

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS EN MUESTRAS DE AGUA Y  
AIRE DE LA BAHÍA DE PANAMÁ EN ESTACIÓN LLUVIOSA DEL 2019**

**POR:**

**LEYSA CORTES 8-923-1734**

**ESTEPHANY MARTÍNEZ 8-920-1992**

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**  
**DICIEMBRE, 2021**

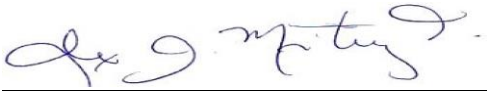
**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Ciudad Universitaria 10 de diciembre del 2021

Por este medio se hace constar que el proyecto de Trabajo de Graduación, titulado: **“Detección molecular de virus entéricos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en estación lluviosa del 2019”** ha sido recomendado por el departamento de Microbiología y Parasitología.

El trabajo será elaborado por las estudiantes: Leysa Cortes 8-923-1734

Estephany Martínez 8-920-1992



Dr. Alex O. Martínez Torres

**Asesor Principal**



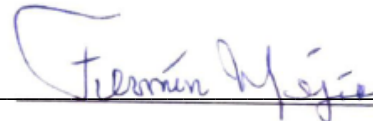
M.Sc. Humberto Cornejo

**Director del Departamento de  
Microbiología y Parasitología**



Dr. Jordi Querol-Audi

**Asesor**



M.Sc. Fermín Mejía

**Asesor**

Aprobado por: \_\_\_\_\_

Dra. Dora I. Quiros

**Directora de la Escuela**


Fecha \_\_\_\_\_

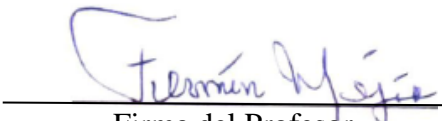
**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**FORMULARIO PARA ANTEPROYECTO DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**TITULO:** Detección molecular de virus entéricos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en estación lluviosa del 2019.

**AUTORES:** Leysa Cortes 8-923-1734  
Estephany Martínez 8-920-1992

**ASESORES:**

**Alex O. Martínez Torres**   
Asesor Principal Firma del Profesor.

**Fermín Mejía**   
Asesor Firma del Profesor.

**Jordi Querol-Audi**   
Asesor Firma del Profesor.

**DURACIÓN:** 12 meses.

**LOCALIDAD:** Laboratorios de Microbiología de Aguas (LAMA) y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado-VIP, Universidad de Panamá.

**FECHA:** 10 de diciembre del 2021.

# **DEDICATORIA**

A Dios todo poderoso, sin él no soy nada.

A mi madre Marlenis Y. Navarro, quien ha sido parte importante en mi formación como persona y académicamente profesional, gracias a ella me he convertido en la científica que soy hoy en día y mi hermano Eliseo G. Cortes, a quien deseo inspirar, los amo mucho.

A la generación de hombres y mujeres científicos/as que vienen en camino, que la información que se encuentre a continuación sea de ayuda en las futuras investigaciones en Panamá y si es posible en distintas partes del mundo.

Leysa Yovanis Cortes Navarro

A Dios por darme la fuerza, paciencia y perseverancia para poder superar cada obstáculo y de esta manera culminar este proyecto.

A mis queridos padres y hermana que siempre con su amor infinito me apoyaron y alentaron para que no me rindiera a final del camino.

A mi novio que siempre estuvo a mi lado apoyándome y alentándome en cada paso, a mis amigos que siempre me dieron una palabra de aliento. También quiero dedicarla a mi compañera de tesis y a mi asesor por que sin ellos esta meta no hubiera sido posible.

Estephany Isabel Martínez Almanza

# **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, queremos agradecer a Dios por habernos dado la fuerza y paciencia en todos los momentos difíciles que hemos pasado, además de la dedicación que nos ha brindado para poder culminar con éxito nuestra carrera universitaria y nuestro trabajo final de graduación.

Agradecemos a nuestros familiares quienes han estado pendiente de nosotras en todo momento, su amor incondicional siempre estuvo en momentos de estrés, llanto y alegría y han sido nuestro motor para seguir adelante y no darnos por vencidas, los amamos, muchas gracias a todos.

A nuestras amistades quienes han estado con nosotras, se han alegrado por nuestros triunfos y han llorado con nosotras en los peores momentos, pero siempre alentándonos para seguir adelante, Isaías Caballero, Yohanny Pineda, Sharon Pascual, Nicolas Barahona y Carlos Saldaña, muchas gracias a todos, los queremos mucho.

Agradecemos a nuestros profesores asesores, Dr. Alex O. Martínez-Torres, Dr. Jordi Querol-Audi y Profesor Fermin Mejia por la confianza, el tiempo y la enseñanza puesta durante el periodo de realización de la tesis, sin su ayuda esto no hubiera sido posible. A todos los profesores de la orientación de microbiología y parasitología en especial a la Dra. Nidia Sandoval, Profesora Nivia Ríos, Profesor Alberto Mena y Profesor Julio Castillo del departamento de genética, quienes han sido parte fundamental para la elaboración de nuestro trabajo final, muchas gracias a todos por compartir con nosotras sus valiosos conocimientos.

También queremos agradecer enormemente a los estudiantes de la Maestría de Microbiología Ambiental, Ediner Fuentes, Evelyn Henriquez y Yeimisol Madrid por los consejos brindados y apoyo incondicional durante la elaboración de este trabajo final, son fuente de inspiración.

De igual forma, queremos agradecer a todo el Laboratorio de Calidad de Open Blue Sea Farms, en especial a Msc. Angel Guillen y Msc. Cristal Salcedo, quienes nos dieron las primeras directrices al trabajar biología molecular qPCR real time, el cual fue un punto clave en la elaboración de este trabajo final, muchas gracias por el tiempo investido, apoyo incondicional y sus valiosos consejos compartidos con nosotras.

Agradecemos a los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Laboratorios de Microbiología de Aguas (LAMA) por abrimos sus puertas, darnos la confianza y brindarnos el apoyo necesario para la realización de esta tesis, de igual forma al Ministerio de Ambiente por el financiamiento económico del proyecto Detección Molecular y Análisis Filogenético de Virus, Bacteriófagos, Bacterias, Hongos Filamentosos y Parásitos Patógenos en Aire y Agua Provenientes de la Bahía de Panamá. Convenio N° 026-45-2019 del Fondo De Agua, Áreas Protegidas y Vida Silvestre, en el cual el Dr. Alex O. Martínez Torres es el investigador principal.

Por último, pero no menos importante, queremos agradecernos a nosotras mismas, por creer en que, si lo podíamos lograr. Agradecemos por no descansar ni un solo día e invertir horas de sueño y vacaciones desde que iniciamos en tratar de hacer lo mejor posible al realizar este arduo trabajo. Nos agradecemos por nunca renunciar, aunque fueron muchas las veces en que lo pensamos y por dar siempre lo mejor incluso más de lo que se nos exigía.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	9
Origen y distribución de los virus en el ambiente acuático.....	11
Origen y distribución de los virus en el ambiente aéreo. ....	12
Enfermedades víricas transmitidas por el agua. ....	14
Enfermedades víricas transmitidas por el aire.....	15
Detección de virus en ambientes acuáticos. ....	16
Detección de virus en ambiente aéreo.....	17
Gastroenteritis Vírica. ....	17
<i>Enterovirus.</i> ....	18
<i>Historia.</i> ....	18
<i>Clasificación.</i> ....	19
<i>Morfología y estructura.</i> ....	19
<i>Organización del genoma.</i> ....	20
<i>Epidemiología.</i> ....	20
<i>Adenovirus.</i> .....	21
<i>Historia.</i> ....	21
<i>Clasificación.</i> ....	22
<i>Morfología y Estructura.</i> .....	22
<i>Organización del Genoma.</i> ....	23
<i>Epidemiología.</i> ....	23
<i>Rotavirus.</i> ....	24
<i>Historia.</i> ....	24
<i>Clasificación.</i> ....	25
<i>Morfología y Estructura.</i> .....	25
<i>Organización del Genoma.</i> ....	26
<i>Epidemiología.</i> ....	26
Cultivo Celular.....	28
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30

<i>Transcripción Inversa (RT)-PCR</i> .....	32
<i>PCR Anidada</i> .....	33
<i>Electroforesis</i> .....	33
CAPÍTULO II OBJETIVOS .....	35
Objetivo general .....	36
Objetivos específicos .....	36
CAPÍTULO III HIPÓTESIS .....	37
CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
Área de estudio .....	40
Fase de campo .....	41
<i>Puntos de muestreo</i> .....	41
Diseño experimental .....	42
<i>Agua</i> .....	42
<i>Aire</i> .....	42
Fase de laboratorio .....	43
<i>Clarificación de muestra</i> .....	43
<i>Concentración de partículas virales</i> .....	44
<i>Cultivo celular</i> .....	45
<i>Extracción de ARN viral en cultivo celular</i> .....	50
<i>Extracción de ARN viral en muestras crudas</i> .....	51
<i>RT-PCR</i> .....	51
<i>PCR anidada</i> .....	52
CAPÍTULO V RESULTADOS .....	54
Cultivo celular .....	55
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	61
CAPITULO VI DISCUSIÓN .....	73
CAPÍTULO VII CONCLUSIONES .....	82
RECOMENDACIONES .....	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	86
ANEXOS .....	95

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo.....	41
Tabla 2. Codificación de las muestras, según el punto de muestreo, matriz y mes en que se realizó la colecta.....	43
Tabla 3. Volumen de soluciones para la preparación de medio de cultivo de crecimiento 10% y mantenimiento 2% en volumen final de 500 mL.....	49
Tabla 4. Criterio para valorar la sensibilidad en la línea celular según la proporción de las células que manifiestan efecto citopático (ECP).....	50
Tabla 5. Cebadores o Primers que se utilizarán en la RT-PCR y PCR anidada.....	53
Tabla 6. Efecto citopático en muestras de aire en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.....	56
Tabla 7. Efecto citopático en muestras de agua en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.....	58

## INDICE DE IMAGENES

Figura 1. Puntos de muestreo.....	40
Figura 2. Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de aire.....	55
Figura 3. Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de agua.....	57
Figura 4. Viabilidad de Virus Entéricos por ECP en matriz de agua y aire de doce puntos de la Bahía de Panamá.....	59
Figura 5. Viabilidad de Virus Entéricos por ECP en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.....	60
Figura 6. Viabilidad de Virus Entéricos por ECP en doce puntos de la Bahía de Panamá en la estación lluviosa del 2019.....	61
Figura 7. Estandarización de las condiciones de PCR para la detección de <i>Enterovirus</i> .....	62
Figura 8. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en cultivo celular, muestras 1 – 24.....	63
Figura 9. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en cultivo celular, muestras 25 – 48.....	64
Figura 10. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en cultivo celular, muestras 49 – 72.....	65
Figura 11. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en muestras crudas, muestras 1 – 24.....	67
Figura 12. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en muestras crudas, muestras 25 – 48.....	68
Figura 13. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en muestras crudas, muestras 49 - 72.....	69
Figura 14. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en matriz de agua y aire de doce puntos de la Bahía de Panamá, en muestras de cultivo celular y muestras crudas.....	70
Figura 15. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019, en muestras de cultivo celular y muestras crudas. .....	71
Figura 16. Detección de <i>Enterovirus</i> por PCR en doce puntos de muestreos de la Bahía de Panamá en la estación lluviosa del 2019, en muestras de cultivo celular y muestras crudas.....	72
Figura 17. Punto de muestreo N°1 Costa del Este.....	96
Figura 18. Punto de muestreo N°2 Panamá Viejo.....	96

Figura 19. Punto de muestreo N°3 Coco del Mar.....	97
Figura 20. Punto de muestreo N°4 Boca La Caja.....	97
Figura 21. Punto de muestreo N°5 Club Unión.....	98
Figura 22. Punto de muestreo N°6 Río Matasnillo.....	98
Figura 23. Punto de muestreo N°7 Hospital Santo Tomás.....	99
Figura 24. Punto de muestreo N°8 Mercado Marisco.....	99
Figura 25. Punto de muestreo N°9 Las Bóvedas.....	100
Figura 26. Punto de muestreo N°10 Avenida Los Poetas.....	100
Figura 27. Punto de muestreo N°11 Antiguo Autoridad de la Región Interoceánica (ARI)...	101
Figura 28. Punto de muestreo N°12 Isla Flamenco.....	101
Figura 29. Preparación del sistema de recolección de muestras de aire.....	102
Figura 30. Lavado del sistema de recolecta de muestras de aire.....	102
Figura 31. Sistema y recolecta de muestras de agua.....	103
Figura 32. Agar utilizado para la preparación del gel de agarosa 2%.....	103
Figura 33. Cámara de electroforesis con muestras inoculadas en el gel.....	104
Figura 34. Preparación de cultivo celular.....	104

# **RESUMEN**

Los virus entéricos humanos representan un excelente indicador de contaminación fecal en agua (Albinana-Gimenez, 2009; Lambertini, *et al.*, 2008) y se han documentado como patógenos importantes que puede llegar a las personas a través de una vía aérea en la zona costera. Se recolectaron 36 muestras de agua y aire en 12 puntos de la Bahía de Panamá durante los meses de septiembre, octubre y noviembre del 2019. Se realizó clarificación y concentración viral mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) y cultivo en la línea celular Vero. Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el kit GenElute™ Total RNA Purification (Merck, Alemania) en muestras de cultivo celular y el Kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen, EEUU) en muestras crudas. Se estandarizó una RT-PCR y PCR anidada con primers específicos para detectar la región conservada 5'NTR del genoma de *Enterovirus*. Se pudo observar, que las muestras en cultivo celular presentaron 100% de viabilidad por efecto citopático (ECP) en muestras de agua y 69% en muestras de aire, en particular en los puntos de Mercado del Marisco, Coco del Mar, Panamá Viejo con 100% de positividad. La PCR de cultivo celular solo detecto Hospital Santo Tomas en matriz de aire y mes de octubre como la única muestra positiva para *Enterovirus*, sin embargo, en muestras crudas, se detectó 33% de positividad para *Enterovirus* en muestras de agua y aire, destacando a Club Unión como el punto con el mayor porcentaje de positividad con 66%, al igual que el mes de noviembre con 45%. En conclusión, se detectó 61/72 (84%) muestras con viabilidad por ECP en cultivo celular y 24/72 (33%) muestras positivas para *Enterovirus* detectado por PCR. Es importante destacar que este es el primer estudio que se realiza para la detección de *Enterovirus* en matriz de agua y aire en espacios abiertos de Panamá.

