ADNc se realizó utilizando primers específicos para astrovirus humano.

Brevemente, el ARN viral se mezcló con el par de primers PreCap1 y 12Gr (1 uM cada uno; Tabla 2) resultando en un volumen final de 5 µl. La mezcla se calentó durante 5 minutos a 97°C y se enfrió en hielo durante 5 minutos. Luego se agregó a los tubos conteniendo el ARN desnaturalizado y los primers, 5 µl de la mezcla de reacción para la transcripción reversa, de manera que las concentraciones finales fueron las siguientes:

1 mM de cada dNTP, 6% de DMSO, 1,5 U de la transcriptasa reversa AMV (Invitrogen, California, EEUU), 2 mM de DTT, y 0,5X de buffer de la enzima. La retro-transcripción tuvo un ciclado de 2 horas a 45°C y una inactivación de la enzima durante 15 minutos a 85°C.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Posteriormente, 1 µl de ADNc se agregó a 9 µl de una pre-mezcla de reacción para PCR, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 1 µM de cada primer PreCap1 y 12Gr (Tabla 2), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, California, EEUU) y 1X de buffer de la enzima, obteniendo un volumen final de reacción de 10 µl. La solución obtenida se sometió al siguiente perfil de ciclado: desnaturalización a 94°C, 1 minuto; hibridación a 48°C, 2 minutos; y extensión a 72°C, 3 minutos por 35 ciclos y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. El tamaño del producto de reacción que se esperó obtener fue de 2.473 pb. Se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de Astrovirus OxAsT1 (serotipo 1) y OxAST2 (serotipo 2), cedida gentilmente por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, EEUU).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la detección del ORF-2 de astrovirus humano.** Los primers PreCap1 y 12Gr fueron diseñados por Sakamoto y col., 2000.

<b>Cebadores (Polaridad)</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Correspondencia con nucleótidos de ORF-2</b>
PreCap1 (+)	GGA CTG CAA AGC AGC TTC CTG	62-82
12GR (-)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GC	2454-2473



### ***Reacción de PCR multiplex anidada para la amplificación de regiones variables específicas de genotipo del ORF-2 de la proteína de la cápside de astrovirus humano***

Los productos de la primera reacción de PCR para el ORF-2 se llevaron a una segunda ronda de amplificación con mezclas de cebadores internos específicos para secuencias de genotipos HAstV-1-8 de humanos (Sakamoto y col., 2000). Para la amplificación de secuencias de los genotipos HAstV-1-8 se utilizaron dos mezclas de reacción conteniendo los siguientes cebadores tipo-específicos. A) HAstV-1, HAstV-3, HAstV-5, HAstV-7; y B) HAstV-2, HAstV-4, HAstV-6, HAstV-8; junto con el primer interno End (*Tabla 3*). Estas combinaciones de cebadores amplifican regiones variables del ORF-2 de la proteína de la cápside. La mezcla de reacción consistió en 1  $\mu$ l de molde (ORF-2), 1  $\mu$ M de cada primer tipo-específico, 1  $\mu$ M del primer End, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPs, 0,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, California, EEUU) y el buffer provisto por el fabricante, en un volumen final de 10  $\mu$ l. Las condiciones de ciclado para la PCR *multiplex* anidada fueron las mismas que las descritas para la primera ronda de amplificación. Los productos obtenidos por la PCR son resueltos en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (Laemmli, 1970) seguido de una tinción argéntica (Herring y col., 1982).

Los tamaños de los productos de reacción que se esperaron obtener son los siguientes: 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.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genotipos G de astrovirus humanos.** Los primers HAstV1-8 fueron diseñados por Sakamoto y col., 2000.

Cebadores (Polaridad)	Secuencia(5'-3')	Posición <sup>a</sup>	Genotipo	Tamaño del fragmento
HAstV-1 (+)	AAC CAA GGA ATG ACA ATG AC	2166-2185	HAstV-1	212 pb con End
HAstV-2 (+)	ACC TGC GCT GAG AAA CTG	2247-2185	HAstV-2	158 pb con End
HAstV-3 (+)	CTG CTT GCA TCT GGT CTT TCA	2283-2303	HAstV-3	119 pb con End
HAstV-4 (+)	TGA TGA TGA AGA CTC TAA TAC	2071-2091	HAstV-4	258 pb con End
HAstV-5 (+)	TAG TAA CTT ATG ATA GCC	2014-2031	HAstV-5	388 pb con End
HAstV-6 (+)	TGG CCA CCC TTG TTC CTC AGA	1951-1971	HAstV-6	427 pb con End
HAstV-7 (+)	CTA GAC AAC AAC AAC CCG	1842-1859	HAstV-7	548 pb con End
HAstV-8 (+)	GGT AAG TGG TAC CTG CTA ACT AG	1753-1775	HAstV-8	599 pb con End
End (-)	TCC TAC TCG GCG TGG CCG C	2377-2359 <sup>b</sup>		

**a.** Posición de marcha nucleotídica en el extremo 5' de la región de la cápside de cada genotipo. **b.** El cebador End está calculado en base a la región 5' terminal de la región de la cápside del HAstV-1.

### **Secuenciamiento de los productos genómicos obtenidos por PCR**

Los amplicones fueron purificados y secuenciados en el laboratorio de servicios Macrogen de Corea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) utilizando un equipo Applied Biosystems modelo 377 y el método de terminación de cadena por dideoxinucleótido y el *kit Prism Ready Big Dye Terminador Cycle Sequencing* (Macrogen, Seúl, Corea). Para el secuenciamiento se utilizaron los cebadores específicos de genotipo HAstV 1-8 junto con el primer interno End. Cada producto de amplificación fue secuenciado por duplicado y en ambos sentidos, de tal forma que cada secuencia nucleotídica asignada correspondió al consenso de cuatro alineamientos de secuencia.

### ***Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas***

Se realizó la edición, alineación y comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas utilizando el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.5.2. Las secuencias consenso obtenidas se compararon 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 X. Las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas fueron calculadas utilizando el software MEGA 5.0, aplicando como modelo de sustitución nucleotídica el método Kimura-2- $\alpha$  parámetros. La significancia estadística de las filogenias inferidas se estimó usando el método *Neighbor-Joining* con un *bootstrap* de 1.000 pseudorepeticiones.

### ***Detección de enterovirus humanos***

Los concentrados virales obtenidos de las muestras de agua fueron inoculados en células Hep-2 y/o RD para la detección de enterovirus viable. Los aislados fueron posteriormente detectados por inmunofluorescencia indirecta con un panel de anticuerpos para la detección de enterovirus no-polio (Mueller y col., 2009).

### ***Análisis de variables físico-químicas y bacteriológicas***

***Físico-químicas:*** En los puntos de muestreo del río Suquía y del Dique San Roque (punto de nacimiento del río Suquía) se midieron los siguientes parámetros *in-situ*: temperatura, pH y oxígeno disuelto. Así mismo en las muestras de agua recolectadas se determinaron en el laboratorio: sólidos suspendidos, demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), demanda química de oxígeno, fracciones de nitrógeno inorgánico disuelto: (amonio [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], nitrito [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] y nitrato [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) y ortofosfato. Las

determinaciones fueron tercerizadas al laboratorio municipal de agua de la planta urbana Bajo Grande.

**Bacteriológicas:** Para la determinación de coliformes totales y termotolerantes se recolectaron 100 ml de cada muestra en botellas estériles y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Luego se sembraron en caldo MacConkey incubado 48 h, a 37°C y 44°C respectivamente y fueron cuantificadas aplicando el método del número más probable (NMP). Los análisis bacteriológicos fueron realizados en el laboratorio municipal de aguas de la planta de Bajo Grande.

### ***Tratamiento de datos***

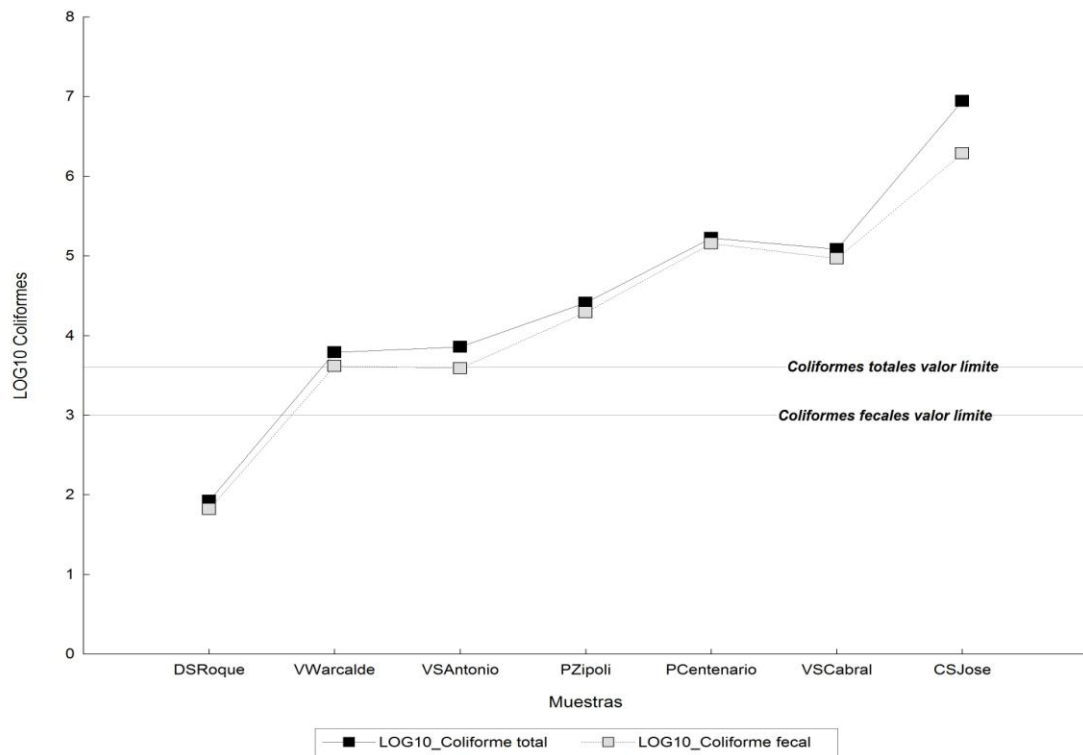
Los sitios de muestreo fueron georreferenciados. Se construyó luego una base de datos considerando los diferentes sitios de muestreo y las variables estudiadas. Se realizó un análisis estadístico descriptivo e inferencial. Para el análisis descriptivo, los valores de carga bacteriana expresados como NMP fueron transformados en  $\text{Log}_{10}$  a fin de construir perfiles multivariados. También se utilizaron gráficos de sectores. Para el análisis inferencial se utilizaron el Test de Wilcoxon y el Análisis de la Varianza no Paramétrico (Kruskal-Wallis), mientras que para los categorizados se utilizó el  $\chi^2$  de Pearson. Se utilizó el análisis de conglomerados (cluster) como método multivariante y se graficaron los dendogramas. El criterio adoptado para las diferencias entre los clusters fue la distancia de Mahalanobis. Se aceptó como nivel de significación  $\alpha$  el 5%. Se utilizó el programa Infostat 2013p (Di Rienzo y col., 2014).