**Palabras claves:** *Enterovirus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, Bahía de Panamá, Cultivo celular, RT-PCR anidada.

# **ABSTRACT**

Human enteric viruses represent an excellent indicator of fecal contamination in water (Albinana-Gimenez, 2009; Lambertini, et al., 2008;) and have been documented as important pathogens that can reach people through water and air in the coastal area (Pendergraft, et al., 2021). 36 water and air samples were collected in 12 points of the Bay of Panama during the months of September, October and November 2019. Clarification and viral concentration were carried out by precipitation with polyethylene glycol (PEG) and cultivated in the Vero cell line. For nucleic acid extraction, the GenElute™ Total RNA Purification kit (Merck, Germany) was used in the samples in cell cultivation and the PureLink™ Viral RNA / DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) was used in crude samples. RT-PCR and nested PCR were standardized with specific primers to detect the conserved 5'NTR region of the *Enterovirus* genome. Samples from cell culture presented 100% of viability by cytopathic effect (CPE) in water samples and 69% in air samples, in particular in the points of Mercado del Marisco, Coco del Mar, Panamá Viejo with 100% of positivity. The PCR only detected Hospital Santo Tomas in air matrix and the month of October as the only positive sample for *Enterovirus* in cell cultivation. However, in raw samples, 33% positivity for *Enterovirus* was detected in water and air samples, highlighting Club Unión as the point with the highest percentage of positivity with 66%, like the month of November with 45%. In conclusion, 61/72 (84%) samples with viability by CPE were detected in cell culture and 24/72 (33%) samples were positive for *Enterovirus*. It is important to highlight that this is the first study carried out for the detection of *Enterovirus* in a matrix of water and air in open spaces in Panama.

**Keywords:** *Enterovirus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, Panama Bay, Cell cultivation, nested RT-PCR.

# **INTRODUCCIÓN**

Los virus entéricos han sido reconocidos mundialmente como agentes infecciosos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas a través del agua y el aire. Por lo que, la detección de estos patógenos en el ambiente es extremadamente importante con el fin de salvaguardar la salud pública (Saavedra *et al.*, 2012).

Los virus entéricos incluyen una amplia gama de especies, algunos de los cuales son causas importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Los diferentes virus entéricos difieren en estructura, composición, ácidos nucleicos y morfología, así como en la cantidad y frecuencia de excreción, supervivencia ambiental y resistencia a los procesos de tratamiento del agua (Gerba, 2013).

Los virus entéricos asociados a enfermedades gastrointestinales en humanos pertenecen a las familias Adenoviridae (*Adenovirus*), Caliciviridae (*Norovirus*, *Sapovirus*), Hepeviridae (*Virus hepatitis E*), Picornaviridae (*Enterovirus* y *Virus hepatitis A*), Reoviridae (*Reovirus* y *Rotavirus*) y Astroviridae (*Astrovirus*). Estos infectan las células del tracto gastrointestinal del hospedero y allí se multiplican o replican (Saavedra *et al.*, 2012).

Las infecciones por virus entéricos presentan síntomas clásicos como diarreas y vómitos, confundiéndose con otras infecciones por otros microorganismos, lo que podría llegar a causar severos problemas de salud si no se detectan a tiempo (Espigares-García, 2006). Estas infecciones se pueden dar por vía aérea mediante aerosoles, ingestión de agua o alimentos contaminados, diseminándose y persistiendo en el ambiente por medio de materia fecal (Bofill-Mas *et al.*, 2005; De La Rosa *et al.*, 2002).

Los virus entéricos son particularmente abundantes en las aguas residuales urbanas, como resultado de la elevada excreción de partículas virales con las heces ( $10^5$  -  $10^{11}$  partículas virales/g de heces), logrando la transmisión por vía respiratoria al formarse bioaerosoles o al

encontrarse en el agua. Debido a la alta especificidad de hospedero que tienen los virus entéricos, su detección en el ambiente permite determinar que existe contaminación fecal de origen humano (Schwab, 2007; Fong y Lipp, 2005; Carter, 2005; Moe, 2002).

La Bahía de Panamá, considerada como área protegida, se encuentra sobre terrenos privados y estatales, en donde se da una amplia gama de actividades: parques industriales, urbanizaciones, autopistas, pesca a menor escala, extracción de almejas y agricultura (Pinto y Yee, 2011).

Las grandes infraestructuras, edificaciones, inmuebles, comercios e incluso los cultivos cercanos a los ríos Matasnillo, Matías Hernández y Pacora, entre otros, que desembocan en la Bahía de Panamá, han provocado la situación actual de descargas de aguas residuales domésticas, urbanas e industriales sin tratamiento alguno, y como consecuencia, la contaminación del agua (Pinto y Yee, 2011; ARAP, 2010) y el aire en la bahía (González y González, 2015).

Actualmente se está intentando llevar a cabo el proyecto de recuperación de las playas de la Bahía de Panamá para fines recreacionales, específicamente en las zonas de Paitilla, San Francisco y el Mercado de Marisco, en paralelo al plan de saneamiento de la Bahía de Panamá mediante las operaciones de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) en Juan Díaz (Arcia, 2019; Capital-Financiero, 2019; Inauguración, 2013). Sin embargo, existen estudios realizados anteriormente que indican que se encuentra una apreciable contaminación en sectores de la bahía que impide convertir secciones de esta en áreas de recreo (Averza, 2010; Ingemar-Panamá, 2005).

Panamá cuenta con una guía nacional de epidemiología en su tercera edición, elaborada por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud (MINSAL). En la sección “guía para el

abordaje de algunos eventos de salud con objetivo de notificación obligatoria” se encuentran registros de enfermedades causadas por virus entéricos. Entre estos están: *Rotavirus*, *Virus hepatitis A* y *E*; sin embargo, no existen registros hasta la fecha del resto de las especies. Por otra parte, tampoco se conocen las estadísticas anuales de infección por virus entéricos en la ciudad capital, ni en el interior del país, debido a que la detección de virus entéricos es un poco costosa (MINSA, 2018).

De acuerdo con el Departamento de Epidemiología del MINSA, en el año 2018 se notificaron 5321 casos de enfermedades diarreicas para la semana 42 (15 de oct- 21 de oct) y 4919 de lo que va en la de semana 42 (13 de oct- 19 de oct) del 2019. En los acumulados en el año 2018 hasta la semana 42, se habían registrados 217160 casos, en contraste con los 228,450 observados en el 2019 (5.1% más). Para las últimas semanas de octubre de 2019, se registraron 4919 casos de enfermedad diarreica, lo que representa una incidencia de 116.6 casos por cada 100000 habitantes y se reporta que continúa el incremento en el número de casos notificados (MINSA, 2019).

Además de los datos epidemiológicos del 2018-2019 por parte del MINSA, existen estudios realizados en el país donde se demuestra la relación de la época del año con la presencia de microorganismos indicadores de contaminación ambiental (De La Cruz-Lombardo, 2018; Samudio y Garibaldo, 2017) y donde se demuestra que uno de los focos más importantes de contaminación en nuestro país es la Bahía de Panamá.

Este trabajo de investigación tiene como finalidad demostrar la presencia de virus entéricos en muestras de agua y aire en 12 puntos de la Bahía de Panamá y su posible acción sobre el ser humano.

# **CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO**

Los virus entéricos han sido reconocidos mundialmente como agentes infecciosos involucrados en brotes de enfermedades transmitidas a través del agua y el aire. Por lo que, la detección de estos patógenos en el ambiente es extremadamente importante con el fin de salvaguardar la salud pública (Saavedra *et al.*, 2012).

Los virus entéricos son virus desnudos con una cápside resistentes que les permite sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables y resistir las condiciones de acidez, y de actividad proteolítica del estómago en su camino hacia el duodeno, donde infectan las células epiteliales vulnerables (Grabow *et al.*, 2001). Son estas características las que hacen de los virus entéricos unos excelentes microorganismos indicadores de contaminación fecal, debido a que la capacidad de sobrevivencia de las bacterias fecales en medios acuáticos y su sensibilidad a los procesos de tratamiento y desinfección, es baja en comparación a los virus (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Las infecciones por virus entéricos presentan síntomas clásicos como diarreas y vómitos, confundándose con otras infecciones por otros microorganismos, lo que podría llegar a causar severos problemas de salud si no se detectan a tiempo (Espigares-García, 2006). Estas infecciones se pueden dar por vía aérea mediante aerosoles, ingestión de agua o alimentos contaminados, diseminándose por medio de materia fecal y persistiendo en el ambiente (Bofill-Mas *et al.*, 2005; De La Rosa *et al.*, 2002).

Recientemente, se han reportado nuevos virus entéricos y algunos virus emergentes asociados con enfermedades gastrointestinales (*Picobirnavirus* de la familia Picobirnaviridae y *Aichivirus* de la familia Picornaviridae), enfermedades del sistema nervioso central (*Parechovirus* de la familia Picornaviridae), así como afecciones pulmonares y hepáticas

(*Torque Teno Virus* de la familia Anelloviridae) (Kingsley, 2016). Hay además evidencia sobre la acelerada tasa de mutación que ocurre en los virus ARN, lo cual les permite cambios y adaptaciones para atravesar la barrera de especies y causar coinfecciones en animales y humanos, tal como ocurre con la transmisión zoonótica del virus de la hepatitis E entre humanos y cerdos. En este sentido, los reservorios animales complican los esfuerzos dirigidos a controlar la diseminación de las infecciones virales, incrementando el potencial para la formación de nuevas cepas mutantes (Giordano *et al.*, 2011; Reynolds, 2010; Hino y Miyata, 2007; Oh *et al.*, 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018), estima que estas enfermedades se encuentran entre las 10 principales causas de muertes a nivel mundial, ocupando el segundo lugar entre las causas de muerte por enfermedades infecciosas en países de bajos ingresos económicos, después de las infecciones respiratorias, ocasionando cerca de 2 millones de muertes al año, principalmente en niños menores de cinco años.

### **Origen y distribución de los virus en el ambiente acuático.**

Desde los inicios de la virología ambiental, en los años 40 del siglo XX, se han ido estudiando y conociendo los virus excretados al medio ambiente a través de la contaminación fecal, contaminando el agua y alimentos, y por ende, representando un riesgo sanitario para la población. Dentro de las enfermedades infecciosas, los virus entéricos son los principales causantes de brotes relacionados con la contaminación del agua y los alimentos en los países más desarrollados, aunque la mejora de los tratamientos de depuración de las aguas residuales ha reducido la transmisión de la mayor parte de los patógenos bacterianos en estos países (Bofill-Mas *et al.*, 2005).

El agua puede ser uno de los principales vehículos de transmisión masiva de agentes infecciosos, incluidos los virus. Se han identificado diferentes especies virales de las cuales cerca de 100 pueden afectar a la población humana y a diferentes especies de animales. Entre estos, se encuentran los virus entéricos que incluyen especies de diferentes Familias y los más representativos por su impacto en la salud humana son los *Enterovirus* (*Poliovirus*, *virus huérfano citopático entérico humano*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*, *otros enterovirus humanos*), *Astrovirus*, *Adenovirus*, *Ortorreovirus*, *Calicivirus* (*Norovirus* y *Sapovirus*) y *Virus hepatitis A* y *E* (Pelález *et al.*, 2016).

Los virus entéricos son transmitidos principalmente por la vía oral-fecal y causan enfermedades como hepatitis, gastroenteritis, meningitis, encefalitis, afecciones respiratorias y cutáneas, diabetes, conjuntivitis, entre otras. Los virus llegan al medio ambiente y en especial, a los recursos hídricos, a través de fugas en los sistemas de alcantarillado, pozos sépticos, en descargas de aguas residuales, vertimientos urbanos y agrícolas, lo cual, como es de esperar, afecta a la población humana (Pelález *et al.*, 2016).

### **Origen y distribución de los virus en el ambiente aéreo.**

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que los virus pueden propagarse de un huésped a otro utilizando el aire para su transporte. La capacidad del virus de la fiebre aftosa (FA) de propagarse por el aire se ha estudiado y revisado a lo largo de los años. Los modelos de dispersión basados en datos meteorológicos e información sobre la propagación de la fiebre aftosa al comienzo de la epidemia de 1967-1968 en el Reino Unido, sugirieron firmemente que la infección puede haberse propagado por la ruta aérea a una distancia de 60 km (Gloster, *et al.*, 2005). También se informó de la transmisión aérea de la fiebre aftosa durante la

epidemia de 1982-1983 en Dinamarca. En el último caso, un análisis de la dinámica epidemiológica utilizando métodos moleculares junto con datos meteorológicos concluyó que la infección se había propagado por aire a una distancia de 70 km (Verreault *et al.*, 2008).

Muchos microorganismos que viven en la hidrosfera y litosfera pueden encontrarse en el aire donde viven, se alimentan y se reproducen permanentemente. Son microbios alóctonos, procedentes del suelo, agua y seres vivos. Los movimientos del aire y de los seres vivos son los que sitúan a los microorganismos en la atmósfera. Junto al suelo hay una capa laminar de aire que impide el paso de microorganismos del suelo al aire y para que pasen se necesita una fuerte corriente de aire que levante polvo del suelo o agua de sus depósitos. Además, las plantas los lanzan en sus movimientos de dehiscencia y diseminación en forma de polen o esporas, y los animales en los actos respiratorios normales y anormales (De la Rosa *et al.*, 2002).

A menudo, tanto las esporas como los microorganismos vegetativos, entran en la atmósfera como bioaerosoles, que pueden formarse por muchas causas: lluvia, movimiento del agua en los ríos y mar, tratamiento de aguas residuales, aspersores de riego, secreciones respiratorias del hombre y de los animales. Ésta última, es muy importante en la dispersión de bacterias patógenas y virus animales. También, los microorganismos pueden encontrarse en el aire sobre partículas de polvo o en el suelo (Atlas y Bartha, 2002).

La distribución de los microorganismos en la atmósfera cambia según la altura ( $10 - 10^4$  por  $m^3$ ), obteniéndose el más alto junto al suelo, sobre todo en los dos metros inferiores, que constituyen el microclima del hombre, disminuyen hasta los 200 m y luego, se hacen más

escasos hasta los 5000 m. Su presencia es rara hasta el límite de la troposfera y no se encuentran en la estratosfera (De la Rosa *et al.*, 2002).

El número de microorganismos del aire en las zonas pobladas depende de la actividad en esa zona, tanto industrial como agrícola, así como de los seres vivos y la cantidad de polvo. El número de microorganismos es mayor en las zonas pobladas y después en el mar, cerca de las costas. En las zonas desérticas no hay más que lo que aportan los vientos de las zonas habitables próximas y en los casquetes polares no hay nada. En las zonas con clima seco, el aire contiene numerosos microorganismos y el número desciende después de la lluvia, debido a que ésta los arrastra por lavado del aire (De la Rosa *et al.*, 2002).

#### **Enfermedades víricas transmitidas por el agua.**

A nivel mundial, la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por el agua se han relacionado con la presencia de virus entéricos capaces de causar infección (Bracho *et al.*, 2008). Entre los virus que infectan al hombre, existen muchos tipos diferentes que se excretan en grandes concentraciones en las heces de personas con gastroenteritis o hepatitis y en menores concentraciones en heces u orina de individuos sanos, por lo que los virus humanos están presentes en grandes cantidades en aguas residuales urbanas y son considerados contaminantes ambientales (Bofill-Mas *et al.*, 2005). Otro virus ampliamente reportado como causante de gastroenteritis por consumo de agua contaminada en todo el mundo es el *Adenovirus*, específicamente sus serotipos entéricos 40 y 41, los cuales han sido reconocidos como uno de los agentes etiológicos más importantes que causan diarreas en niños, y se cree que a nivel mundial, es el principal responsable de los casos de gastroenteritis transmitidos por el agua en los que no se ha podido identificar el agente causal (Bracho *et al.*, 2008).

Por otra parte, existen estudios que demuestran la presencia de *Rotavirus* y *Enterovirus* en aguas sometidas a un proceso de potabilización, en los que se cumplía con los valores estándar de calidad para aguas potables (0 UFC coliformes/100 mL, concentración de cloro libre superior a 0.5 mg/L). En el mismo estudio, se describe un brote de gastroenteritis que afectó a 7900 individuos y 36 casos de hepatitis A, relacionados con la contaminación de los pozos de suministro con aguas residuales. El agua de los pozos se sometía habitualmente a un proceso de cloración antes de distribuirse por la red (Keswick *et al.*, 1984).

Los brotes de infecciones asociados al agua potable son usualmente el resultado de uno de los siguientes eventos: inadecuada eliminación de microorganismos durante el tratamiento, fracaso en los procesos de tratamiento, especialmente en la cloración u otros sistemas de desinfección, rotura de la integridad de la infraestructura de distribución o de eliminación de aguas residuales. Sin embargo, ha sido más problemático determinar el uso recreativo del agua como causa de infección viral, siendo los riesgos más frecuentes asociados con piscinas y balnearios (conjuntivitis por *Adenovirus* y transmisión de *Poliovirus* y *Echovirus*). Las infecciones virales transmitidas a través de las actividades recreativas en aguas de mar, son particularmente difíciles de confirmar y cuantificar (García, 2006).

### **Enfermedades víricas transmitidas por el aire.**

Numerosas enfermedades víricas humanas se transmiten a través del aire, produciendo infecciones en el aparato respiratorio superior (resfriado y faringitis) e inferior (laringitis, gripe, bronquitis y neumonías) o afectando a otros órganos y tejidos (sarampión, paperas, rubeola, viruela, varicela, poliomielitis). Además, estudios de algunos brotes de gastroenteritis producidas por el *virus de Norwalk* y *Rotavirus*, indican que, aparte de la transmisión oral-

fecal, podía existir transmisión aérea mediante los bioaerosoles formados durante el vómito (De la Rosa *et al.*, 2002). Se ha demostrado que los vómitos son la principal fuente de *Norovirus* en el aire e implican una conexión entre el virus y los brotes. La presencia de ARN de *Norovirus* en partículas submicrométricas indica que la transmisión aérea puede ser una ruta de transmisión importante (Alsved *et al.*, 2019).

La transmisión de enfermedades víricas por medio del aire depende de una diversidad de variables físicas endémicas de la partícula infecciosa y de los factores ambientales que influyen sustancialmente en la eficacia de la transmisión de la enfermedad. Los factores ambientales más citados como la modificación de la transmisión aérea de la enfermedad son humedad, temperatura, oxígeno y radiaciones (De la Rosa *et al.*, 2002).

#### **Detección de virus en ambientes acuáticos.**

Los métodos disponibles hoy en día para la detección de virus transmitidos a través del agua incluyen tres pasos básicos: concentración a través de filtración por membrana, concentración secundaria a través de centrifugación o por precipitación con polietilenglicol (PEG), amplificación a través de cultivo celular y detección por métodos moleculares. En los últimos años el desarrollo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a la posibilidad de caracterizar genéticamente con relativa facilidad los virus detectados, ha permitido obtener una información más completa y real de muchos de los virus excretados que no pueden cultivarse de forma eficiente en líneas celulares (Saavedra *et al.*, 2012). Las técnicas de cuantificación de virus por PCR a tiempo real se están desarrollando actualmente y se han utilizado en la cuantificación de *Adenovirus*, *Poliomavirus*, *Enterovirus* y *Norovirus* (Bofill-Mas *et al.*, 2005).

### **Detección de virus en ambiente aéreo.**

La mayoría de las tecnologías de muestreo de aire dependen del diámetro aerodinámico de las partículas en el aire, las propiedades de adhesión de esas partículas, el movimiento browniano, los gradientes térmicos y la inercia de las partículas. Las partículas en aerosol se adhieren a cualquier superficie con la que entran en contacto. Varios dispositivos de muestreo se pueden utilizar para recuperar virus en el aire, siendo los más comunes, los impactadores de líquidos y sólidos, así como los filtros. También se han probado precipitadores electrostáticos (Verreault *et al.*, 2008).

El borboteo en líquidos para la detección de virus en el aire consiste en separar los virus contenidos en este y que se depositen en un medio líquido mediante un flujo de aire. El flujo de aire puede ser de 12.5 o 20 L/min. Este método requiere una bomba de vacío y dispositivos también llamados “trampa líquida” que hacen pasar el aire mediante un aspirador, a través de líquidos (generalmente soluciones tampón diluidas) que retienen los virus. Este líquido puede ser analizado con ensayos bioquímicos para determinar endotoxinas (LAL), sondas genéticas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunoensayo y citometría de flujo (De La Rosa *et al.*, 2002).

### **Gastroenteritis Vírica.**

Las gastroenteritis víricas son un problema clínico frecuente que está infra diagnosticado. Se calcula que los virus son el agente etiológico de un 30 a 40% de los cuadros de diarrea a nivel mundial, aunque en la mayoría de los casos no son diagnosticados. Entre los microorganismos conocidos como causa de cuadros de gastroenteritis agudas (GEA) y cuya patogenia está mejor estudiada, se encuentran *Rotavirus* del grupo A, *Adenovirus* grupo F (serotipos 40 y 41),

*Norovirus*, virus esféricos de pequeño, tamaño como *Astrovirus*, *Enterovirus*, *Parvovirus* y otros menos comunes como *Coronavirus*, *Torovirus* y *Reovirus* (Valriberas *et al.*, 1999).

La frecuencia de *Rotavirus* como causa de casos esporádicos de GEA oscila entre el 17.3% y el 37.4%. Aunque se ha sugerido que la exposición común no tiene mucha importancia para la difusión de este virus, resulta difícil relacionar casos aparentemente esporádicos, por lo que probablemente haya brotes que no llegan a detectarse (Domínguez *et al.*, 2009). Las especies de *Astrovirus* causan GEA con una frecuencia que oscila entre un 2 y un 26% y se han descrito brotes en escuelas y guarderías, pero también en población adulta y en ancianos (Matsui, 1996). La frecuencia con que se identifican las especies de *Adenovirus* 40 y 41 como causa de GEA esporádica en niños no inmunodeprimidos oscila entre 0.7% y 31.5%, aunque probablemente haya subdetección debido a que la sensibilidad de las técnicas convencionales es baja (Marie-Cardine, *et al.*, 2002). Los *Calicivirus* se separan filogenéticamente en dos géneros: *Norovirus* y *Sapovirus*. Los *Norovirus* se asocian frecuentemente con brotes de GEA transmitidos por agua y alimentos. Se estima que el 40% de los casos de GEA por *Norovirus* están vehiculados por alimentos. En Suecia y en algunas zonas de Estados Unidos de América (EEUU), es la primera causa de brotes de toxiinfecciones alimentarias (Domínguez *et al.*, 2009).

### ***Enterovirus.***

#### ***Historia.***

Las especies de *Enterovirus* fueron reconocidas como grupo en 1957 (Committee on the Enteroviruses, 1957), englobando a *Poliovirus*, *Coxsackievirus* y *Echovirus*, cuyo hábitat natural es el intestino humano (Pina, 2001). Desde su descubrimiento en 1954, el aislamiento

en cultivo celular se mantiene como la técnica de referencia para el diagnóstico de *Enterovirus*. Sin embargo, con esta técnica, un aislamiento puede ser identificado sólo por la observación del efecto citopático (ECP), lo cual requiere en muchos casos un alto nivel de experiencia (Abraham *et al.*, 1993).

### ***Clasificación.***

La clasificación taxonómica de los diferentes tipos de *Enterovirus* ha ido variando a lo largo de los últimos años. Si bien, anteriormente se describían 5 géneros (*Enterovirus*, *Coxsackie A*, *Coxsackie B*, *Poliovirus* y *Echovirus*), actualmente, basándose en las propiedades genómicas, los diferentes tipos de *Enterovirus* quedan englobados dentro del nuevo género *Enterovirus* que incluye también a los *Rinovirus*. En el género *Enterovirus* se agrupan catorce especies, once denominadas como *Enterovirus* (*Enterovirus A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* y *H*) y tres especies de *Rinovirus* RV-A, RV-B y RV-C. De las 11 especies de *Enterovirus* solo 4 (EV-A, EV-B, EV-C y EV-D) producen infección en humanos. El ARN de cadena simple codifica 4 proteínas de la cápside o estructurales (VP1-VP4) y 7 no estructurales. Las proteínas de la cápside definen el subtipo de virus según la nueva clasificación taxonómica y en gran medida (en especial la región VP1) la respuesta antigénica. Muchos *Enterovirus* conservan además la nomenclatura de anteriores clasificaciones (*Coxsackie*, *Poliovirus* y *Echovirus*), aunque a partir del *Enterovirus* genotipo 68, se sigue una nomenclatura numérica consecutiva según el orden en el que se fueron identificando los nuevos genotipos (Launes y Muñoz-Almagro, 2017).

### ***Morfología y estructura.***

Son virus de ARN monocatenario, pequeños (aproximadamente 30 nm), no envueltos, con una cápside de simetría icosaédrica y con un diámetro que oscila entre 27 y 30 nm (Khetsuriani *et*

*al.*, 2006). El genoma está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva poliadenilada. Los viriones son resistentes en medio ácido (pH 3-5 durante 1-3 h), lo que hace posible su supervivencia en el tubo digestivo (Pina, 2001). El ARN de enterovirus tiene aproximadamente 7.5 kb de longitud y codifica una poliproteína que se procesa para producir las proteínas estructurales y no estructurales maduras. La región codificante está limitada por regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (Khetsuriani *et al.*, 2006).

### ***Organización del genoma.***

Su genoma se divide en 4 regiones que codifican proteínas estructurales y 2 regiones no codificantes, reguladoras. Sus cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína VPg que actúa como cebador en el proceso de replicación del genoma. Dentro de cada grupo, existe un número de serotipos definidos por los epítomos de la cápside que se deben a modificaciones estructurales de la superficie del virión. Los epítomos antigénicos, que definen a cada serotipo, estimulan la formación de anticuerpos específicos que se comportan como neutralizantes de la infección, ya que no permiten su unión al receptor celular. La evolución de los serotipos sigue un proceso de deriva antigénica, en el que durante el proceso de copia del genoma se producen errores que introducen mutaciones puntuales. Estas mutaciones son acumulativas y modifican progresivamente la estructura de la cápside (Sánchez y Martí, 1998).