## Resultados y Discusión

### ***Análisis de la calidad físico-química y bacteriológica del agua del río Suquía***

El río Suquía muestra un importante deterioro en la calidad físico-química y bacteriológica del agua a medida que avanza en su recorrido por la Ciudad de Córdoba, observándose un incremento de la demanda química de oxígeno, demanda biológica de oxígeno, nitritos, nitratos, amonios, ortofosfatos, coliformes totales y termotolerantes, también denominados fecales. En la figura 7 se observan los perfiles multivariados de coliformes totales y termotolerantes por sitio de monitoreo (valores expresados en  $\log_{10}$ ). La reducción de la calidad bacteriológica del agua presenta, en un análisis global, valores con diferencias estadísticamente significativas entre puntos de muestreo (coliformes totales  $p= 0,0017$  y coliformes fecales  $p=0,0037$  prueba Kruskal Wallis). El análisis comparativo entre los puntos de monitoreo logra agrupar similitudes y diferencias en la carga bacteriana (coliformes totales y fecales) a lo largo del recorrido del río. Los puntos de monitoreo 1-4 muestran valores de medias aritméticas significativamente menores a los puntos 5-7 en las dos variables consideradas. El aumento de carga bacteriana en el último tercio de recorrido del río estudiado (puntos 5-7), puede explicarse por el impacto que sufren las aguas por volcamiento de residuos cloacales tratados. Así es de destacar dos puntos de monitoreo, el primero es el sitio 5 de muestreo (Puente Centenario) donde el río Suquía recibe el impacto de arroyo La Cañada, en el que se vierten las aguas cloacales tratadas de la planta urbana sur de Inaudi. El otro, el sitio 7 de muestreo (Gran Córdoba, Cantera San José), es cuando el río abandona la ciudad, ubicado a una

distancia aproximada de 2 km posteriores a la descarga de los efluentes tratados de la planta urbana de Bajo Grande.



**Figura 7.** Coliformes totales y coliformes fecales en los siete puntos monitoreados a lo largo del río Suquia. Puntos Dique San Roque, Villa Warcalde y Vado San Antonio: primer tercio de recorrido del río (36 Km de recorrido aprox.), Puente Zipoli: tercio medio (7,4 Km de recorrido aprox.), Puente Centenario, Vado Sargento Cabral y Cantera San José: tercio final de estudio (18 Km de recorrido).

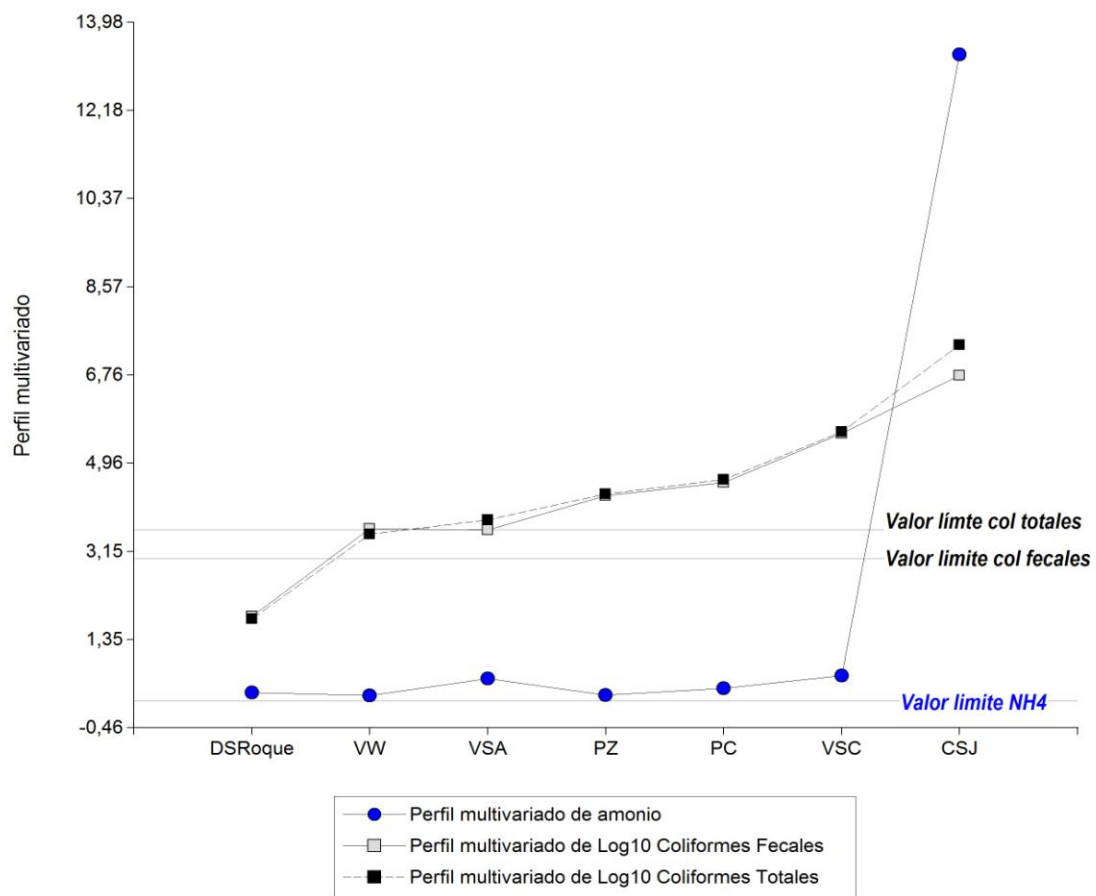
En el mundo no hay un consenso a cerca de la carga bacteriana máxima aceptable para aguas recreacionales. La guía americana para uso de aguas recreacionales (Clesceri y col., Ed., 1998) indica como límite en aguas superficiales valores de NMP de coliformes totales los que no excedan de 5.000 CT/100 ml de coliformes totales y de 1.000 CF/100 ml para coliformes fecales, como limite en aguas superficiales. Superados estos valores se considera que el agua puede contener microorganismos patógenos. Debido a que actualmente no se cuenta en nuestro país con información

epidemiológica que permita establecer correlaciones entre densidades de microorganismos patógenos, microorganismos indicadores y efectos sobre la salud de individuos que utilizan el agua con fines recreativos, se toman como niveles guía los establecidos como estándares internacionales por la mencionada guía americana. Es de destacar que el río Suquia en su nacimiento (punto de monitoreo Dique San Roque) refleja cargas bacterianas de coliformes totales y fecales por debajo del límite máximo aceptable para aguas superficiales. Sin embargo a partir del punto de monitoreo 2 (sitio de muestreo, Villa Warcalde) esta carga bacteriana empieza a exceder los límites delimitados por el estándar americano. Esto refleja una contaminación bacteriológica difusa que va creciendo a lo largo del recorrido del río, antes de alcanzar el punto 5 de muestreo, a partir del cual se identifican descargas puntuales de residuos cloacales tratados o insuficientemente tratados, que muy probablemente se suman a otros puntos difusos de contaminación fecal.

Miagostovich y col., reportaron en 2008 resultados similares en ríos y arroyos de Manaus, Brasil, detectando la presencia de coliformes fecales en frecuencias altas que exceden al NMP de 1.000/ml, demostrando un incremento leve durante la estación lluviosa. Lo expresado refleja que la contaminación bacteriana en aguas de uso recreacional es una problemática generalizada a otras regiones del mundo, ligada directamente a un problema de saneamiento ambiental y específicamente al tratamiento y posterior eliminación de aguas residuales.

El deterioro de la calidad físico-química del agua del río Suquia se refleja en la Figura 8, tomando como variable representativa al amonio. La selección de esta variable físico-química responde a que el amonio es un marcador de contaminación orgánica de aguas. El amonio se produce en los procesos de desaminación y nitrificación que sufre

la materia orgánica tras la contaminación fecal con la propia flora microbiana de las heces, pero también de volcamientos o arrastre a las aguas de fertilizantes orgánicos o aguas residuales de composteras. De esta manera, se considera que el amonio constituye un indicador químico indirecto de contaminación fecal. El valor límite aceptado de amonio para agua ambiente es 0,1 mg/litro (Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina, 2004).



**Figura 8.** Análisis del amonio en los distintos sitios de monitoreo en el río Suquía: Dique San Roque, Villa Warcalde, Vado San Antonio, Puente Zipoli, Puente Centenario, Vado Sargento Cabral y Cantera San José.

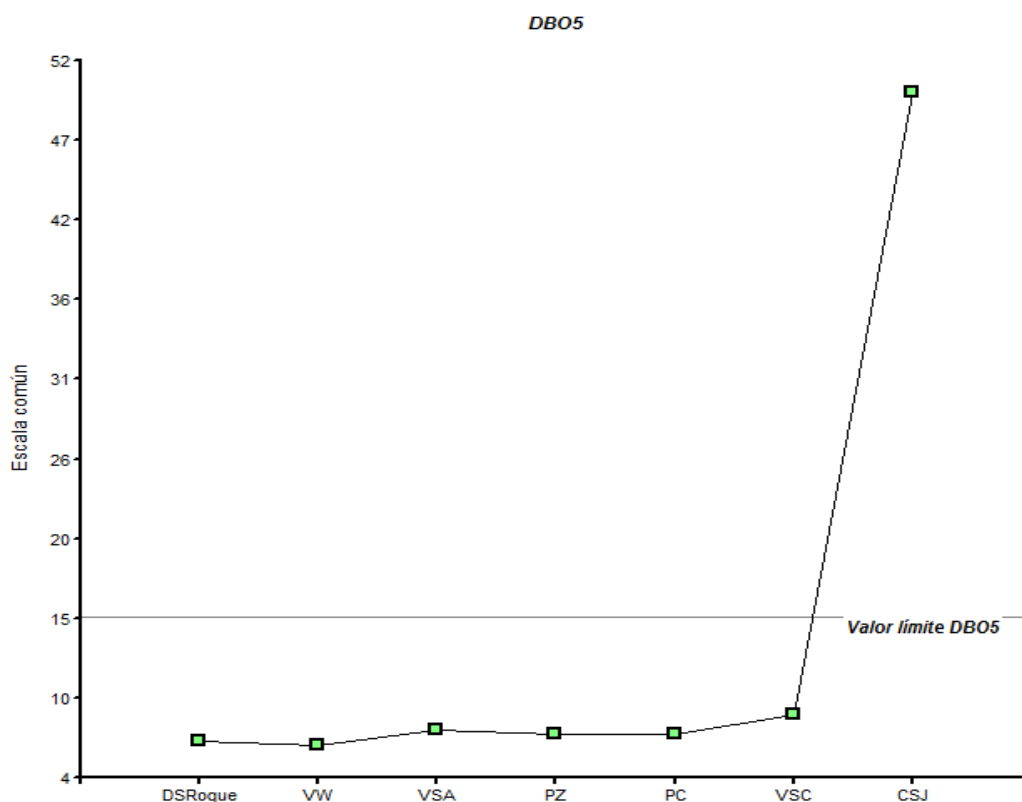
La determinación cuantitativa de amonio, a medida que el río cruza la ciudad, presenta diferencias estadísticas significativas entre puntos de monitoreo, ( $p= 0,01$  prueba



Kruskal Wallis). Los puntos de monitoreo 1-5 tienen medias significativamente menores a los puntos 6 y 7 en la variable considerada. En el amonio se observa una tendencia similar de aumento progresivo que el observado para las coliformes en los puntos críticos de polución en el río (puntos de muestreo 6-7), o sea que la variable amonio acompaña a la dinámica de las de coliformes totales y fecales.