### ***Epidemiología.***

Los enterovirus son ubicuos en las zonas tropicales y subtropicales. En zonas cálidas que presenten condiciones higiénico-sanitarias deficientes, el grado de infección en niños puede

superar el 50%, apareciendo durante todo el año. Los enterovirus son excretados abundantemente y regularmente a través de las heces (hasta  $10^{10}$  partículas/gramo de material fecal), y su presencia en las aguas contaminadas puede proporcionar mucha información sobre la circulación de los diferentes serotipos de estos virus en la comunidad. La vía de entrada al organismo varía según el virus y según la patología producida. La infección puede producirse por vía fecal-oral, respiratoria-oral, a través de secreciones oculares y respiratorias, o a través de lesiones en la piel. Los niños son los primeros individuos diana y actúan como vehículo de dispersión de la infección. Esta suele producirse fácilmente en el ámbito familiar o en comunidades cerradas, donde el grado de infección puede superar el 80%. Al mejorar las condiciones sanitarias en una comunidad se limita la dispersión de los enterovirus, aumentando así la población no inmunizada durante la niñez, que constituyen un grupo susceptible de infección durante la edad adulta. La estrategia adoptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la erradicación de la poliomielitis se basa en la inmunización masiva. Los patrones epidemiológicos de la poliomielitis se han alterado en la mayor parte del mundo a raíz del inicio de la vacunación a partir de 1955, consiguiendo eliminar los casos producidos por cepas salvajes en muchos países, incluyendo el continente americano (Pina, 2001).

### ***Adenovirus.***

#### ***Historia.***

El *Adenovirus* (AdV), fue descrito por primera vez como agente viral único por Rowe *et al.* 1953, mientras intentaban establecer cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo. Rowe *et al.* reconoció que un agente transmisible no identificado estaba destruyendo a las células

epiteliales y se denominó adenoid degeneration agent. Hilleman y Werner (1954), consiguieron aislar un agente infeccioso a partir de secreciones respiratorias, que inducía cambios citopáticos sobre líneas celulares de origen humano. En este estudio las especies de AdV fueron descritas como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas, infecciones gastrointestinales, urinarias y oculares. Actualmente, se reconoce que las especies de AdV causan con más frecuencia enfermedades del tracto respiratorio. Sin embargo, dependiendo del serotipo infectante, puede causar otras enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, hepatitis y exantema (Bernaola y Luque, 2002).

### ***Clasificación.***

Son virus de ADN de doble cadena desnudos que pertenecen a la familia Adenoviridae y al género *Mastadenovirus* (Bernaola y Luque, 2002). La familia Adenoviridae comprende actualmente cinco géneros: *Mastadenovirus*, que comprende virus que infectan solo especies de mamíferos, incluidos murciélagos, perros, rumiantes, caballos, humanos, cerdos y ratones; *Aviadenovirus*, que comprende virus que infectan solo a las aves; *Atadenovirus*, que incluye virus que infectan una amplia gama de huéspedes, incluidos reptiles, aves, zarigüeyas y rumiantes; *Siadenovirus*, que incluye *Adenovirus* de aves, reptiles y anfibios; e *Ichtadenovirus*, que incluye *Adenovirus* de pescado (Fenner, 2017). En la actualidad, se conocen 88 tipos diferentes de AdV humanos (HAdV), que se han clasificado en siete especies de la A a la G y siguen surgiendo nuevos tipos de *Adenovirus* (Dhingra *et al.*, 2019).

### ***Morfología y Estructura.***

Las partículas víricas presentan una doble cadena de ADN y una cápside desnuda de simetría icosaédrica con un tamaño entre 70 y 90 nm de diámetro. El virión contiene un 13% de ADN

y un 87% de proteína. La partícula está formada por al menos 10 polipéptidos estructurales diferentes. La cápside está constituida por 252 capsómeros (incluyen 240 hexámeros y 12 pentámeros), de la que surgen proyecciones filamentosas con propiedades hemaglutinantes. Los 240 hexones forman 20 caras triangulares del icosaedro y están dispuestos simétricamente de forma que cada uno queda rodeado por otros 6 capsómeros. Doce de los vértices del virión contienen un capsómero con una proyección en forma de antena (fibra) y que está rodeado por otros 5 capsómeros formando un pentón (Green y Pina, 1963).

### ***Organización del Genoma.***

El genoma está constituido por una molécula de ADN bicatenario lineal de 36-38 Kb, que codifica al menos para 10 polipéptidos estructurales (PE) diferentes y 35 proteínas no estructurales (PNE). Presenta una proteína de 55 KDa unida covalentemente al extremo 5' de cada una de las cadenas y repeticiones invertidas redundantes de 103-165 pares de bases (pb) en los extremos. Los dos extremos de la molécula pueden funcionar como origen de replicación. Las dos cadenas del ADN son transcritas (Rekosh *et al.*, 1977).

### ***Epidemiología.***

La infección primaria por AdV ocurre en los primeros años de edad y en la primera década la mayor parte de la población ha experimentado infección. El periodo de incubación oscila entre 2 y 24 días, dependiendo de la localización de la infección viral. El síndrome clínico más frecuente producido por AdV, es la infección respiratoria. La mitad de las infecciones producidas por AdV no ocasionan enfermedad clínicamente evidente y alrededor del 10% de todas las enfermedades respiratorias en niños son producidas por AdV. Además, producen tos, fiebre, angina y rinorrea, síntomas que duran entre 3 y 5 días. También producen fiebre,

faríngea conjuntival (conjuntivitis, faringitis, adenitis cervical y fiebre), queratoconjuntivitis epidémica y cistitis hemorrágica. En cuanto a la diarrea infantil, las especies de AdV, junto a *Rotavirus*, son los patógenos más frecuentes de esta enfermedad. Se observan en grandes cantidades en las heces, pero no son cultivables, por lo que han sido llamados AdV entéricos (tipos 40 y 41). Estudios seroepidemiológicos sugieren que la incidencia real de las infecciones por HAdV podría ser el doble que las estimaciones hechas a partir de los aislados víricos (Pina, 2001).

### ***Rotavirus.***

#### ***Historia.***

El *Rotavirus* (RoV) fue aislado por primera vez en humanos en el año 1973 de la biopsia intestinal de un paciente con diarrea. Su nombre obedece a que tiene un aspecto de "rueda" al observarse mediante microscopía electrónica (Abdelnour, 2016). La Dra. Ruth Bishop es reconocida como la descubridora del RoV en los seres humanos. Aisló el virus de células tomadas de los intestinos de los niños con trastorno gastrointestinal grave, de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de EEUU (National Institutes of Health, USA). La australiana acuñó el término "duovirus", porque el virus fue encontrado en una porción del intestino llamada duodeno. En 1974, un año después del descubrimiento de Bishop, el doctor irlandés Thomas Henry Flewett sugirió el nombre que conocemos hoy para este virus. Flewett señaló que el virus parecía un círculo, por lo que lo llamó "*Rotavirus*", en un guiño a la palabra latina para la rotación de la rueda (Estes y Kapikian, 2007).

### ***Clasificación.***

Pertenece al género *Rotavirus* y es uno de los 15 géneros de la familia Reoviridae que se subdivide en las sub-familias de la Sedoreovirinae (géneros *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* y *Seadornavirus*) y la Spinareovirinae (géneros *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus* y *Oryzavirus*). Se han clasificado diez especies diferentes de rotavirus (A – J) sobre la base de la secuencia y las diferencias antigénicas de VP6 (Crawford *et al.*, 2017). Sin embargo, sólo los grupos A, B y C infectan a los seres humanos, siendo el grupo A el más importante (OPS y OMS, 2009). La clasificación del RoV, de acuerdo con el serotipo, está basada en especificaciones antigénicas de las siguientes proteínas: la proteína VP7, llamada tipo G por ser una glicoproteína, y la VP4, llamada tipo P por ser sensible a la proteasa. Ambas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y están involucradas en la inmunidad protectora (Desselberger, 2014).

### ***Morfología y Estructura.***

Son virus no envueltos de 70-75 nm de diámetro, caracterizados por poseer un genoma de ARN de doble cadena, dividido en 11 segmentos, cubierto por tres capas proteicas concéntricas con simetría icosaédrica, que codifican seis proteínas estructurales PE (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y cinco proteínas no estructurales (NSP1 a NSP5). La cápside externa consiste en una capa triple de proteínas, que está compuesta por las PE VP7 y VP4, y la cápside interna está formada principalmente por la PE VP6 (Álvarez Lara, 2015). La apariencia morfológica de las partículas virales de RoV es distintiva, pudiendo visualizarse tres tipos de partículas por microscopía electrónica. Las partículas completas se asemejan a

una rueda con rayos cortos y bien definidos con borde homogéneo, de ahí su nombre (del latín rota: rueda) (Estes y Kapikian, 2007).

Posee tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales: la partícula completa que contiene las tres capas proteicas, llamada TLP (triple-layered particle), la cual es infecciosa, dado que la presencia de las proteínas VP4 y VP7 en la capa externa le permiten unirse y penetrar en la célula huésped; la partícula con dos capas proteicas o DLP (double-layered particle), no infecciosa pero con capacidad de transcripción, y la partícula que contiene una sola capa de proteínas, core o nucleocápside (SLP, single-layered particle) que tiene la actividad de replicar el genoma viral (Estes, 2001).

#### ***Organización del Genoma.***

Tienen un genoma compuesto por once segmentos de ARN de doble cadena. Los segmentos poseen diversos tamaños, siendo el más grande de 3302 pb (segmento 1) y el más pequeño de 667 pb (segmento 11). La partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para la producción de sus ARNs mensajeros (ARNm) y la replicación viral se lleva a cabo exclusivamente en el citoplasma de la célula hospedadora. El genoma del RoV tiene un tamaño de 18522 pb, el cual codifica para seis PE (VP1-VP7) y para seis PNE. Todas estas PNE interactúan con el ácido nucleico con excepción de la NSP4, ya que esta proteína es la primera enterotoxina viral descrita, a diferencia de las otras PNE, las cuales intervienen en la reproducción viral y en la eficiencia de la formación del virus (Morris y Estes, 2001).

#### ***Epidemiología.***

Se ha estimado que, en los países en vías de desarrollo, más del 10% de las infecciones por *Rotavirus* son graves, produciendo una mortalidad superior al 0.6 % de los casos. La diarrea es

el síntoma predominante en la infección por *Rotavirus*. En los países desarrollados, en los niños menores de 5 años ingresados en el hospital con gastroenteritis, el RoV es el patógeno más comúnmente aislado y los estudios inmunitarios indican que, a los 3 años, el 90% de los niños han tenido una infección por RoV. La diarrea es el principal síntoma de la primoinfección en humanos (García, 2006).

En 2003, se notificaron 114 millones de casos de infección por RoV en niños menores de 5 años en todo el mundo, de los cuales 24 millones requirieron visitas ambulatorias y 2.3 millones de casos requirieron hospitalización. En 2013, los rotavirus se asociaron con un estimado de >200000 muertes en niños menores de 5 años en todo el mundo. Aunque la prevalencia de la infección por RoV en los niños hospitalizados con diarrea es similar en todo el mundo (~ 30–50%), > 90% de los niños con infecciones mortales por RoV viven en países de bajos ingresos. El virus se transmite predominantemente por vía fecal-oral, principalmente por contacto cercano de persona a persona y se necesitan pocos viriones para causar la enfermedad en huéspedes susceptibles. Los fómites contaminados también tienen un papel en la transmisión del RoV, especialmente en entornos de atención fuera del hogar y hospitales. Se ha planteado la hipótesis de que la transmisión del RoV a través de gotitas en el aire explica la rápida adquisición de anticuerpos anti-*rotavirus* en los primeros 3 años de vida, independientemente de las condiciones higiénicas y sanitarias, pero esto no se ha demostrado (Crawford *et al.*, 2017).

El primer episodio de gastroenteritis por RoV es el que se presenta con mayor severidad clínica, disminuyendo la gravedad en los episodios subsiguientes. Las infecciones asintomáticas son frecuentes en los recién nacidos, en los niños mayores y en los adultos. La

reinfección, en general asintomática, se presenta en los contactos adultos. El período de incubación, por lo general, es de 1 a 3 días (Álvarez, 2015). El periodo de incubación y el comienzo de la eliminación de partículas virales en las heces ocurre a las 48 h. Se ha sugerido la transmisión respiratoria pero no existen evidencias de esta teoría. Además del diagnóstico mediante microscopía electrónica, un ELISA está disponible desde hace años y es ampliamente utilizado para el diagnóstico. Los RoV sólo crecen en ciertos tipos de cultivos celulares y no es un método apropiado para el diagnóstico y, además, se utiliza la técnica de RT-PCR (García, 2006).

### **Cultivo Celular.**

El desarrollo de los cultivos celulares, como una técnica moderna y sofisticada, se debe mucho a las necesidades de dos grandes ramas de la investigación médica: la producción de vacunas antivirales y las neoplasias. La estandarización de las condiciones adecuadas para la producción y el ensayo de virus, dieron las bases para el desarrollo de las técnicas modernas de cultivo, particularmente, la producción de células a gran escala y para permitir análisis bioquímicos (Herrero-Uribe *et al.*, 2004).

Una de las desventajas de las técnicas de cultivo es que se deben realizar bajo las más estrictas condiciones de asepsia, ya que las células animales crecen mucho más lentas que la mayoría de los contaminantes como bacterias, levaduras y hongos. Por otro lado, las células de animales multicelulares, a diferencia de los microorganismos, no pueden existir en asilamiento, por lo que no pueden vivir en existencia independiente, sin la provisión constante de un ambiente complejo que simula el plasma sanguíneo o fluido intersticial (Isenberg, 1992).

La incorporación de los antibióticos a los medios de cultivo para prevenir crecimiento bacteriano ha hecho posible el mantenimiento de los cultivos y permitió ensayos por largos periodos, y a gran escala. El uso de cultivos celulares como sistema hospedero para la propagación de virus, es relativamente económico, ya que ha sustituido en muchos casos el uso de animales y huevos embrionarios en el aislamiento, identificación y preparación de antígenos virales (Isenberg, 1992).

Existen gran variedad de líneas celulares para el aislamiento de virus y la escogencia de la línea celular depende: de la sensibilidad de las células a un virus en particular, del tipo de efecto citopático que produce en cada tipo celular, de las características de crecimiento celular, del costo del crecimiento y del mantenimiento de las células en el laboratorio (Herrero-Urib *et al.*, 2004).

Las líneas celulares pueden ser finitas e infinitas o continuas. Las líneas celulares infinitas son usualmente aneuploides y pueden tener un número de cromosomas entre el valor diploide o tetraploide. También, existe una gran variación en el número de cromosomas y por lo tanto, en una sola población, existen células de diferentes números de cromosomas (heteroploidía) (Castaño y Zapata, 2000).

Las líneas celulares que provienen de tejido canceroso como en el caso de HeLA (cáncer de cérvix humano) y Hep-2 (cáncer de la faringe humano), son líneas continuas infinitas al igual que Vero (riñón de mono verde africano). Las líneas celulares MRC-5 y Wi-38 (pulmón humano) son líneas finitas y al igual que las infinitas mencionadas anteriormente, son las líneas celulares más utilizadas. Cabe resaltar que cada línea celular tiene sensibilidad a ciertos virus. Por ejemplo, en el caso de la línea celular Vero, se ha demostrado que es sensible a

virus como el *Poliovirus*, *Adenovirus*, *HSV*, *Virus del Sarampión*, *Paramixovirus* y *Rotavirus* (Herrero-Uribe *et al.*, 2004; Castaño y Zapata, 2000).

Algunos de los métodos que se utilizan para detectar los virus aislados en cultivos celulares son: efecto citopático, tipificación, inclusiones, técnica de placas de Dubelcco, hemadsorción, hemaglutinación e inmunofluorescencia (Herrero-Uribe *et al.*, 2004).

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos cebadores. Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y col. de la compañía californiana Cetus Corporation, la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de cebadores para la secuenciación de ADN (Serrato Díaz *et al.*, 2014). A tres décadas de su aparición, la PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La PCR es sin lugar a dudas la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro*, millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato Díaz *et al.*, 2014).

La PCR es un proceso que consta de tres pasos que forman un ciclo, el cual se repite un número determinado de veces. Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos: desnaturalización, hibridación y extensión. La desnaturalización por calor (usualmente mayor o igual a 90°C) separa la doble hebra de ADN en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos. La fase de hibridación se lleva a cabo usualmente entre 40°C y 65 °C, de acuerdo con la longitud y la secuencia de bases de los cebadores. Esto permite la unión específica de los cebadores a su hebra complementaria de ADN que se separaron durante la desnaturalización. Una vez que los cebadores se unieron a sus secuencias complementarias, se inicia la fase de extensión, en donde se eleva la temperatura entre 68°C y 72°C, y la polimerasa replica las hebras de ADN, incorporando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's). La polimerasa comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3', agregando los nucleótidos correspondientes y así, se obtiene la hebra complementaria de ADN. Es importante agregar a la mezcla de reacción  $Mg^{2+}$ , ya que este ión es un cofactor importante de la polimerasa. Además, la mezcla de reacción debe contar con los dNTP's para la extensión de la cadena de ADN (Herrero-Urbe *et al.*, 2004).

Al final del primer ciclo de la PCR hay dos dobles hebras de ADN idénticas a la original. Este ciclo de tres pasos (desnaturalización, alineamiento y extensión) puede ahora repetirse muchas veces. Conforme la PCR continua, se crean primero dos, cuatro, ocho, 2<sup>n</sup> copias (n= número de ciclos), así se obtienen después de 30 ciclos 1073741824 copias. También, este proceso de la PCR es llamado amplificación debido a que la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objetivo de hacer millones de copias (Herrero-Urbe *et al.*, 2004).

### ***Transcripción Inversa (RT)-PCR.***

Es una variante de la PCR muy utilizada en la que se utiliza ARN como molde inicial en vez de ADN y emplea una transcriptasa reversa (ADN polimerasa dependiente de ARN), para realizar la síntesis de un ADN complementario (ADNc) al ARN. Actualmente en el mercado se cuenta con la posibilidad de adquirir distintas retrotranscriptasas. Las siguientes son dos de las más utilizadas: MMLV (virus de la leucemia murina Moloney) y AMV (virus de la mioblastosis aviaria) (Cariaga y Zapata, 2007).

Se pueden utilizar cebadores hexámeros (oligonucleótidos de 6 nucleótidos de secuencia aleatoria) que se unen al azar en cualquier región del ARN molde o un oligonucleótido o cebador (en general un oligo dT) que permite la captura y la síntesis de un ADNc a partir del ARNm o ARN con colas poliA. Una vez que se obtiene el ADNc, se realiza la PCR convencional (Gonzalo, 2012).

La RT-PCR no debe ser confundida con la PCR en tiempo real, PCR cuantitativa o qPCR, la cual a veces de manera errónea se abrevia como RT-PCR. La amplificación exponencial mediante la RT-PCR supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. La RT-PCR es una metodología utilizada en investigación y en el diagnóstico clínico de enfermedades de origen viral. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus de ARN como los retrovirus (tales como el Virus de Inmunodeficiencia Humana-VIH) o el virus de la gripe (virus de la influenza). En líneas generales, un virus está constituido por proteínas y por un único tipo de ácido nucleico (ADN o ARN). Así la existencia de virus en una muestra, puede ser

diagnosticada si se demuestra la presencia de ciertas regiones génicas conservadas en los distintos tipos virales (Cariaga y Zapata, 2007).

### ***PCR Anidada.***

El ensayo de PCR anidado es un método muy sensible, que permite aumentar el rendimiento y la especificidad de la amplificación del ADN diana, ya que el producto de una primera amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación, con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada (Marrero Domínguez *et al.*, 2017). Se realiza una RT-PCR en una primera ronda que amplifica de manera convencional con los dos cebadores más externos a la región que se desea amplificar. La PCR anidada, emplea una parte de la alícuota (normalmente 1%) de los productos obtenidos durante la RT-PCR primaria y se utiliza como molde para una segunda ronda, con cebadores internos que trabajan sobre cualquier producto específico generado en la RT-PCR primaria, lo que ayuda a mantener la especificidad de la PCR, a través del gran número de ciclos de la PCR primaria y secundaria combinada. La desventaja de esta técnica es la posibilidad aumentada de contaminación y además, no permite cuantificar la cantidad inicial de ADN molde presente en la muestra analizada (Gonzalo, 2012).

### ***Electroforesis.***

La creación de la electroforesis como un método de separación de ADN bicatenario y de cadenas simples, se remonta al año 1962 y elaborado por Matsubara y Takagi, donde se utilizó el almidón como soporte. La necesidad de analizar moléculas de ADN de longitudes variables propició el estudio de otros compuestos que pudieran utilizarse como soporte en las pruebas de electroforesis, surgiendo la agarosa en 1969 como un candidato adecuado debido a las

características que posee. La agarosa es un polisacárido obtenido del aislado de agar de algas rojas marinas, el cual está constituido por unidades repetidas de agarobiosa, sustituida de manera extensa en grupo ester de sulfato, ácido pirúvico cetálico y ésteres metálicos (Montalvo-Navarro y Lugo-Flores, 2019).

# **CAPÍTULO II OBJETIVOS**

**Objetivo general.**

- Determinar la presencia de virus entéricos a partir de muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en estación lluviosa del 2019.

**Objetivos específicos.**

- Realizar colecta de muestras de agua y aire en doce puntos de la Bahía de Panamá
- Procesar muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá mediante clarificación refrigerada y concentración química
- Observar viabilidad viral por efecto citopático en cultivo celular de muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá
- Estandarizar las condiciones de PCR para la detección de virus entéricos.
- Identificar la presencia de virus entéricos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá
- Establecer los sitios de mayor prevalencia de virus entéricos en aire y agua de la Bahía de Panamá.

# **CAPÍTULO III HIPÓTESIS**

## **Hipótesis**

**Ha:** Se detecta virus en muestras de agua y aire, confirmando la presencia de virus entéricos en la Bahía de Panamá en estación lluviosa.

**Ho:** No se detecta virus en muestras de agua y aire, lo que no confirma la presencia de virus entéricos en la Bahía de Panamá en estación lluviosa.

**Hc:** Se logra conocer la prevalencia de virus en los diferentes puntos de la Bahía de Panamá en estación lluviosa por técnicas moleculares y efecto citopático en cultivo celular, confirmando a la Bahía de Panamá como foco de infección por la presencia de virus entéricos en aire y agua.

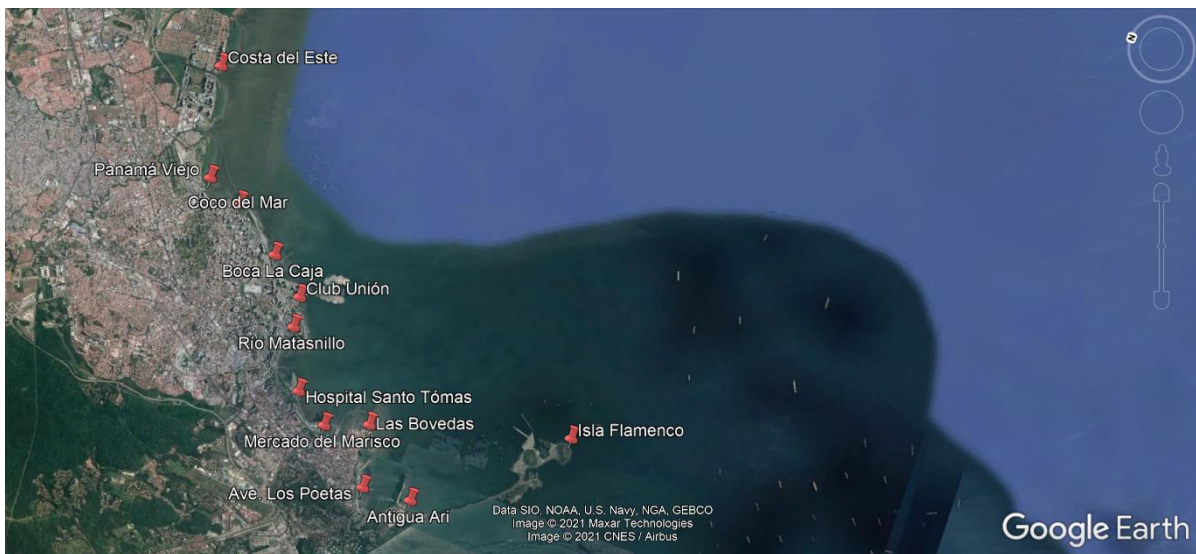
# **CAPÍTULO IV**

# **MATERIALES Y**

# **MÉTODOS**

## Área de estudio

La Bahía de Panamá se encuentra en la república de Panamá con una superficie de 85664.6 hectareas (ha) y con coordenadas  $8^{\circ}53'00.0''N$  y  $78^{\circ}56'00.0''O$ . El estudio se realizó a lo largo de la zona costera en donde se establecieron 12 puntos de toma de muestra (Figura 1). En la región hay una población sub-urbana de 57000 habitantes y una moderada actividad industrial. Los desechos domésticos e industriales son vertidos principalmente en el Río Juan Díaz, aunque una fracción menor se canaliza hacia el Río Matías Hernández (D'Croz y Kwiecinski, 1980).



**Figura 1.** Puntos de muestreo a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá. En total fueron 12 puntos comprendidos en un tramo desde Costa del Este hasta Isla Flamenco.

## **Fase de campo.**

### ***Puntos de muestreo.***

Para llevar a cabo esta investigación, se establecieron 12 puntos a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá, cercanos a los colectores de aguas servidas, en un tramo comprendido entre la urbanización Costa del Este y La Calzada de Amador en Isla Flamenco (Tabla 1).

**Tabla 1.** Puntos de muestreos.

<b>Punto de muestreos</b>	<b>Ubicación en zona costera de la Bahía de Panamá</b>
1	Costa del Este
2	Panamá Viejo
3	Coco del Mar
4	Boca la Caja
5	Club Unión
6	Río Mastanillo
7	Hospital Santo Tomas
8	Mercado del Marisco
9	Las Bóvedas
10	Av. Los Poetas
11	Antigua ARI
12	Isla Flamenco

El muestreo se llevó a cabo durante tres meses de la estación lluviosa (octubre, noviembre y diciembre) del 2019. Para la colecta se escogieron dos días aleatorios por cada mes y se dividieron los 12 puntos descritos anteriormente (6 puntos/día), hasta completar los tres meses.

## **Diseño experimental.**

### ***Agua.***

Las muestras de agua fueron tomadas con la ayuda de un muestreador de aproximadamente 10 metros (m) y depositadas en envases estériles. Se colectaron 1 L de muestra por punto de muestreo al mes, lo que hace un total de 36 muestras/estación lluviosa.

### ***Aire.***

Las muestras de aire fueron tomadas por 1 h de forma continua con la ayuda de un colector (Impinger Agi-30, ACE Glass) conectado a una bomba de vacío con batería que succiona 3 L/min de aire, lo que daba como resultado 180 L de muestra de aire y lo depositaba en 50 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Posterior a cada muestreo, los 50 mL de PBS fueron transferidos asépticamente a un envase estéril de plástico. Se colectaron 50 mL de muestra por punto de muestreo al mes, en total 36 muestras/estación lluviosa.