Otra de las variables estudiada es la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ), que se lo define como un parámetro que mide la cantidad de materia disponible para ser consumida u oxidada por medios biológicos que contiene una muestra líquida, disuelta o en suspensión. Se utiliza para medir el grado de contaminación microbiológica; normalmente se mide transcurridos cinco días de reacción ( $DBO_5$ ) y se expresa en miligramos de oxígeno diatómico por litro ( $mg\ O_2/l$ ). El método de ensayo se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se han inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos. La curva de consumo de oxígeno suele ser al principio débil y después se eleva rápidamente hasta un máximo sostenido, bajo la acción de la fase logarítmica de crecimiento de los microorganismos. Es un método aplicable en aguas continentales (ríos, lagos o acuíferos), aguas negras, aguas pluviales o agua de cualquier otra procedencia que pueda contener una cantidad apreciable de materia orgánica. La determinación en los puntos de monitoreo para la variable  $DBO_5$  no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos de monitoreo 1-6 ( $p= 0,09$ , prueba Kruskal Wallis) los que a su vez mostraron valores de  $DBO_5$  por debajo de los valores límites aceptados para aguas superficiales (Figura 9) (ACUMAR autoridad de la cuenca Matanza-Riachuelo Resolución N° 03/2009, valor establecido asociado al uso IV, agua apta para actividades recreativas menor a

15mg/litro). Es de destacar que el punto 7 (cantera San José), donde descargan las aguas residuales tratadas de la planta urbana de Bajo Grande, muestra un valor de DBO<sub>5</sub> muy por encima del límite aceptado (Figura 9). Si bien este sitio refleja el impacto de la descarga de aguas residuales pos-tratamiento, la DBO<sub>5</sub> pareciera ser un indicador físico-químico menos sensible que el amonio y las bacterias de flora intestinal, ya que no identifica la descarga puntual de la planta urbana de Inaudi, ni descargas fecales difusas a lo largo del río.



**Figura 9.** Análisis del DBO<sub>5</sub> en los distintos sitios de monitoreo en el río Suquía: Dique San Roque, Villa Warcalde, Vado San Antonio, Puente Zipoli, Puente Centenario, Vado Sargento Cabral y Cantera San José.

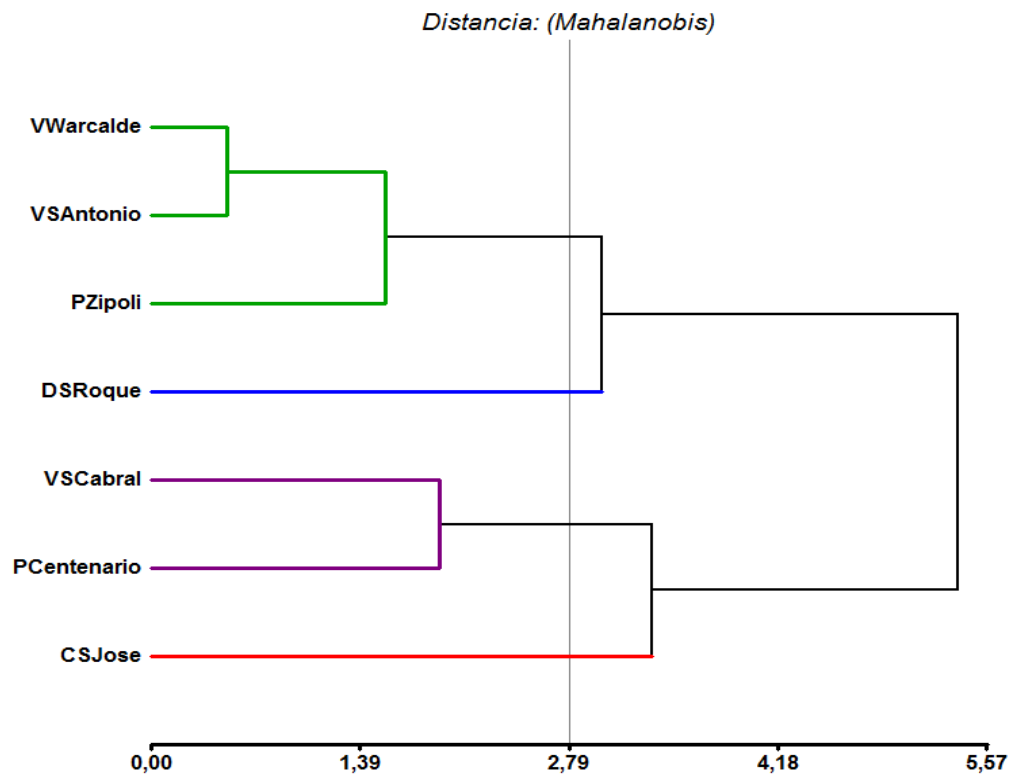
El estudio de la dinámica de las variables coliformes totales y fecales, amonio y DBO<sub>5</sub> sugiere la influencia antropogénica desde el punto de vista de la afectación por la presencia de centros urbanos densamente poblados e industrializados, los que por sus

características producen desechos sólidos y líquidos que impactaron en el curso del río Suquía.

A fin de maximizar las diferencias entre los distintos sitios de muestreo así también como de discriminar sitios de monitoreo con similitud en la calidad físico-química y bacteriológica del agua del río, se realizó un análisis por conglomerados (clusters). Se seleccionaron como variables físico-químicas: demanda biológica de oxígeno y amonio total (que reflejan contaminación orgánica); y como variables bacteriológicas: coliformes totales y termotolerantes. Estas variables fueron sujetas a análisis por cluster, resultando un dendograma que agrupa los puntos de monitoreo en 4 cluster distintos (Figura 10). El criterio adoptado para discriminar clusters se basó en la distancia de Mahalanobis, que establece distancia entre los grupos conformados en el análisis de clusters. La distancia de Mahalanobis presenta dos propiedades ventajosas respecto a la distancias euclídeas (ordinaria y normalizada). Por un lado es invariante ante los cambios de escala y no depende por lo tanto de las unidades de medida. Por otro lado considera las correlaciones entre las variables y por lo tanto, corrige el efecto de la redundancia.

El primer cluster agrupó solo al punto Dique San Roque; el segundo agrupó a los puntos Villa Warcalde, Vado San Antonio y Puente Zipoli, el tercero abarcó los puntos Puente Centenario y Vado Sargento Cabral y el cuarto el punto Cantera San José. El resultado permitió agrupar sitios de muestreo por similitud en calidad de agua en función de las variables analizadas y distinguir sitios de muestreo con calidad de agua diferente. Estos resultados son muy útiles para diseñar una estrategia de muestreo sostenible para calidad físico-química y bacteriológica en aguas del río Suquía, seleccionando por cluster sólo un punto de muestreo. Así, en un diseño de muestreo

es válido y representativo seleccionar al Dique San Roque, a un sitio entre Villa Warcalde, Puente San Antonio y Puente Zipoli, a un sitio entre Puente Centenario y Vado Sgto. Cabral, y a la Cantera San José (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis por cluster de los 7 sitios de monitoreo basado en las variables físico-químicas y bacteriológicas del río Suquía. Referencia: Cada cluster esta señalado por un color. Distancia de Mahalanobis= 2,79 define el agrupamiento de los sitios de muestreo en 4 clusters.

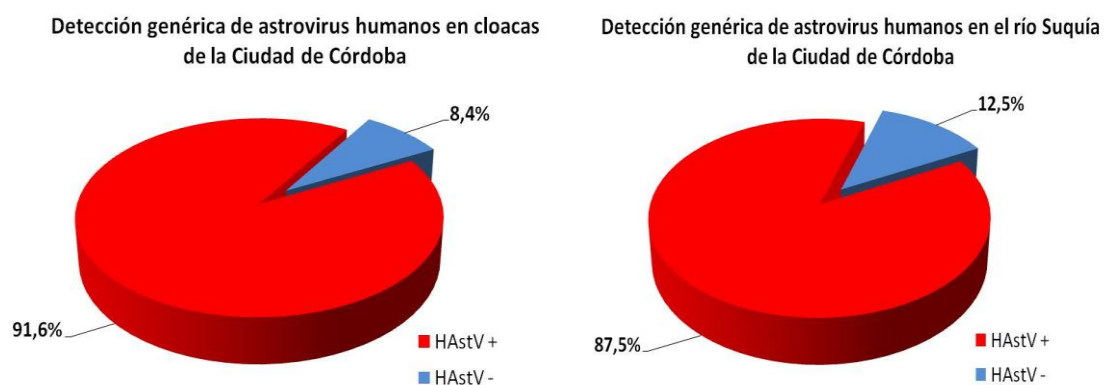
Si bien el diseño de muestreo por clusters propuesto es muy útil a los fines de evaluar calidad microbiológica de aguas superficiales según estándares nacionales e internacionales, no refleja la calidad microbiológica integral del agua. Esto se debe a que no está contemplada la detección de virus ni parásitos asociados a enfermedades en población expuesta. Con la intención de integrar resultados de las variables físico-químicas y bacteriológicas a la detección de virus en agua, se estudió la presencia/ausencia de astrovirus y de entero virus viable en función del agrupamiento, seleccionando un punto por conglomerado para la detección de genoma de astrovirus

y enterovirus viable. Los puntos seleccionados para el estudio de contaminación viral de las aguas fueron: Dique San Roque, Villa Warcalde, Vado Sargento Cabral y Cantera San José.

### ***Detección de astrovirus humanos (HAstVs) en aguas del río Suquía y aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba***

Durante este estudio se analizaron 16 muestras de agua del río Suquía seleccionando un sitio de monitoreo por cluster (4 muestras por sitio de monitoreo: Dique San Roque, Villa Warcalde, Vado Sargento Cabral y Cantera San José, con una muestra por estación del año), y 12 muestras cloacales obtenidas mensualmente del caño maestro de entrada a la planta urbana de tratamiento de Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba. Todas las muestras fueron recolectadas durante el año 2010.

El genoma de astrovirus humanos (HAstVs) fue detectado por la técnica de RT-PCR en 14 de las 16 muestras del río Suquía (87,5%) y en 11 de las 12 muestras de entrada a la planta cloacal urbana de Bajo Grande (91,7%) (Figura 11).



**Figura 11:** Detección genérica de astrovirus humanos (HAstVs) en cloacas y en el río Suquía durante el año 2010 en la Ciudad de Córdoba.