Para cada toma de muestra, se utilizaron guantes de látex para evitar la contaminación cruzada entre puntos y se lavó el colector con hipoclorito al 10% y agua destilada estéril. Las muestras recolectadas se guardaron en bolsas herméticas dentro de hieleras portátiles con hielo para mantener la cadena de frío al ser trasladadas a los Laboratorios de Microbiología de Agua (LAMA) y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá, hasta su procesamiento y análisis correspondientes.

### Fase de laboratorio.

Una vez las muestras llegadas al laboratorio se procedió a asignarle un código interno único e irrepetible que identificara a las muestras en las siguientes fases de procesamiento y posteriores resultados (Tabla 2).

**Tabla 2.** Codificación de las muestras, según el punto de muestreo, matriz y mes en que se realizó la colecta.

Punto de muestreo	Codificación en matriz de aire			Codificación en matriz de agua		
	Octubre	Noviembre	Diciembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Costa del Este	1	13	25	37	49	61
Panamá Viejo	2	14	26	38	50	62
Coco del Mar	3	15	27	39	51	63
Boca la Caja	4	16	28	40	52	64
Club Unión	5	17	29	41	53	65
Río Mastanillo	6	18	30	42	54	66
Hospital Santo Tomas	7	19	31	43	55	67
Mercado del Marisco	8	20	32	44	56	68
Las Bóvedas	9	21	33	45	57	69
Av. Los Poetas	10	22	34	46	58	70
Antigua ARI	11	23	35	47	59	71
Isla Flamenco	12	24	36	48	60	72

### *Clarificación de muestra.*

#### *Agua*

Cada muestra recolectada de 1 L de agua, se dividió en cuatro partes en una cámara de flujo laminar para evitar algún tipo de contaminación externa. Se agregó 250 mL de la muestra a cuatro botellas estériles con ayuda de una probeta estéril y se centrifugo a 5000 rpm a 4°C durante 10 min. Una vez finalizado el tiempo, se tomó 210 mL del sobrenadante de cada botella y se traspasaron a otras cuatro botellas estériles.

### ***Concentración de partículas virales.***

#### ***Agua***

A las cuatro botellas con 210 mL de sobrenadante de muestra, se le añadió 16.8 g de polietilenglicol (PEG) para llegar a una concentración final del 8%. Las muestras se agitaron a 4°C, con una velocidad en el nivel 20, durante 24 h, en un rodillo automatizado. Pasado el tiempo, se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 30 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 500 µL de solución tamponada salina fosfato (PBS) estéril de botella en botella. Al finalizar la resuspensión de todas las botellas, se sacaron alícuotas en volúmenes de 300 µL en microtubos y se conservaron a -80°C para utilizarlo posteriormente en la extracción de ácidos nucleicos totales y cultivo celular.

#### ***Aire***

Se tomaron 15 mL del total de muestra colectada, se depositaron en un tubo cónico estéril con capacidad para 50 mL y se le añadió 15 mL de PEG al 16% para llegar a una concentración final del 8%. Las muestras se agitaron a 4°C, con velocidad en el nivel 20, durante 24 h, en un rodillo automatizado. Pasado el tiempo, se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de solución tamponada salina fosfato (PBS) estéril. Se sacaron alícuotas en volúmenes de 300 µL en microtubos, y se conservaron a -80°C para utilizarlos posteriormente en la extracción de ácidos nucleicos totales y cultivo celular.

### ***Cultivo celular.***

Para los procedimientos de preparación de medios de cultivo de crecimiento al 10% de suero fetal bovino (SFB) y de mantenimiento al 2% de SFB, crecimiento y mantenimiento de la línea celular, tripsinización o subpasajes, y así, como la infección viral, se siguieron los procedimientos del Manual de Virología Médica (Herrero-Urbe *et al.*, 2004).

### ***Preparación de medios de cultivo de crecimiento al 10% y mantenimiento al 2% de SFB***

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron: Medio Mínimo Esencial Eagle (EMEM) modificado con rojo fenol 1%, SFB inactivado (10% para crecimiento y 2% para mantenimiento), L-Glutamina 100 X, Penicilina/Estreptomina al 100 X,  $\text{NaHCO}_3$  al 7.5% y HEPES 15 mM, todo en un volumen final de 500 mL (Tabla 3).

### ***Crecimiento de cultivo celular***

Para el crecimiento del cultivo celular se utilizó la línea celular Vero (Riñón de Mono Verde Africano) (Donación por el Departamento de Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud). Para la descongelación de la línea celular se sacó el vial del congelador  $-80^{\circ}\text{C}$  y se colocó a  $35^{\circ}\text{C}$  hasta que se descongelara. Una vez descongelada la línea celular, se limpió el exterior del vial con etanol al 70% e introdujo a la cámara de flujo laminar. Se transfirió la línea celular a una botella de cultivo de  $25\text{ cm}^2$  y se agregó 5 mL de medio de cultivo de crecimiento 10%. Seguidamente se rotuló con el pasaje correspondiente, fecha y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se cambió el medio de crecimiento 10% por medio fresco para eliminar efectos tóxicos de los crioprotectores.

El cultivo celular se observó durante una semana hasta que la monocapa celular se adhirió al recipiente y presentaba una forma fibroblástica o fusiformes alargadas. Cuando se observó que la monocapa celular tenía un alto porcentaje de confluencia es decir que había cubierto todo el espacio del recipiente, se cambió el medio de crecimiento 10% por medio de mantenimiento 2%.

### ***Tripsinización y pasaje o sub-cultivo***

Se eliminó el medio de cultivo de mantenimiento 2% de la botella de 25 cm<sup>2</sup>, seguidamente se lavó con 3 mL de solución salina tamponada (PBS) estéril y se descartó en un envase con hipoclorito 0.5%. Se agregó 1.5 mL de tripsina precalentada a 35°C para cubrir la monocapa y se incubó a 37°C durante 15 min. Cada 5 min se observaba al microscopio que las células estuvieran redondas o levantadas. En el caso de no observar ninguno cambio se esperó hasta completar los 15 min o hasta observar cambios visibles en las células. Cuando la mayoría de las células estaban redondas o levantadas se eliminó con cuidado 0.75 mL de tripsina y se incubó a 37 °C por 5 min más. Para acelerar el proceso, se dieron pequeños golpecitos en el costado de la botella de cultivo para que las células se desprendieran por completo de la superficie. Finalmente, se agregó 4 mL de medio de crecimiento 10%, subiendo y bajando suavemente el medio, asegurándonos que topará con la parte en donde las células estaban adheridas a la superficie.

Se traspasó 3 mL del cultivo celular a una botella de 75 cm<sup>2</sup>, se agregó 10 mL de medio de crecimiento 10%, se homogenizó y rotuló con el siguiente pasaje, al igual que la fecha. Al cultivo celular restante en la botella de 25 cm<sup>2</sup>, se le agregó 5 mL de medio de crecimiento al

10% de SFB, se rotuló con el siguiente pasaje y la fecha. Las botellas se incubaron a 37°C hasta realizar el siguiente pasaje.

### ***Preparación de platos para infección viral***

Para preparar los platos era necesario disociar las células adherentes del recipiente en donde se estaban cultivando, y para esto, se realizó el proceso de tripsinización y pasaje descrito con anterioridad a las botellas de 75 cm<sup>2</sup>, cambiando la cantidad de PBS a 5 mL, tripsina a 3 mL y 10 mL del medio de crecimiento al 10% de SFB que se le agregó después de tripsinizar. Se tomó 9 mL de las células con medio de cultivo y se traspasó a un tubo cónico de 50 mL, se agregó 41 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, se homogenizó y rotuló con el siguiente pasaje, así como con la fecha, y este es el cultivo celular que se utilizó para preparar los platos para infección. Al cultivo celular restante en la botella de 75 cm<sup>2</sup> se le agregó 10 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, y se rotuló con el siguiente pasaje, la fecha y se incubó a 37°C hasta realizar el siguiente pasaje.

Para la infección de 72 muestras de agua y aire, se utilizaron cuatro platos de 24 pocillos. Cada plato se rotulo en un extremo con la fecha, el pasaje correspondiente y los dos primeros pocillos como C- y C+, seguido de la enumeración de las muestras. Se agitó el tubo cónico con cultivo celular previamente tripsinizado, de manera circular unas diez veces y se agregó 500 µL a los primeros seis pocillos de la fila, se cerró el tubo cónico, se agitó y se repitió el paso anterior hasta completar todos los pocillos del primer plato. Al terminar, se volvió a colocar la tapa del plato y se agitó fuertemente unas 10 veces a la derecha, y unas 10 veces a la izquierda. Estos pasos se repitieron con los tres platos restantes.

Por cada plato se escogió 3 pocillos al azar (uno arriba, uno en el centro y uno abajo) y se observó en el microscopio invertido, que las células estuvieran dispersas por todo el pocillo, sin aglomeraciones en el centro. En caso de no estar dispersas y acumuladas en el centro, se volvió a agitar nuevamente el plato hacia la derecha e izquierda (10 veces más) hasta lograr una buena distribución. Se colocaron los platos uno encima de otro e incubaron a 37°C durante una semana con revisiones cada día. Transcurrido el tiempo de incubación o al presentar una confluencia de 75 - 80% se cambió el medio de crecimiento al 10% de SFB, a medio de mantenimiento al 2% de SFB.

### ***Infección viral***

Se sacaron los microtubos de muestras del congelador a -80°C y se colocaron a 35°C hasta que se descongelara. Una vez descongeladas, se limpió el exterior de los viales con etanol 70% e introdujeron a la cámara de flujo laminar. Se observó en el microscopio que todos los platos que se iban a utilizar presentaran una confluencia al 70 u 80%. Una vez que se confirmó la confluencia del cultivo celular, se eliminó el medio de mantenimiento al 2% de SFB y seguidamente, se lavó cada pocillo con 250 µL de solución salina tamponada (PBS) estéril, y se descartó en un envase con hipoclorito 0.5%. Luego, se le agregó 150 µL de medio sin SFB al C- y 100 µL al resto de los pocillos de cada plato. Al C+ se le agregó 50 µL de una cepa de *Enterovirus* previamente cultivado en una línea celular VERO y a los pocillos rotulados con el número de muestra, se le agregó 50 µL de cada muestra correspondiente, previamente descongelada, y después, se incubo a 37°C durante 1 h, realizando movimientos circulares a los platos cada 15 min. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el medio en el envase de hipoclorito 0.5% y se le agregó 500 µL de medio de mantenimiento al 2% de SFB a cada

pocillo (Tabla 3). Los platos se incubaron a 37°C con revisiones cada día, hasta observar efecto citopático (ECP) o durante una semana. Se adoptó el criterio para valorar la sensibilidad en la línea celular según la proporción de las células que manifiestan ECP, dando como resultado positivo la presencia viral (Mcintosh, 1996) (Tabla 4).

### ***Clarificación de muestras***

Cada vez que una muestra presentaba ECP se raspó el pocillo con una punta de 1 mL estéril y se traspasó a un microtubo de 1.7 mL estéril. Se congeló durante 15 min a -80°C y pasado el tiempo, se descongeló a 37°C, y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0.22 µm en un microtubo de 1.7 mL estéril, rotulado con el número de muestra y se almacenó a -80°C hasta realizar la extracción de ácidos nucleicos y posterior detección molecular para confirmar la presencia de las partículas virales.

**Tabla 3.** Volumen de soluciones para la preparación de medio de cultivo de crecimiento 10% y mantenimiento 2% en volumen final de 500 mL.

<b>Solución</b>	<b>Medio de crecimiento 10%</b>	<b>Medio de mantenimiento 2%</b>
EMEM + Rojo fenol 1%	423.5 mL	463.5 mL
Suero fetal bovino inactivado	50 mL	10 mL
L-glutamina 100x	5 mL	5 mL
Penicilina 100x	5 mL	5 mL
<i>NaHCO<sub>3</sub></i> al 7.5%	1.5 mL	1.5 mL
Hepes	15 mL	15 mL

**Tabla 4.** Criterio para valorar la sensibilidad en la línea celular según la proporción de las células que manifiestan efecto citopático (ECP) (Mcintosh, 1996).

Nivel	Efecto citopático (ECP) %
-	Ausencia
+	0-25%
++	25-50%
+++	50-75%
++++	75-100% Monocapa destruida

***Extracción de ARN viral en cultivo celular.***

Para la extracción de ARN viral, se utilizó el Kit GenElute™ Total RNA Purification (Merck, Alemania) siguiendo las instrucciones de la casa comercial con algunas modificaciones (Merck, 2016). Se mezcló 200 µL de cada muestra con 400 µL de la solución de lisis (Buffer RL) en microtubos de 1.7 mL rotulados con el número de muestra. Seguidamente se mezcló en un agitador durante 15 s, posteriormente se añadió 200 µL de etanol al 96 – 100% y se volvió a mezclar en el agitador durante 10 s. Una vez terminada la lisis, se traspasó 600 µL del lisado a columnas con tubos de recolección provista por el kit, rotulados con el número de muestra y centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. Se desechó el flujo continuo en un envase de hipoclorito 0.5% y se volvió a ensamblar la columna con el tubo de recolección. Repetimos los pasos anteriores hasta agotar todo el lisado. Agregamos 400 µL de solución de lavado A a la columna con el tubo de recolección y centrifugamos a 14000 rpm durante 1 min, asegurándonos de que toda la solución con etanol haya pasado al tubo de recolección. Se

desechó el flujo continuo en hipoclorito 0.5% y se volvió a ensamblar la columna con el tubo de recolección. Estos pasos se volvieron repetir una vez más con una centrifugación final de 2 min, desechando el tubo de recolección al terminar. La columna se colocó en un microtubo de 1.7 mL provisto por el kit rotulado con el número de muestra y se añadió 35  $\mu$ L de la solución de elución A, asegurándonos que cayera en el centro del filtro que contiene la columna. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 min, seguidamente a 14000 rpm durante 1 min. Luego, las soluciones de ácidos nucleicos totales se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### ***Extracción de ARN viral en muestras crudas.***

Para la extracción de ARN viral, se utilizó el Kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen, EEUU) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Invitrogen, 2016).