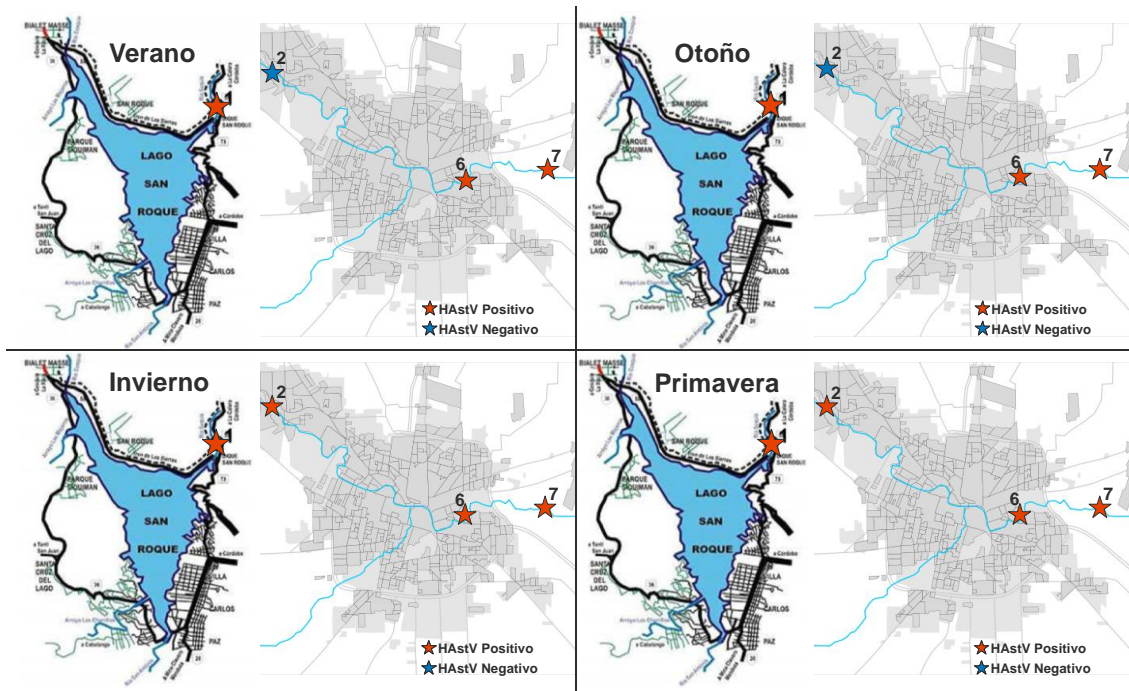
En la Tabla 4 se presenta la detección genérica de astrovirus por punto de muestreo en el río Suquía y en aguas residuales de la Ciudad de Córdoba según el mes del año 2010.

**Tabla 4. Detección genérica de astrovirus humanos (HAstVs).** Muestras obtenidas de los puntos río Suquía y entrada de la planta urbana de tratamiento de residuos cloacales de Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba en el periodo Enero–Diciembre 2010.

Punto de muestreo	Mes/año	Sitio de la muestra	Estación	RT-PCR <sup>a</sup>
<i>Río Suquía</i>	2/2010	Dique San Roque	Verano	+
	2/2010	Villa Warcalde	Verano	-
	2/2010	Vado Sargento Cabral	Verano	+
	2/2010	Cantera San José	Verano	+
	5/2010	Dique San Roque	Otoño	+
	5/2010	Villa Warcalde	Otoño	-
	5/2010	Vado Sargento Cabral	Otoño	+
	5/2010	Cantera San José	Otoño	+
	8/2010	Dique San Roque	Invierno	+
	8/2010	Villa Warcalde	Invierno	+
	8/2010	Vado Sargento Cabral	Invierno	+
	8/2010	Cantera San José	Invierno	+
	11/2010	Dique San Roque	Primavera	+
	11/2010	Villa Warcalde	Primavera	+
	11/2010	Vado Sargento Cabral	Primavera	+
11/2010	Cantera San José	Primavera	+	
<i>Bajo Grande</i>	1/2010	Entrada planta	Verano	+
	2/2010	Entrada planta	Verano	-
	3/2010	Entrada planta	Verano	+
	4/2010	Entrada planta	Otoño	+
	5/2010	Entrada planta	Otoño	+
	6/2010	Entrada planta	Otoño	+
	7/2010	Entrada planta	Invierno	+
	8/2010	Entrada planta	Invierno	+
	9/2010	Entrada planta	Invierno	+
	10/2010	Entrada planta	Primavera	+
	11/2010	Entrada planta	Primavera	+
	12/2010	Entrada planta	Primavera	+

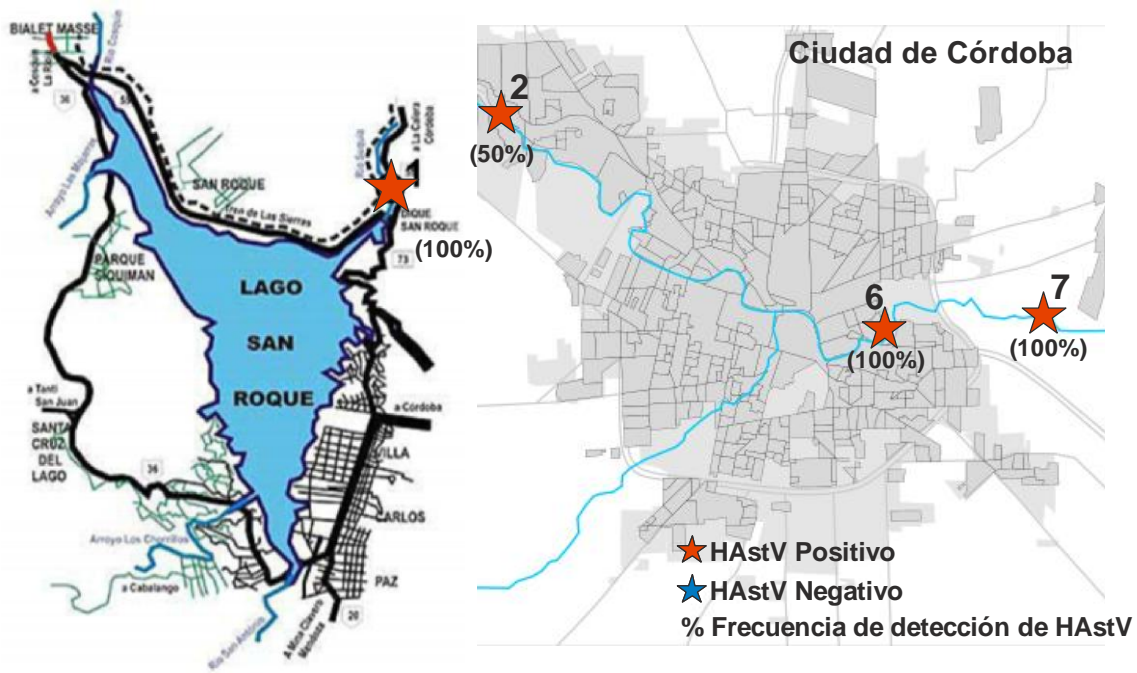
<sup>a</sup>RT-PCR con primers PreCap1 y 12GR utilizados para la detección del ORF-2 (proteína de la cápside) de astrovirus humano.

A modo de resumen de los resultados presentados en la tabla 4 se presenta en la Figura 12 la detección genérica de astrovirus en el río Suquía, según estación del año y sitio de monitoreo.



**Figura 12:** Mapa estacional de detección genérica de astrovirus humanos (HAsTVs) en los sitios seleccionados de monitoreo: 1.Dique San Roque, 2.Villa Warcalde, 6.Vado Sargento Cabral y 7.Cantera San José del río Suquía de la Ciudad de Córdoba en el año 2010.

Los resultados muestran que astrovirus estuvo presente en todas las estaciones, con altas tasas de detección (Verano 75%, Otoño 75%, Invierno 100%, Primavera 100%), no observándose un patrón estacional. Así, es posible construir un gráfico general que refleje la presencia de astrovirus en las aguas del río Suquía como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13:** Mapa de detección genérica de astrovirus humanos (HAstVs) en los sitios seleccionados de monitoreo: 1. Dique San Roque, 2. Villa Warcalde, 6. Vado Sargento Cabral, 7. Cantera San José del río Suquía de la Ciudad de Córdoba en el año 2010.

El estudio de astrovirus en aguas superficiales también ha sido abordado por otros investigadores. Miagostovich y col., (2008), realizaron de agosto de 2004 a Junio de 2005 un estudio en Manaus, Brasil, en el río Negro, recolectando 52 muestras de 13 sitios de monitoreo que incluyen zonas de alto desarrollo urbano, zonas rurales con bajo crecimiento urbano y una zona de muy bajo desarrollo urbano/primaria forestación. En estas aguas superficiales se detecta la presencia de genomas de diversos virus entéricos, entre ellos los astrovirus humanos, en una frecuencia del 15,4% y una prolongada persistencia de virus en este ambiente acuático. Así mismo, Rodríguez-Díaz y col., (2009), investigaron virus entéricos en el río Guaire, Caracas, Venezuela con alta polución fecal ( $>10^6$  coliformes fecales/100ml). El río Guayre tiene una longitud de 70 Km de extensión y funciona como colector de residuos cloacales domésticos generados por la población urbana de 5.000.000 de habitantes de la zona



metropolitana de Caracas a lo largo de 53 Km. La presencia de astrovirus fue la más predominante, con una tasa de detección del 89% (16/18 muestras) durante octubre 2007-abril 2008 en la estación seca del año. También Hot y col., (2003), reportan la detección de virus entéricos, entre ellos los astrovirus, en 4 ríos ubicados al norte de Francia, en un muestreo mensual durante Febrero de 1999-Enero 2000 con una frecuencia de detección del 3% (2/68). Los trabajos citados muestran que la presencia de astrovirus en aguas superficiales es un evento frecuente; sin embargo se observan diferencias en las frecuencias de detección viral. Esto estaría íntimamente relacionado al tamaño de la población que habita en cercanía de los cursos de agua, y al tratamiento de los efluentes cloacales que luego son vertidos en los ambientes acuáticos. Los resultados de frecuencia de detección de astrovirus en el sistema cloacal de la Ciudad de Córdoba (91,6%) reflejan la alta circulación de astrovirus en la población local durante todo el año y señala a los residuos cloacales como una fuente muy importante de carga de astrovirus. Estos residuos cloacales son vertidos al río ya sea como aguas residuales tratadas o clandestinamente como aguas residuales crudas. A esto cabe agregar, a los fines de estimar el impacto del vertido de aguas residuales a un curso de agua, la importancia de tener en cuenta: a) el caudal del curso de agua b) la variación del caudal en estación seca y húmeda, y c) el volumen de aguas cloacales tratadas y descargas no controladas y/o clandestinas que son vertidas al lecho del río. En el caso particular del río Suquía, este es un curso de agua de cauce menor, que atraviesa en su totalidad la Ciudad de Córdoba y que recibe aguas cloacales tratadas en 2 sitios de su curso, uno cercano al Puente Centenario y el otro 2 Km aguas arriba de la Cantera San José punto en el que el caudal vertido de aguas residuales tratadas es igual al caudal del río. Resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio

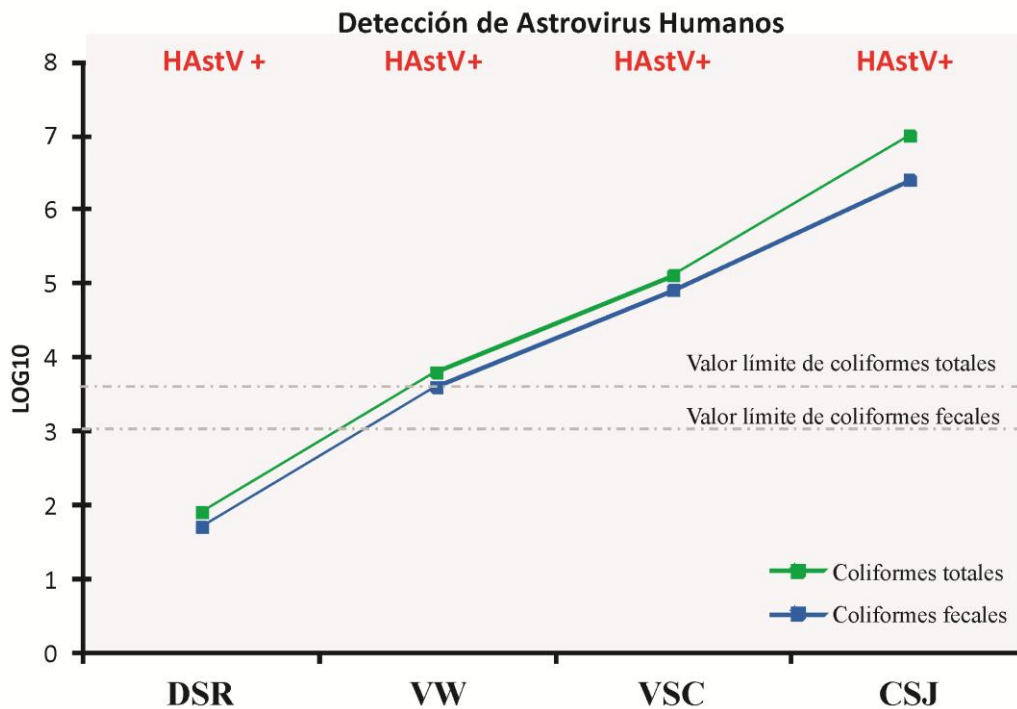
demuestran la presencia de genoma de astrovirus en las aguas residuales post-tratamiento antes de ser vertidas al río (datos no incluidos en este estudio). Estas particularidades del río Suquía hacen que sea un curso de agua que recibe un fuerte impacto por actividades antrópicas sin posibilidad de autodepuración y/o dilución de carga orgánica durante su recorrido. Es de destacar que la frecuencia de detección de astrovirus es similar en las estaciones secas y húmedas, a pesar de que durante la estación húmeda, el volumen de agua aumenta hasta 10 veces respecto al caudal de la estación seca.

Otro punto a destacar es la detección de astrovirus durante las cuatro estaciones del año 2010, en el sitio de monitoreo Dique San Roque, cuyas aguas son las principales tributarias para la formación del río Suquía. Esto sugiere una problemática mucho más compleja, involucrando a poblaciones y sistemas serranos con saneamiento deficiente que impactan en el agua del Dique San Roque.

Los resultados obtenidos muestran al río Suquía, durante todo el año, como una fuente hídrica potencial para la transmisión de astrovirus a población expuesta a sus aguas.

### ***Análisis comparativo entre carga de bacterias indicadoras de contaminación fecal y detección de genoma de astrovirus***

En el siguiente gráfico se muestra la carga general bacteriana de coliformes totales y fecales y detección de astrovirus por sitio de monitoreo (Figura 14). En el sitio de monitoreo Dique San Roque la carga de coliformes totales y fecales se encontró dentro de los límites considerados como aceptables para calidad microbiológica de aguas recreacionales, sin embargo se detectó presencia de genoma viral de HAsTVs durante las cuatro estaciones del año.

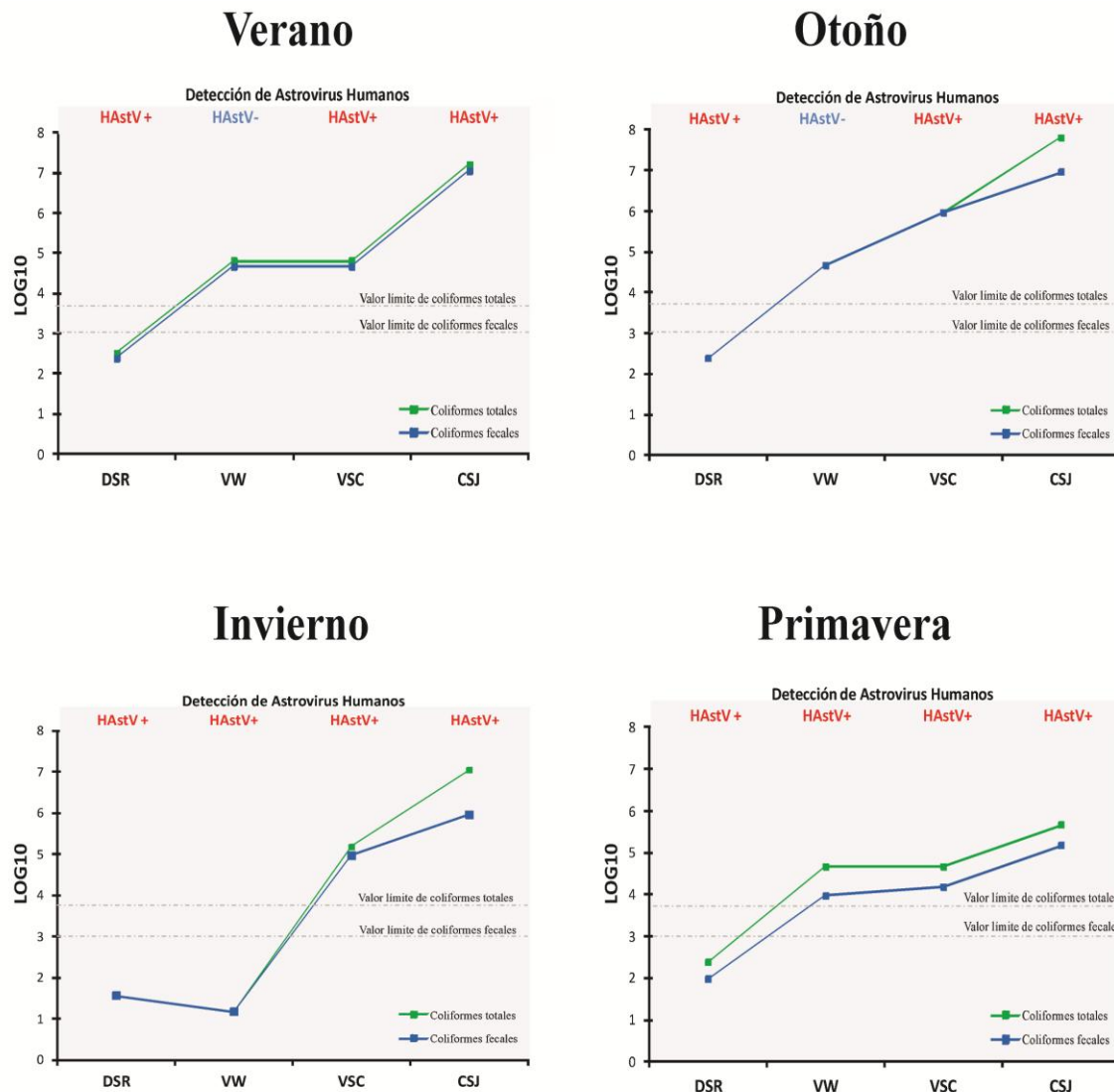


**Figura 14.** Valores bacterianos generales de coliformes totales y fecales por sitios de muestreo y detección de HAstVs en el río Suquía durante el año 2010.

A los fines de profundizar el estudio, se realizó el análisis de carga bacteriana y detección de genoma de astrovirus según sitio de monitoreo y estación (verano, otoño, invierno, primavera) como se observa en la Figura 15.

Los resultados mostraron valores por fuera de los límites aceptables para coliformes totales y fecales según estación en 3 sitios de los cuatro estudiados (Villa Warcalde - VW, Vado Sargento Cabral - VSC y Cantera San José - CSJ) durante el verano, otoño y primavera localizados en el paso del río por la ciudad. El sitio de muestreo VW mostró carga de coliformes totales y coliformes fecales menores al valor guía límite en la estación invierno. Un solo sitio (Dique San Roque -DSR) en las cuatro estaciones mostró valores de carga bacteriana por debajo de los límites establecidos (Figura 15).

Sin embargo, independientemente de cargas bacterianas dentro o fuera de límites aceptables se pudo detectar la presencia de genoma de HAstVs en las cuatro estaciones en los sitios Dique San Roque, Vado Sargento Cabral, y Cantera San José, y durante el invierno y primavera en Villa Warcalde.



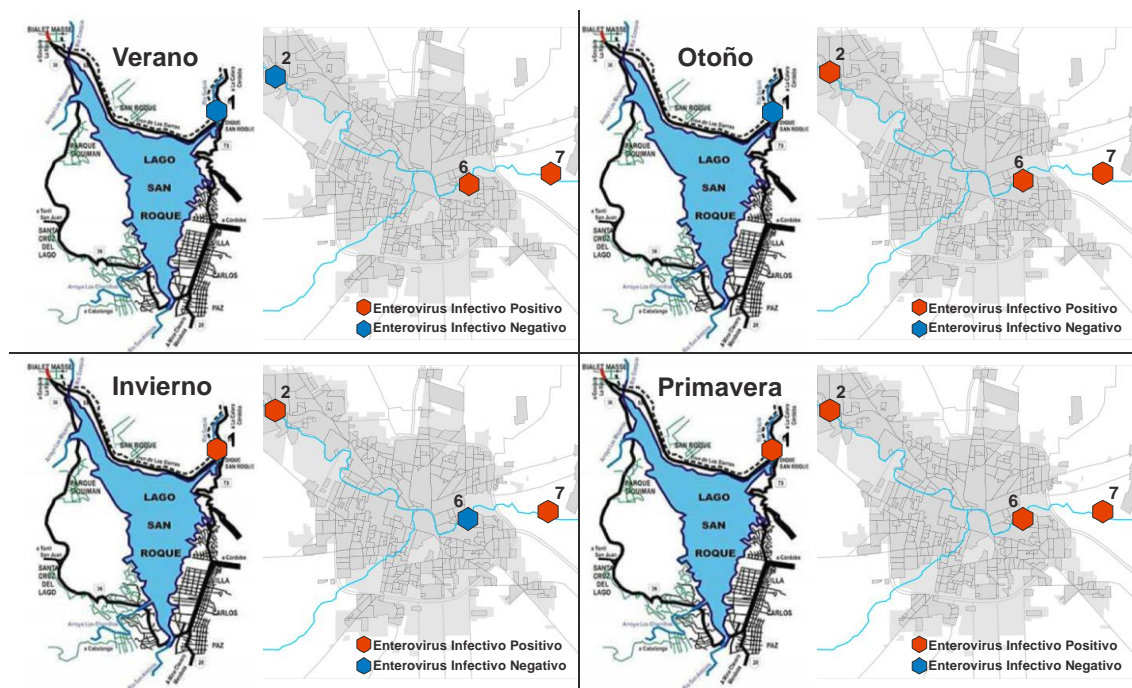
**Figura 15.** Análisis comparativo por sitio de muestreo y estación entre detección de coliformes totales y fecales y HAstVs del río Suquía en el año 2010.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que niveles aceptables de carga bacteriana (coliformes totales y fecales) no necesariamente implican ausencia de microorganismos patógenos como astrovirus.

### ***Detección de genoma viral y viabilidad viral (virus infeccioso)***

La técnica de PCR utilizada en este estudio para detectar HAstV no tiene la habilidad de distinguir entre viriones infecciosos de los que no lo son. A los fines de obtener una evidencia indirecta de que la detección de genoma de astrovirus se correspondería con astrovirus viable (infeccioso), se determinó en el total de las muestras de agua de río y dique la presencia de enterovirus viable. Se eligió este sistema viral porque los enterovirus incluyen un amplio grupo viral con alta capacidad para replicar en células permisivas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, señalando la presencia de virus viable durante todas las estaciones del año y en el 75% de las muestras analizadas.




