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

Para la RT-PCR y PCR anidada se siguió el protocolo estandarizado según las investigaciones realizadas anteriormente sobre detección molecular de *Enterovirus* (Pina, *et al.*, 1998; Casas, *et al.*, 1997) con algunas modificaciones. Se modificaron las temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación al igual que las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , realizando curvas de calibración para estandarizar la RT-PCR.

#### ***RT-PCR***

Para realizar la RT-PCR se utilizó el Kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, EEUU). La reacción de RT-PCR tenía un volumen final de 25  $\mu$ L, de los cuales: 5.0  $\mu$ L representa el producto extraído o control positivo y los 20.0  $\mu$ L restante una solución de mezcla maestra o master mix que contendrá: 12.5  $\mu$ L de mix RT-PCR 2X (Tfl Polimerasa de ADN, dNTPs,

Sulfato de magnesio y Buffer de reacción), 1.0 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward y 1.0 µL de cebadores o primer hacia atrás o reverse (25 µM), 2.5 µL de  $MgCl_2$  a 25 mM, 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 0.5 µL de AMV Transcriptasa Reversa 5u/µL (Tabla 5).

Se utilizó el termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 45 min a 48°C para la retrotranscripción, 3 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 40 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 10 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta almacenar a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

### ***PCR anidada***

La reacción de la PCR anidada tenía un volumen final de 25 µL, de los cuales: 1.2 µL representa el producto final de la RT-PCR y los 24 µL restante una solución de mezcla maestra o master mix que contendrá: 5.0 µL Buffer PCR 5X, 1.25 µL dNTPs 10 mM, 0.2 µL GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EEUU) 5u/ µL, 1.0 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward (25 µM), 1.0 µL de cebadores o primers hacia atrás o reverse (25 µM) (Tabla 5), 4.0 µL de  $MgCl_2$  25 mM y 11.55 µL de agua libre de nucleasas.

Se utilizó el termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 10 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se mantuvo

a una temperatura de 4°C hasta poder almacenar a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

Los productos de PCR se midieron a través de un gel de agarosa al 2% conteniendo 0.5 µg de bromuro de etidio/mL en el tampón de Tris-borate-EDTA (TBE) y se evaluó con un marcador de 100 pb (Promega, EEUU) en un transiluminador BioDoc-It® 220 Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido) bajo luz ultravioleta (UV).

**Tabla 5.** Cebadores o Primers que se utilizaron en la RT-PCR y PCR anidada (Pina, *et al.*, 1998; Casas, *et al.*, 1997).

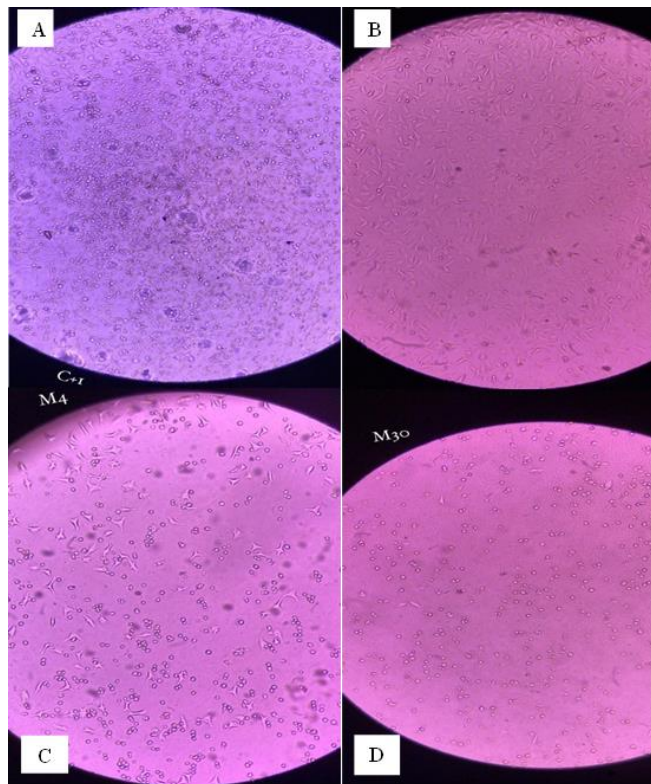
<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño de fragmento (bp)</b>	<b>Gen que amplifica</b>
EV 1F	5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'	540	5'NTR
EV 1R	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'		
EV 2F	5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCG-3'	309	5'NTR
EV 2R	5'-GGATTAGCCGCATTCAGGG-3'		

# **CAPÍTULO V**

# **RESULTADOS**

## Cultivo celular

Las muestras de aire presentaron efecto citopático (ECP) de nivel uno (+) y dos (++). En el mes de octubre se observó cinco muestras con ECP +. Noviembre presentó siete con ECP + y una sola muestra con ECP ++ correspondiente a Las Bóvedas. Por otra parte, en diciembre todas las muestras presentaron ECP de las cuales tres contenían ECP + correspondientes a Club Unión, Mercado del Marisco, Las Bóvedas y nueve con ECP ++ (Tabla 6; Figura 2).



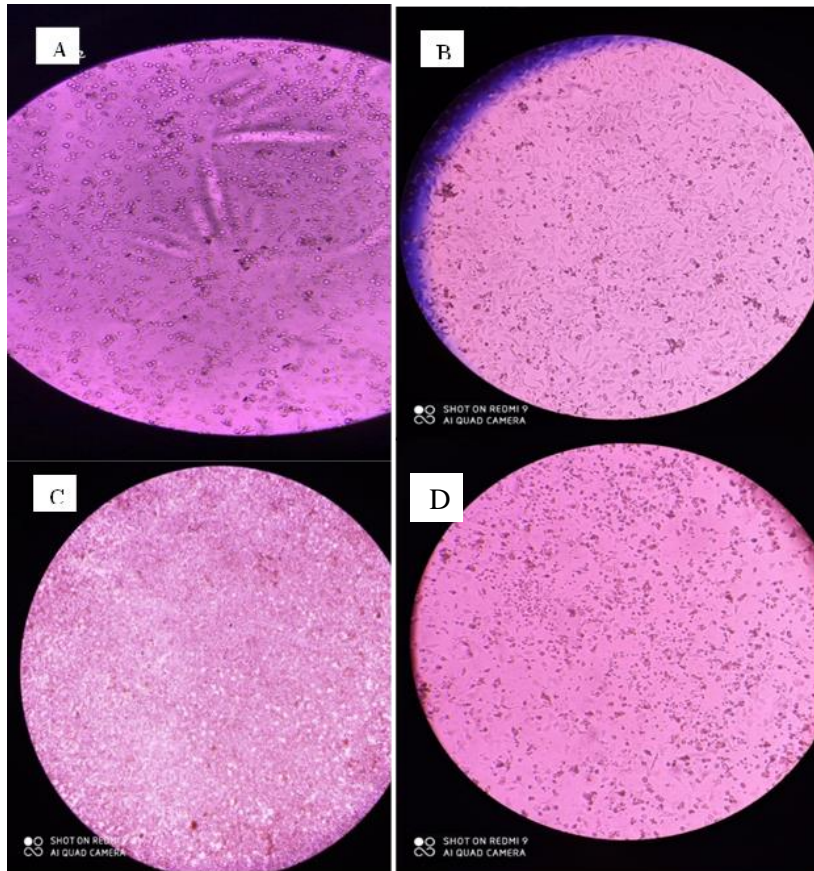
**Figura 2.** Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de aire. A: Células inoculadas con *Enterovirus* (control positivo). B: Células inoculadas con medio de mantenimiento (control negativo). C: Muestra Boca la Caja, mes de octubre, a las 48 h post-infección evidenciando ECP +. Se observa redondeo de células y algunas fusiformes, lisis celular en el 25% del pozo inoculado. D. Muestra Río Matasnillo, mes de diciembre a las 24 h post-infección, evidenciando ECP ++. Se observan células redondeadas y lisis celular en más del 50% del pozo inoculado.

**Tabla 6.** Efecto citopático (ECP) de nivel uno (+) y dos (++) en muestras de aire en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.

Mes	ECP +	ECP ++
Oct	Costa del Este	-
	Panamá Viejo	
	Coco del Mar	
	Boca la Caja	
	Mercado del Marisco	
Nov	Panamá Viejo	Las Bóvedas
	Coco del Mar	
	Hospital Santo Tomas	
	Mercado del Marisco	
	Av. Los Poetas	
	Antigua ARI	
	Isla Flamenco	
Dic		Costa del Este
		Panamá Viejo
	Club Unión	Coco del Mar
	Mercado del Marisco	Boca la Caja
	Las Bóvedas	Río Matasnillo
		Hospital Santo Tomas
		Av. Los Poetas
		Antigua ARI
	Isla Flamenco	

Las muestras de agua presentaron efecto citopático de nivel uno (+), dos (++) y tres (+++). Se observó que todas las muestras mostraban ECP independientemente del mes. En el mes de octubre se observaron tres muestras con ECP ++ correspondientes a Mercado del Marisco, Las Bóvedas, Isla Flamenco y nueve con ECP +++. En noviembre seis muestras presentaron ECP ++ y seis ECP +++. Diciembre es el único mes que presenta una sola muestra con ECP +

correspondiente a Isla Flamenco, seis con ECP ++ y cinco muestras con ECP +++ (Tabla 7; Figura 3).

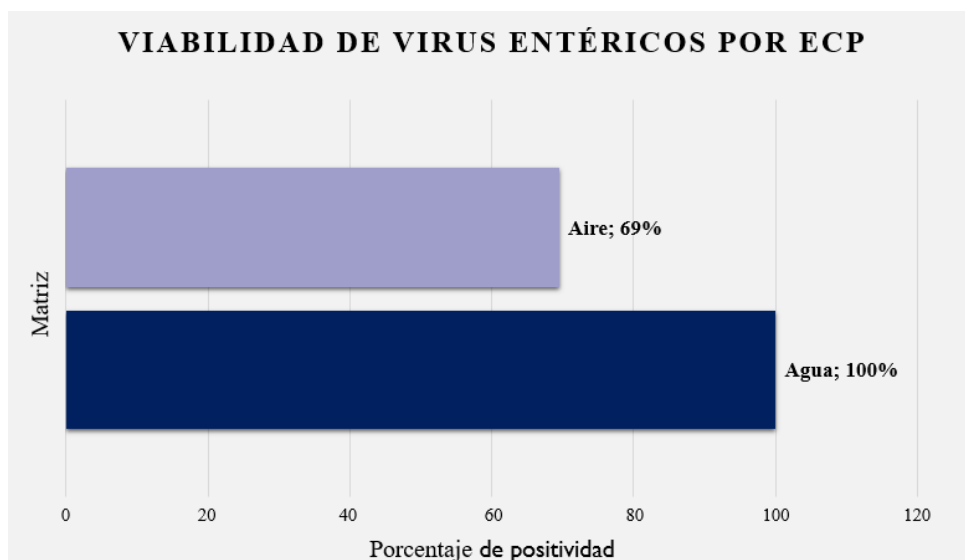


**Figura 3.** Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de agua. A: Células inoculadas con *Enterovirus* (control positivo). B: Muestra Isla Flamenco, mes de diciembre, a las 48 h post-infección evidenciando ECP +. Se observa redondeo de células y algunas fusiformes C: Muestra Coco del Mar, mes de octubre, a las 48 h post-infección evidenciando ECP+++. Se observa las células completamente destruidas, con una lisis celular en más del 75%. D. Muestra Isla Flamenco, mes de octubre a las 24 h post-infección, evidenciando ECP ++. Se observan células redondeadas y lisis celular en más del 50% del pozo inoculado.

**Tabla 7.** Efecto citopático (ECP) de nivel uno (+), dos (++) y tres (+++) en muestras de agua en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.

Mes	ECP +	ECP ++	ECP +++
Oct	-		Costa del Este
			Panamá Viejo
			Coco del Mar
		Mercado del Marisco	Boca la Caja
		Las Bóvedas	Club Unión
		Isla Flamenco	Río Matasnillo
			Hospital Santo Tomas
		Av. Los Poetas	
		Antigua ARI	
Nov	-		Costa del Este
		Coco del Mar	Panamá Viejo
		Hospital Santo Tomas	Boca la Caja
		Mercado del Marisco	Club Unión
		Las Bóvedas	Río Matasnillo
		Av. Los Poetas	Isla Flamenco
		Antigua ARI	
Dic	Isla Flamenco		Costa del Este
			Panamá Viejo
		Río Matasnillo	Boca la Caja
		Hospital Santo Tomas	Av. Los Poetas
		Mercado del Marisco	Antigua ARI
		Las Bóvedas	

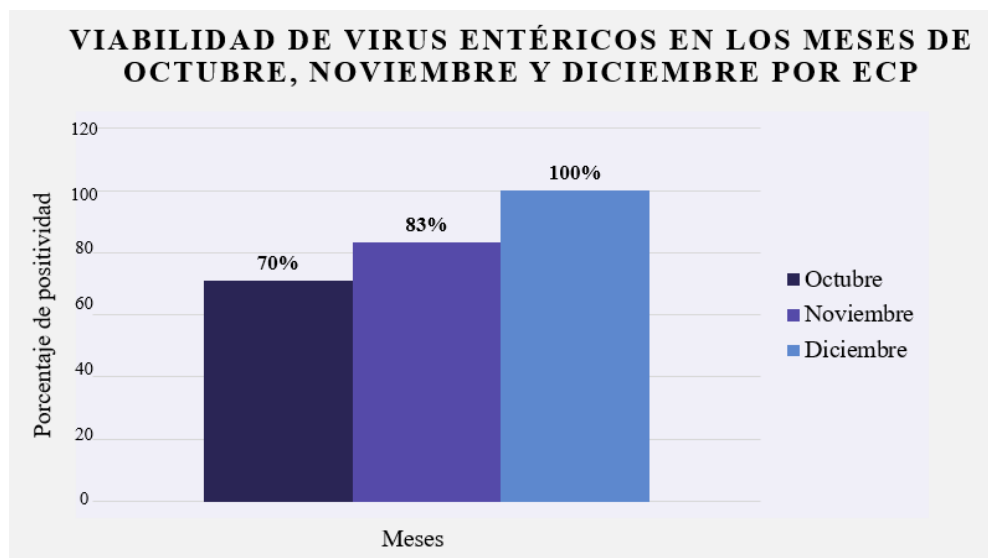
Las muestras de aire presentaron un menor porcentaje de positividad de 69%, ya que veinticinco muestras de treinta y seis (25/36) presentaban viabilidad de virus entéricos por ECP, en comparación con las muestras de agua, en donde sí se observó viabilidad de virus entéricos por ECP en todas las muestras (36/36), lo que equivale a un 100% de porcentaje de positividad (Figura 4).