**Figura 16.** Mapa de detección estacional de enterovirus en los sitios seleccionados de monitoreo: 1.Dique San Roque, 2. Villa Warcalde, 6.Vado Sargento Cabral, 7.Cantera San José, del río Suquía de la Ciudad de Córdoba en el año 2010.


Esta evidencia, sumada a la detección del genoma de astrovirus (genoma a ARN de simple cadena, moléculas poco estables bajo condiciones ambientales), sugieren

fuertemente que el genoma de astrovirus detectado se corresponde con astrovirus infectivo. Es de destacar que las muestras que resultaron negativas para genoma de astrovirus y/o enterovirus viable no necesariamente reflejan ausencia de virus. El resultado negativo, en un contexto de alta frecuencia de detección viral, se podría deber a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR y/o toxicidad en los cultivos de tejidos o a la dilución de las partículas virales en el medio acuoso. Está demostrado que la presencia de compuestos orgánicos como ácido tánico, proteínas y compuestos inorgánicos como metales presentes en las muestras ambientales pueden ser el mayor obstáculo en la rutina de detección de los astrovirus por PCR (Shieh y col., 1995; Ijzerman y col., 1997; Miagostovich y col., 2008).

A modo de resumen, los resultados de variables físico-químicas, bacteriológicas y virales estudiadas en el curso de agua se presentan en la Figura 17.

Sitios de monitoreo	Parámetros Físico-Químicos		Coliformes		Virus viable	Genoma viral
	DBO5	Amonio	Totales	Fecales	Enterovirus	HAsTV
Dique San Roque						
Villa Warcalde						
Vado Sargento Cabral						
Cantera San José						

 Parámetros fisicoquímicos, bacteriológicos con valores aceptables y ausencia de genoma viral o virus viable

 Parámetros fisicoquímicos, bacteriológicos fuera de los valores aceptables y presencia de genoma viral o virus viable

**Figura 17.** Calidad de agua del río Suquía: Correlación entre resultados de variables físico-químicas, bacteriológicas y virales.

Estos resultados brindan evidencias de la necesidad de sumar la detección de astrovirus a los indicadores bacterianos ya existentes a los fines de identificar fuentes

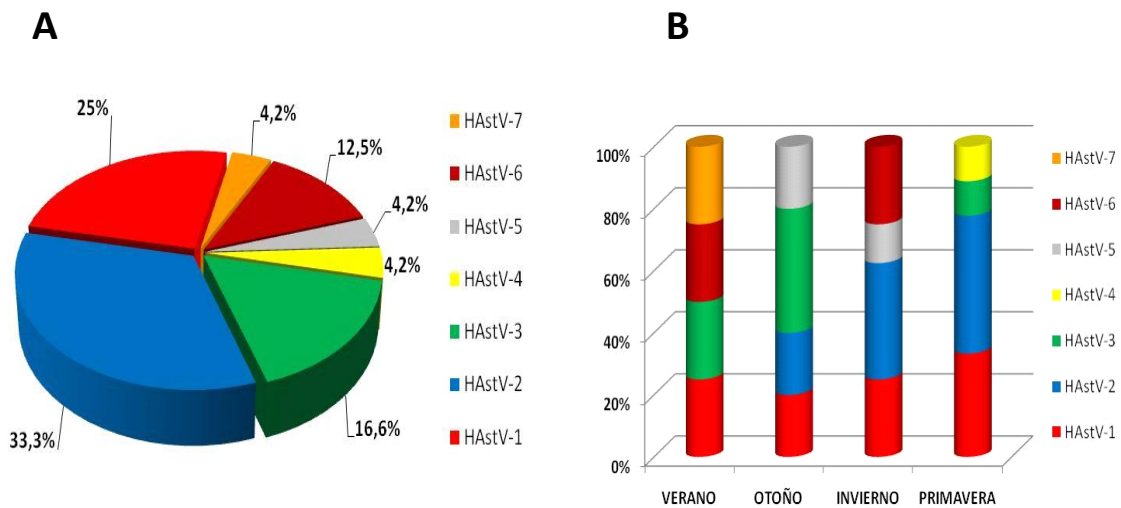
hídricas con potencial de transmisión de estos virus a población expuesta. Aún más, la detección de enterovirus viable se correlacionó con la detección de genoma de astrovirus, señalando indirectamente la presencia de astrovirus con potencial infectivo en las aguas.

Si bien el análisis por cluster, incluyendo variables que indican contaminación fecal ya sea directas DBO5, carga bacteriana de coliformes totales y fecales e indirectas como el amonio  $\text{NH}_4^+$  brinda una estrategia válida y sostenible para el monitoreo de contaminación fecal de aguas, es necesario incluir, al menos en uno de los puntos de monitoreo, la detección del genoma de astrovirus para alcanzar un resultado más certero de la calidad bacteriana y viral de las aguas.

### ***Genotipos de astrovirus humanos (HAstVs) en aguas del río Suquía y aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba***

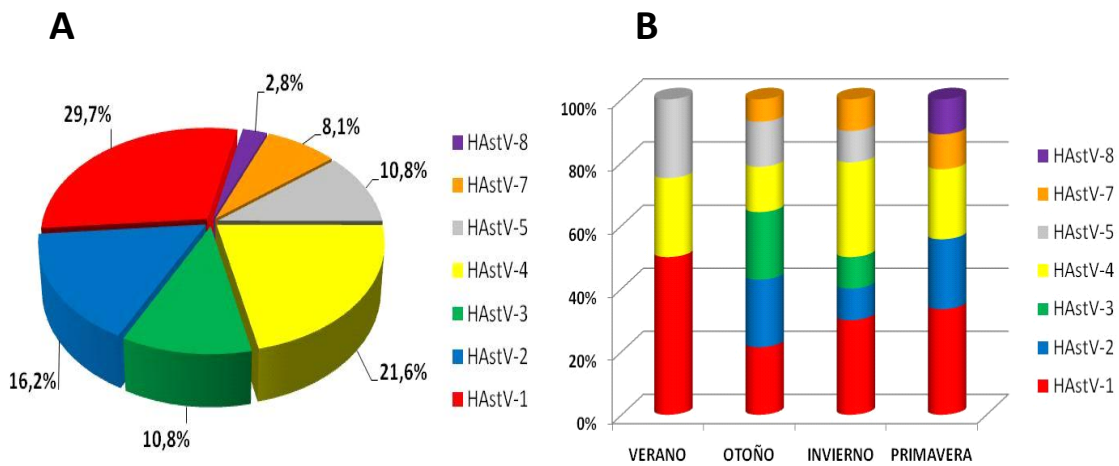
Se identificaron los genotipos en las 14 muestras de agua de río y 11 de cloacas anteriormente detectadas como astrovirus positivo. Los genotipos de astrovirus (HAstVs) fueron detectados por RT-PCR *multiplex* anidada conformada para los 8 genotipos comunes de circulación en el mundo.

En la genotipificación de las 14 muestras de agua del río se identificaron 24 genotipos ya que cada muestra reveló la presencia de 1 o más variantes genotípicas. En la Figura 18 A se muestra la distribución de genotipos de astrovirus humanos (HAstV-1-8).



**Figura 18:** Distribución porcentual de genotipos de astrovirus humanos (HAstV1-7) identificados en aguas del río Suquía de la Ciudad de Córdoba, año 2010. **A.** Distribución porcentual general. **B.** Distribución porcentual estacional.

A su vez en las 11 muestras astrovirus positivo de cloacas, se identificaron 37 genotipos de astrovirus humano. La distribución proporcional se muestra en la Figura 19 A.



**Figura 19:** Distribución porcentual de genotipos de astrovirus humanos (HAstV1-5,7,8) identificados en aguas cloacales de la planta urbana de tratamiento Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba, año 2010. **A.** Distribución porcentual general. **B.** Distribución porcentual estacional.



Los resultados indican que en el período estudiado se identificó en agua del río y cloaca un perfil comparable de genotipos. Así, los genotipos más prevalentes en el mundo se identificaron en ambas matrices acuosas, a excepción de genotipo HAstV-6 en cloacas y genotipo HAstV-8 en el río. Esto sugiere que en la población de Córdoba co-circulan, al igual que en el resto del mundo, una amplia diversidad de genotipos de astrovirus; y señala al agua del río, como una fuente potencial de transmisión viral, integrada a la historia natural de circulación de astrovirus.

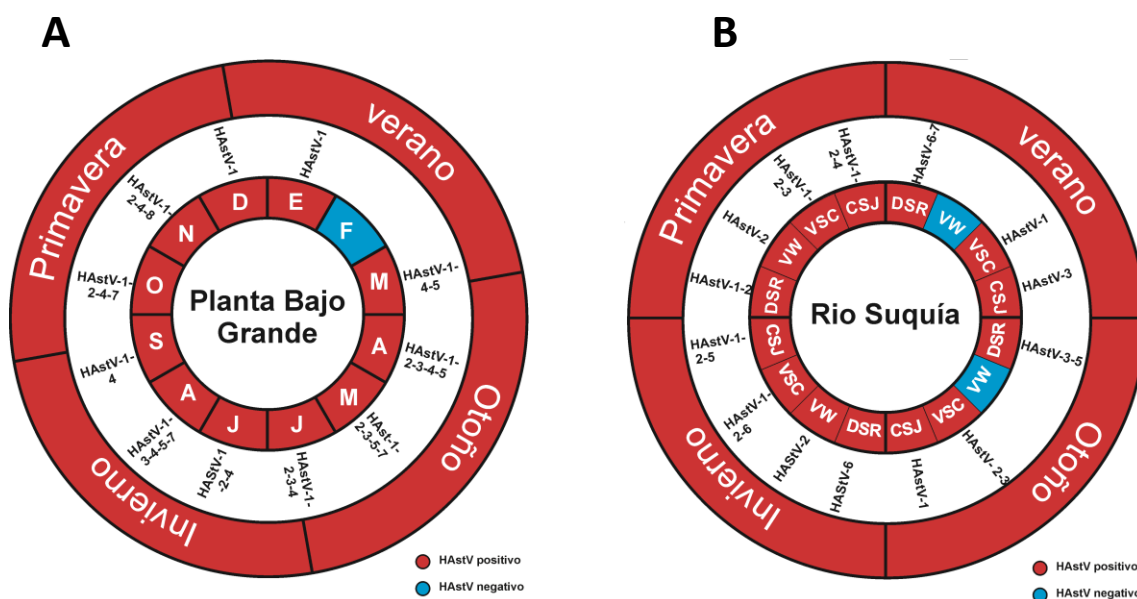
El análisis de los genotipos según estación (verano-otoño-invierno y primavera) señaló genotipos que se identificaron todo el año y otros más circunscriptos a una o más estaciones. Los genotipos de HAstV-1 y 2, los más prevalentes en el mundo, mostraron un comportamiento similar en el río y cloacas. El genotipo HAstV-1 de río y cloaca circuló todo el año sin diferencia estacional y el genotipo HAstV-2 circuló en las estaciones otoño-invierno-primavera para ambas matrices acuosas (Figura 18 B y 19 B).

Los genotipos HAstV-3-5 y 6 se identificaron en forma frecuente en el río Suquía y el HAstV-4 sólo en primavera (Figura 18 B). En cloacas el genotipo HAstV-4 fue detectado circulando todo el año, mientras que el genotipo HAstV-5 circuló en verano-otoño e invierno, el HAstV-7 en otoño-invierno y primavera y el HAstV-3 en otoño e invierno durante el año 2010 (Figura 19 B). Los genotipos HAstV-7 en río y HAstV-8 en cloacas sólo se detectaron en una sola estación (Figura 18 B y 19 B). Las estaciones que mostraron mayor diversidad genotípica en cloacas fueron en otoño-invierno y primavera mientras que en el río se observó una menor diversidad genotípica, no definida por estación. No se detectaron los genotipos HAstV-8 en las muestras del río Suquía y HAstV-6 en las muestras cloacales. Esto puede deberse a que son genotipos

de escasa circulación en el mundo y los resultados obtenidos sugieren que también lo son en nuestro medio.

Los genotipos identificados en este perfil corresponden a los detectados en otras partes del mundo. Meleg y colaboradores en 2006 detectaron astrovirus en cloacas de Hungría en 15/35 (43%) de las muestras y confirmaron por secuenciación a los genotipos HAstV-1 y 2. En Sudáfrica, Nadan y colaboradores en 2003 detectaron en 24 muestras de cloacas los genotipos HAstV-1 (13%); HAstV-2 (16%); HAstV-3 (16%); HAstV-4 (8%); HAstV-5 (4%); HAstV-7 (16%) y HAstV-8 (4%). En río existen escasos datos de frecuencia de genotipos, en Brasil, Miagostovich y colaboradores (2008) reportaron la presencia del genotipo HAstV-1 en el río Negro de Manaus. En otro estudio realizado en Caracas, Venezuela en el río Guaire por Rodríguez-Díaz y colaboradores en 2009 documentaron por primera vez la circulación del genotipo HAstV-8 como único genotipo detectado en las aguas superficiales de esa región.

A modo de resumen, en las Figuras 20 A y B se presenta la detección mensual y por estación de genotipos de astrovirus identificados en aguas residuales y del río Suquía de la Ciudad de Córdoba durante el año 2010.



**Figura 20:** **A.** Detección mensual y por estación de genotipos de HAstV-1-5/7-8 en la entrada a planta urbana de residuos cloacales de Bajo Grande. **B.** Detección por estación de genotipos de HAstV-1-7 en los diferentes sitios de monitoreo del río Suquia durante el año 2010.

### **Análisis de secuencias de astrovirus en el río Suquia y cloacas de Bajo Grande**

Dos productos amplificados por PCR *multiplex* anidada para HAstV-1, uno del río Suquia y otro de aguas residuales, seleccionados al azar, fueron secuenciados para comparar homologías genómicas entre las cepas virales aisladas en Córdoba y en otras regiones del mundo.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas se tomó una región de 108 nucleótidos del ORF-2 del HAstV-1, correspondiente a la proteína de la cápside viral.

Para el análisis de homología genómica, múltiples secuencias nucleotídicas de HAstV-1 (cepa prototipo de referencia HAstV-1 Oxford y distintos linajes del genotipo 1 de diferentes partes del mundo incluyendo las de Colombia, Venezuela, Argentina, Brasil y Hungría, y 2 secuencias ambientales incluyendo 1 muestra de cloaca de Francia y 1 de río de Brasil) fueron comparadas con las cepas aisladas del río Suquia y de las aguas residuales de Córdoba. Los resultados del alineamiento se muestran en la Figura 21.

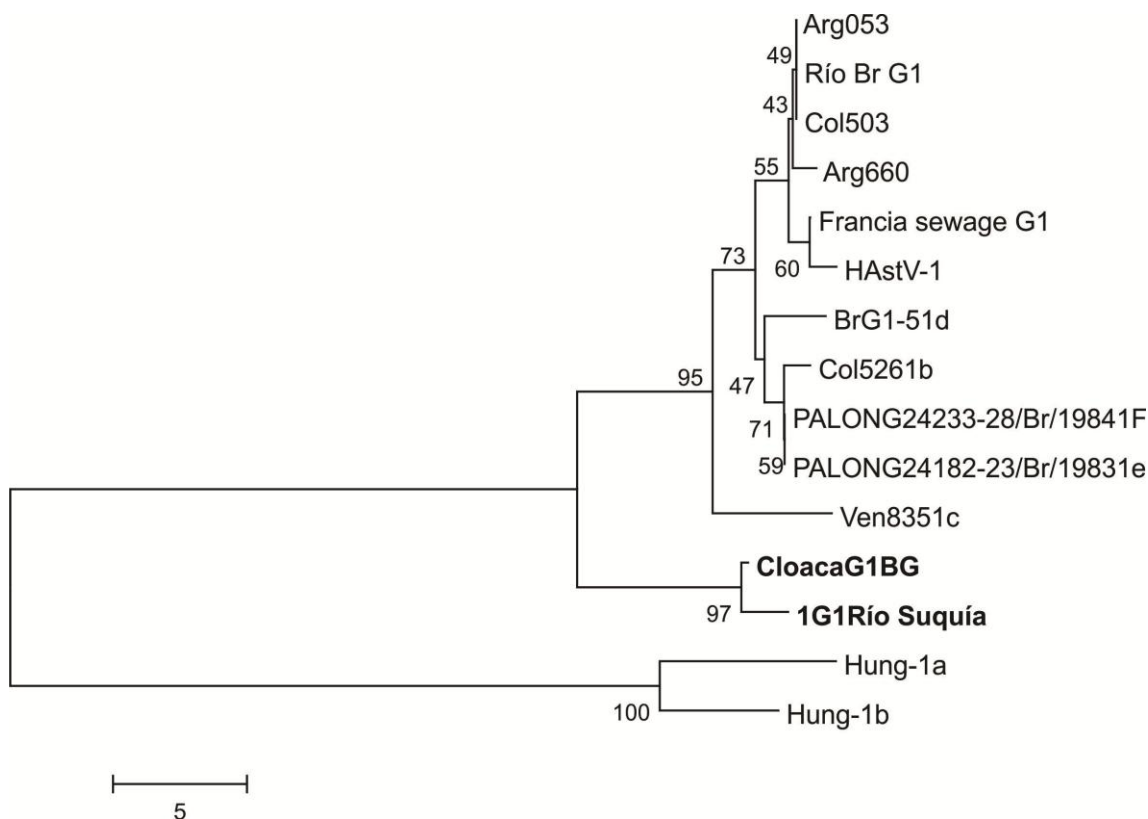
```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
Ven8351c : CAGAGAGCACACCAAACTTGGG--ACAAATCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATCGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
Col503   : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
Arg053   : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
Arg660   : CAGAGAGCAACACCAAACTTGGG--ACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
PALONG2423 : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
PALONG2418 : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
BrG1-51d : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
Col5261b : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
franciasew : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
rio-brasil : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
HAstV-1  : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACGGTCGGGTCAAACACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCCTGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
CloacaG1BG : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--ACAGTCGGGTGGAAACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCGGGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
1G1RíoSuquía : CAGAGAGCAACACCAACCCCTTGGG--GCAATTCGGGTGGAAACCAGTGGACCACTGAGATTGAGGGCGTGTATTCTCCTAAACCCCTGTCCGGGTTAAGGACCGCTACTGGG : 108
HUNG-1a  : CGGAGACCAACACCAAGACCAGGTTACAGACCTCTTCTCTAGTAAAGTCAACACTGGTTCCAGGTAACACTACTACTACTTTTACAGGGGCTCTCTCTACTGGG : 110
HUNG-1b  : CGGAGACCAACACCAAGACCAGGTTACAGACCTCTTCTCTAGTAAAGTCAACACTGGATTCCAGGTTAACACTACTACTACTTTTACAGGGGCTCTCTCTACTGGG : 110
CagAGgcaACA CAACccttgGG aC tCggGT a accAgtGgcACcActGagaTtgAGGcgtgtAttctCCT Aacc gTcc gttaaGgacgCtaCtGG

```

**Figura 21.** Alineamiento de secuencias nucleotídicas de cepas de aislamientos clínicos y ambientales correspondientes al genotipo de HAstV-1 extraídos del GenBank y comparados con 2 aislamientos ambientales locales denominados (**CloacaG1BG** y **1G1Río Suquía**) uno del río Suquía y otro de aguas residuales de Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba.

La secuencia nucleotídica de la cepa de HAstV-1 de aguas residuales presentó una homología del 98% con la cepa aislada del río Suquía y ambas mostraron una homología en el rango de 49% y 87% con las restantes cepas incluidas en el análisis. El análisis filogenético mostró que las cepas de HAstV-1 aisladas en Córdoba agrupan dentro del cluster que incluye la mayoría de cepas aisladas en el mundo (Figura 22) y revela que las cepas aisladas en Córdoba tienen el mismo origen evolutivo.



**Figura 22.** Árbol filogenético basado en 108 nt de extensión de la región hipervariable 3' terminal del marco de lectura abierta ORF-2 de la región de la cápside construido con el software Mega 5 empleando el método del *Neighbor-Joining*. Se incluyen en este análisis distintas cepas de aislamientos clínicos en el mundo y de aislamientos ambientales correspondientes al genotipo de HAstV-1 extraídos del GenBank y 2 aislamientos ambientales locales, uno del río Suquía (**1G1Río Suquía**) y otro de aguas residuales de Bajo Grande (**CloacaG1BG**) de la Ciudad de Córdoba.

El análisis aminoacídico de la región del ORF-2 secuenciada mostró una identidad del 94% entre las dos cepas aisladas de Córdoba (Figura 23). Los cambios amino-acídicos que muestran las cepas aisladas en Córdoba no estuvieron presentes en otras cepas del genotipo HAstV-1 del mundo y es lo que explica el sub-agrupamiento en el árbol filogenético de las cepas locales y confirma que las cepas de astrovirus identificadas en río son las mismas que las excretadas por materia fecal por la población local.

```

          *           20           *
Ven8351c : QRATATLGTIGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
Col503   : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
Arg053   : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
Arg660   : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
PALONG2423 : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
PALONG2418 : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
BrG1-51d : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
Col5261b : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
franciasew : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
rio-brasil : QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
HAstV-1  : QRATATLGTVGSNNSGTTEIEACIILNPVLVKDATG : 36
CloacaG1BG : QRATTLGAVGLETSGTTEIEACIILNPVRVKDPSG : 36
1G1RíoSuquia : QRATTLGAIGLETSGTTEIEACIILNPVRVKDPSG : 36
HUNG-1a  : QTNNKHQVITSLFLVKVTTIGFQVNNYLSYFYRASATG : 36
HUNG-1b  : QTNNKHQVITLFLVKVTTIGFQVNNYLSYFYRASATG : 36
          Qrat tlgt g  tsgTTei2acilLnpv vkda3G

```

**Figura 23.** Alineamiento aminoacídico en el que se muestran distintas cepas de aislamientos clínicos en el mundo y de aislamientos ambientales correspondientes al genotipo de HAstV-1 extraídos del GenBank y comparados con 2 aislamientos ambientales, uno del río Suquia (**1G1Río Suquia**) y otro de cloaca de Bajo Grande (**Cloaca G1BG**) de la Ciudad de Córdoba.

Este resultado preliminar abre el interrogante sobre el significado de estos cambios aminoacídicos y de su implicancia en posibles cambios antigénicos en la proteína viral.

Será necesario el secuenciamiento de un número mayor de cepas locales de HAstV-1 para profundizar el significado del resultado encontrado.

En la actualidad, no hay reportes de trabajos que monitoreen durante un mismo período de tiempo y en la misma zona geográfica la circulación y perfil de HAstV-1 en aguas residuales (circulación poblacional) y aguas superficiales. Los datos obtenidos en nuestro estudio ponen de manifiesto el impacto de la contaminación antrópica sobre aguas en estrecho contacto con la población local, constituyéndose en una posible fuente infecciosa viral para la población que acude a estas aguas en busca de un espacio recreacional. Ya en el año 1989 en USA, en estudios pioneros en el tema,

reportaron 171 brotes de diarrea que fueron asociados con aguas de uso recreacional donde pudieron ser documentados más de 15.000 individuos infectados tanto de espacios de recreación natural como artificial (Standish-Lee y Loboschefsky, 2006). Otros estudios reportan infecciones con virus que producen diarrea relacionados a la transmisión por fuente de agua contaminada durante el contacto de la recreación (Kukkula y col., 1997; Hoebe y col., 2004; Divizia y col., 2004; Gallay y col., 2006; Standish-Lee y Loboschefsky, 2006).

Los resultados de virología molecular obtenidos en nuestro estudio permiten identificar a la polución fecal de origen humano, tanto difusa como puntual como fuente de contaminación viral de las aguas del río Suquía. Los resultados están fuertemente respaldados por la detección de cepas de HAstV-1 en aguas de río y cloacales de la Ciudad de Córdoba con alta identidad genómica (98%) y aminoacídicas (86%) y con un ancestro evolutivo común que las diferencia de otras cepas de astrovirus genotipo HAstV-1 identificados en otras partes del mundo.

## Conclusiones

1. La presencia de astrovirus potencialmente infectivo es un evento frecuente en las aguas del río Suquía (rango de detección 50-100%), lo que hace que esta matriz acuosa (desde su nacimiento en el Dique San Roque hasta que el río abandona la Ciudad de Córdoba) sea una fuente probable de infección por astrovirus a población expuesta durante todo el año.
2. La alta frecuencia de detección de astrovirus (91,6%) en aguas residuales refleja que son virus de circulación endémica en nuestro medio.
3. La detección de cepas de astrovirus humanos genotipo 1 (HAstV-1) en agua del río y residuales de la Ciudad de Córdoba con alta identidad genómica (98%) y aminoacídica (94%) y con un ancestro evolutivo común señala a la polución fecal humana (tanto difusa como puntual) como fuente de contaminación viral de aguas del río Suquía.
4. La distribución y frecuencia comparable ( $p < 0.05$ ) de genotipos de HAstVs así como también la alta homología genómica entre cepas virales identificadas en aguas residuales y del Suquía sugiere que el río estaría incorporado (como fuente de transmisión viral) a la historia natural de circulación del virus en nuestro medio.
5. La presencia de genoma viral en sitios de monitoreo que muestran bajo nivel de contaminación fecal por indicadores bacterianos sugiere una prolongada persistencia de este grupo de virus entéricos en el ambiente. Este genoma viral podría ser utilizado como marcador de polución fecal de las aguas.



**6.** Se propone como estrategia de monitoreo de la calidad bacteriológica y viral para las aguas del Suquía, un muestreo anual en 4 sitios del río: Dique San Roque, Villa Warcalde, Puente Centenario y Cantera San José, incluyendo en este análisis, a las variables DBO<sub>5</sub>, amonio, coliformes totales, coliformes fecales y astrovirus. Los resultados reflejarán la dinámica y magnitud de la polución bacteriana y el potencial riesgo viral de infección por astrovirus a población expuesta.

**7.** Los resultados de este trabajo de tesis podrían ser tomados como datos de base para la implementación de políticas públicas tendientes a evaluar acciones de saneamiento de las aguas del río Suquía.

## **Proyección del trabajo de tesis desarrollado**

En continuidad con este trabajo se deberán abordar en el futuro, estudios para cuantificar el riesgo de infección por astrovirus a población expuesta y el impacto en salud humana. Para esto será necesario cuantificar la carga de astrovirus en aguas del río y realizar estudios poblacionales de frecuencia y severidad de infección sintomática por astrovirus. Así mismo la cuantificación de la carga de astrovirus en aguas superficiales permitirá identificar puntos difusos y puntuales de polución fecal de origen humano.

## Referencias

Appleton H y Higgins PG. (1975). Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* Jun 7; 1(7919):1297.

Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. (2010). Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol* 82(7):1277-1281.

Clesceri LS, Greemberg AE, Eaton AD. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, ed 20<sup>va</sup>, p 906. Washington, D.C.

Cubitt WD. (1991). A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral infections. *Water Sci Technol* 24:197-203.

De Benedictis P, Shultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals: Molecular biology genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection Gen and Evol* (7):1529-1544.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión (2014). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Divizia M, Gabrieli R, Donia D, Macaluso A, Bosch A, Guix S, Sanchez G, Villena C, Pinto RM, Pombi L, Buonomo E, Cenko F, Leno L, Bebeci D y Bino S. (2004). Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci Technol* 50:57-61.

Espinosa AC, Nazari-Hiriart M, Espinosa R, Mauri-Avidal L, Mendez E y Arias FC. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42:2618-2628.

Espul C, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T y Matson DO. (2004). Prevalencia and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 72:75-80.

Ferreira RG, Borges AM, Fiaccadori FS, Souza MB, Santos RA y Cardoso DD. (2010). Gastroenteric virus detection in fecal samples from women in Goiânia, State of Goiás, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(3):240-243.

Fields Virology. (2007) Astroviruses. Mendez E y Arias CF. Section 2: Specific Virus Families. Chapter 29 Five Edition. Volume 1 Wolters Kluwer/Lippincott Williams & wilkins.

Fomiga-Cruz M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Albinana-Gimenez N, Allard A y Girones R. (2005). Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J Virol Methods* 125:111-118.

Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, Prado V y Avendaño LF. (1998). Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 36:3691-3693.

Gallay A, De Valk H, Carnot M, Ladeuil B, Hemery C, Castor C, Bon F, Megraud F, Le Cann P y Desenclos JC. (2006). A large multipathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a ground water system, France, 2000. *Clin Microbiol Infect* 12:561-570.

Glass RI, Noel J, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, Dennehy P, Ruiz-Palacios G, de Guerrero ML y Monroe SS. (1996). The changing epidemiology of astrovirus associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 12 (suppl.):287-300.

Giordano MO, Paván JV, Martínez LC, Isa MB, Ferreyra LJ y Nates SV. (2000). Astrovirus constellation: emerging agents in acute gastroenteritis. *Medicina* 60:614.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M y Nates SV. (2004). Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 46(2):93-96.

Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, Hundesa A, Carratala A y Bofill-Mas S. (2010). Molecular detection of pathogens in water: the pros and cons of molecular techniques. *Water Res* 44(15):4325-4339.

Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Demanse D, Genoulaz O, Seigneurin JM, Zmirou D. (2003). Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study) *J Clin Virol* 27(1):74-82.

Gough RE, Collins MS, Borland E, Keymer LF. (1984) Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet Rec* 114(11):279.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A y Pintó RM. (2002). Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40:133-139.

Gutiérrez-Aguirre I, Banjac M, Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Peterka M, Strancar A y Ravnikar M. (2009). Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports. *J Chromatogr* 1216(13):2700-2704.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* (3):473-477.

Herrmann JE, Hudson RW, Perron-Henry DM, Kurtz JB y Blacklow NR. (1988). Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 158:182-185.

Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD y Blacklow NR. (1990). Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 161:226-229.

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

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M y Andréoletti L. (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* (19):4703-4710.

Ijzerman MM, Dahling DR y Fout GS. (1997). A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 63(1-2):145-153.

Krishna NK. (2005) Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol.* 18(1):17-26.

Kukkula M, Arstilla P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdordff CH y Jaatinen P. (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 29:415-418.

Kurtz JB y Lee TW. (1987) Astroviruses: human and animal. *Ciba Found Symp* 128, 92-107.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F y Ferre VV. (2004). Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 155:11-15.

Lewis GD y Metcalf TG. (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A viruses and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 54:1983-1988.

Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Cristina J, Leite JP, Miagostovich MP, Victoria M y Colina R. (2015). Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. *Food Environ Virol.* 2015 Feb 14.

Madeley CR y Cosgrove BP. 1975. Letter: 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2 (7932):451-452.

Meleg E, Jakab F, Koesis B, Banyai K, Melegh B y Szucs G. (2006). Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J Appl Microbiol* 101:1123-1129.

Méndez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G y Arias CF. (2007). Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* 81(19):10649-58.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silva LA, Leite JP.(2008). Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Environ Microbiol* 74(2):375-382.

Monroe SS, Stine SE, Gorelkin L, Herrmann JE, Blacklow NR y Glass RI. (1991). Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol* 65(2):641-648.

Mueller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, Barril PA, Morel V, Balanant J, Bocacao J, Hewitt J, Gessner BD, Delpeyroux F y Nates SV. (2009). Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol* 75(5):1395-1401.

Nadan S, Walter JE, Grabow WOK, Mitchell DK y Taylor MB. (2003). Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Afrika. *Appl Environ Microbiol* 69:747-753.

Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI y Monroe SS. (1995). Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33:797-801.

Palombo EA y Bishop RF. (1996). Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 34:1750-1753.

Pinto RM, Abad FX, Gajardo R y Bosch A. (1996). Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* 62:1811-1813.

Poma HR, Rajal VB, Blanco Fernández MD, Barril PA, Giordano MO, Masachessi G, Martínez LC, Isa MB, Freire MC, López Riviello G, Cisterna D, Nates SV y Mbayed VA. (2013). Evaluation of concentration efficiency of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PP7 in various water matrixes by different methods. *Environ Monit Assess* 185(3):2565-2576.

Pusch D, Oh OY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, Roske I y Schereier E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters *Arch Virol* 150:929-947.

Rao VC y Melnick JL. (1986). *Environmental Virology*. pp10-17. Wokingham: Van Nostran Reinhold (UK) Co Ltd.

Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD y Sanchez Fauquier A. (1995) Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 76, (pt8):2075-2080.

Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H y Betancourt WQ. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol* 75(2):387-394.

Ruuska T y Vesikari T. (1990). Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 22(3):259-267.

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

Shieh YS, Wait D, Tai L y Sobsey MD. (1995). Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 54(1):51-66.

Smith JL. (2001) A review of hepatitis E virus. *J food Prot* 64:572-586.

Snodgrass DR y Gray EW. (1977). Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch Virol*55(4):287-291.

Satndish-Lee P y Loboschfsky E. (2006). Protecting public health from the impact of body-contact recreation. *Water Sci Technol* 53:201-207.

Straub TM y Chandler DP. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods* 53(2):185-197.

Tsai YL, Tran B, Sangermano LR y Palmer CJ. (1994). Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewages and ocean water by triple reverse transcription PCR. *Appl Environ Microbiol* 60:2400-2407.

Walter JE y Mitchell DK. (2003). Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 16(3):247-253.

World Health Organization. (2003). Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO Geneva, Switzerland. [Htp://www.who.int/vaccines-documents/Docs pdf03/www737pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/Docs%20pdf03/www737pdf).

Woode GN y Bridger JC. (1978). Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 11(4):441-452.

Wyn-Jones AP y Sellwood J. (2001). Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91(6):945-962.

Zhou N, Lin X, Wang S, Wang H, Li W, Tao Z, Xu A. (2014). Environmental surveillance for human astrovirus in Shandong Province, China in 2013. *Sci Rep* 18;4:7539.