**Figura 4.** Viabilidad de virus entéricos por ECP en matriz de agua y aire de doce puntos de la Bahía de Panamá.

Con respecto a la viabilidad de virus entéricos por ECP mensual de las muestras de agua y aire en la estación lluviosa, podemos indicar que en octubre diecisiete muestras de veinticuatro (17/24) presentaron viabilidad de virus entéricos por ECP lo que equivale a un 70% de porcentaje de positividad. En noviembre veinte muestras de veinticuatro (20/24) presentaron viabilidad por ECP lo que equivale a un 83%. Diciembre fue el único mes que hubo un 100%

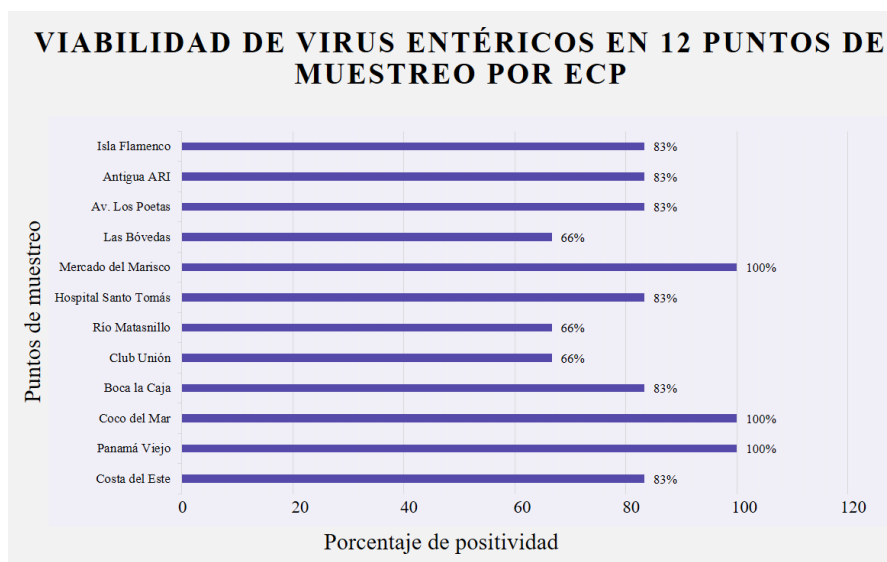
de porcentaje de positividad, ya que todas las muestras presentaban viabilidad por ECP (Figura 5).



**Figura 5.** Viabilidad de virus entéricos por ECP en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019.

Por otra parte, la viabilidad de los virus entéricos por ECP en los puntos de muestreo indica que, Mercado de Marisco, Coco del Mar y Panamá Viejo, fueron los únicos puntos que presentaron viabilidad de virus entéricos por ECP todos los meses independientes de la matriz de agua o aire, lo que indicia un 100% de porcentaje de positividad. Isla Flamenco, Antigua ARI, Av. Los Poetas, Hospital Santo Tomas, Boca la Caja y Costa del Este, presentaron viabilidad por ECP en cinco muestras de seis (5/6) con respecto al mes y a la matriz, lo que indicia un 83% de porcentaje de positividad. Las Bóvedas, Río Matasnillo y Club Unión

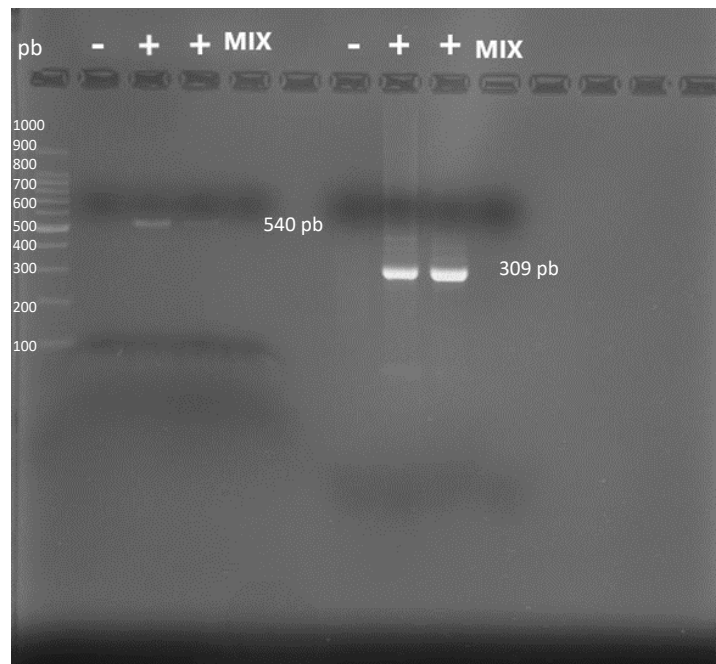
fueron los puntos de menor porcentaje de positividad con 66%, presentando viabilidad por ECP en cuatro muestras de seis (4/6) con respecto al mes y matriz (Figura 6).



**Figura 6.** Viabilidad de virus entéricos por ECP en doce puntos de la Bahía de Panamá en la estación lluviosa del 2019.

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

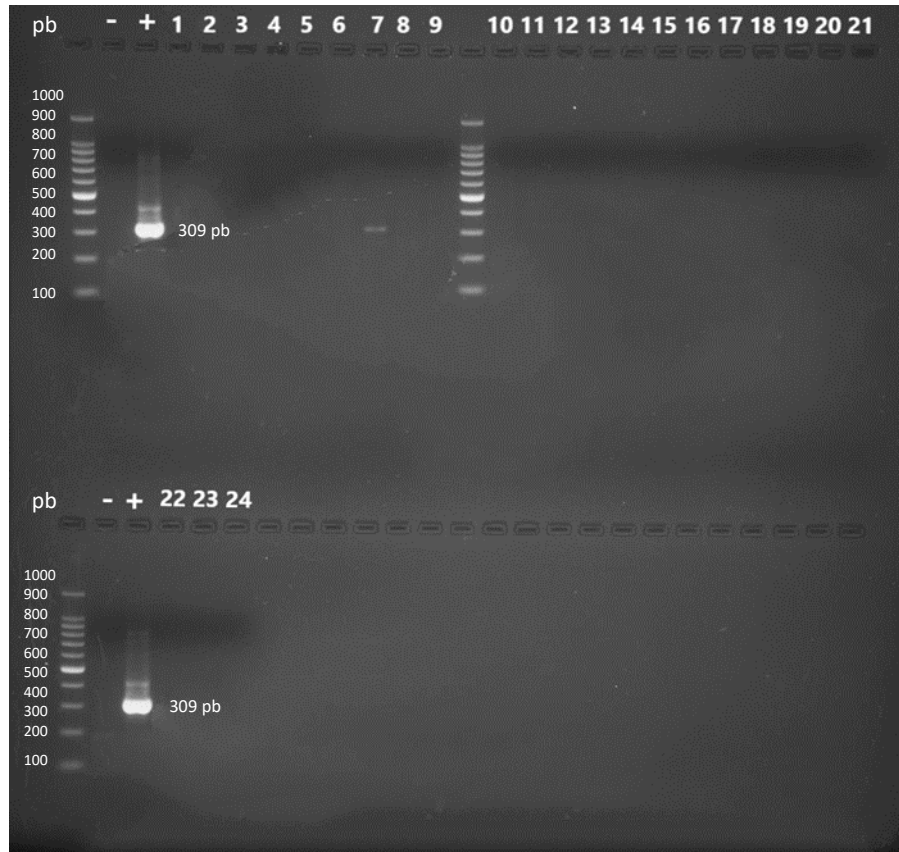
Se estandarizó las condiciones de la RT-PCR y PCR anidada en donde se encontró que los controles positivos amplificaban para el tamaño de fragmento requerido. Los dos juegos de primer que se utilizaron amplifican la región 5'NTR del genoma de 24 tipos de *Enterovirus*, en el caso de la RT-PCR el tamaño del fragmento es de 540 pb, mientras que para la PCR anidada el tamaño del fragmento es de 309 pb (Figura 7).



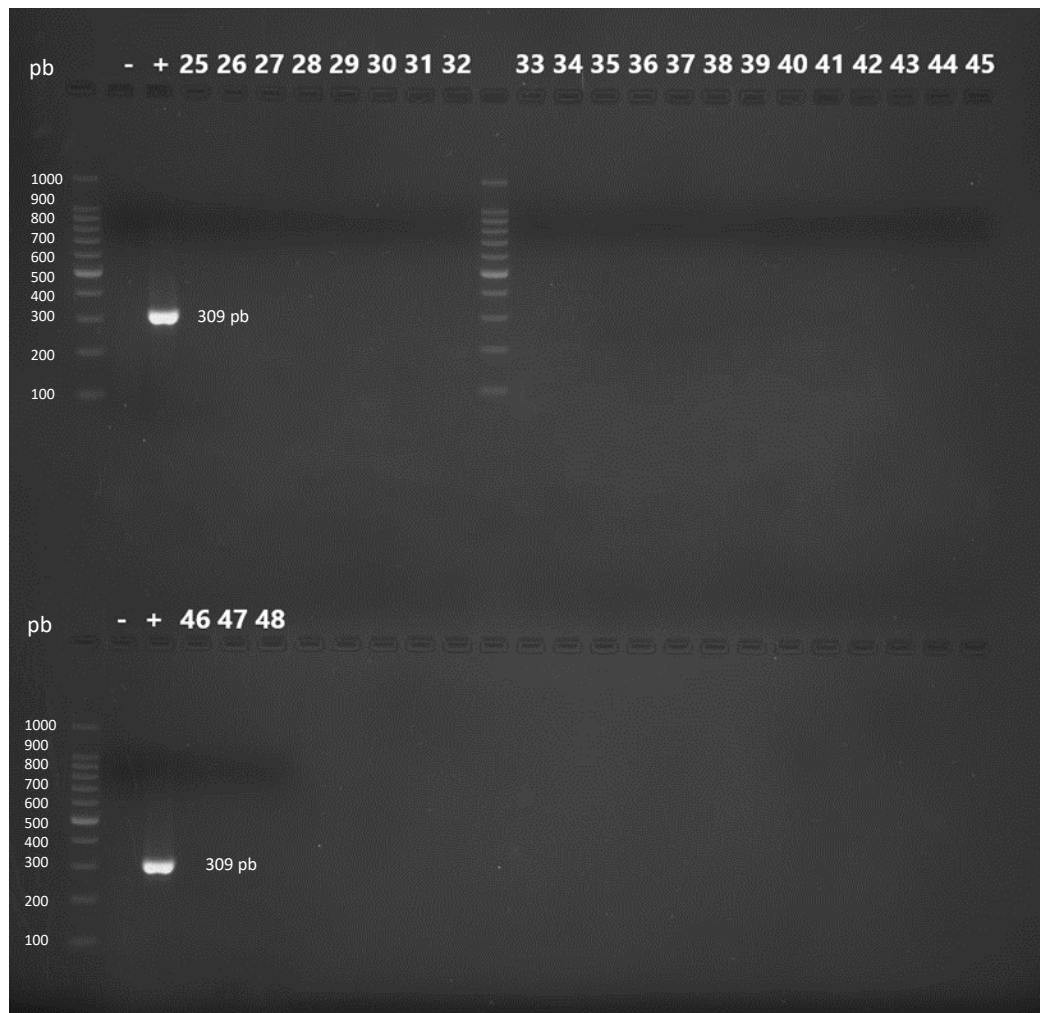
**Figura 7.** Estandarización de las condiciones de PCR para la detección de *Enterovirus*. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 1.5  $\mu$ L de bromuro de etidio, conteniendo 6.0  $\mu$ L del producto de PCR de los controles negativo y positivo estandarizados. El canal 1 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, 2 controles positivos, seguido de un control de la mezcla maestra de cada PCR. Los primers utilizados amplificaron el fragmento de tamaño esperado, mientras que los controles negativos no.

Una vez estandarizadas las condiciones de la PCR se procedió a realizar el análisis molecular de las muestras de cultivo celular extraídas con el Kit GenElute™ Total RNA Purification (Merck, Alemania). Se observó la amplificación de la muestra del Hospital Santo Tomas en matriz de aire en el mes de octubre (Figura 8) con el tamaño de fragmento esperado. El resto de las muestras en matriz de aire y agua en los meses de octubre, noviembre y diciembre no amplificaron (Figura 9) a excepción de la muestra de Río Mastanillo en matriz de agua del

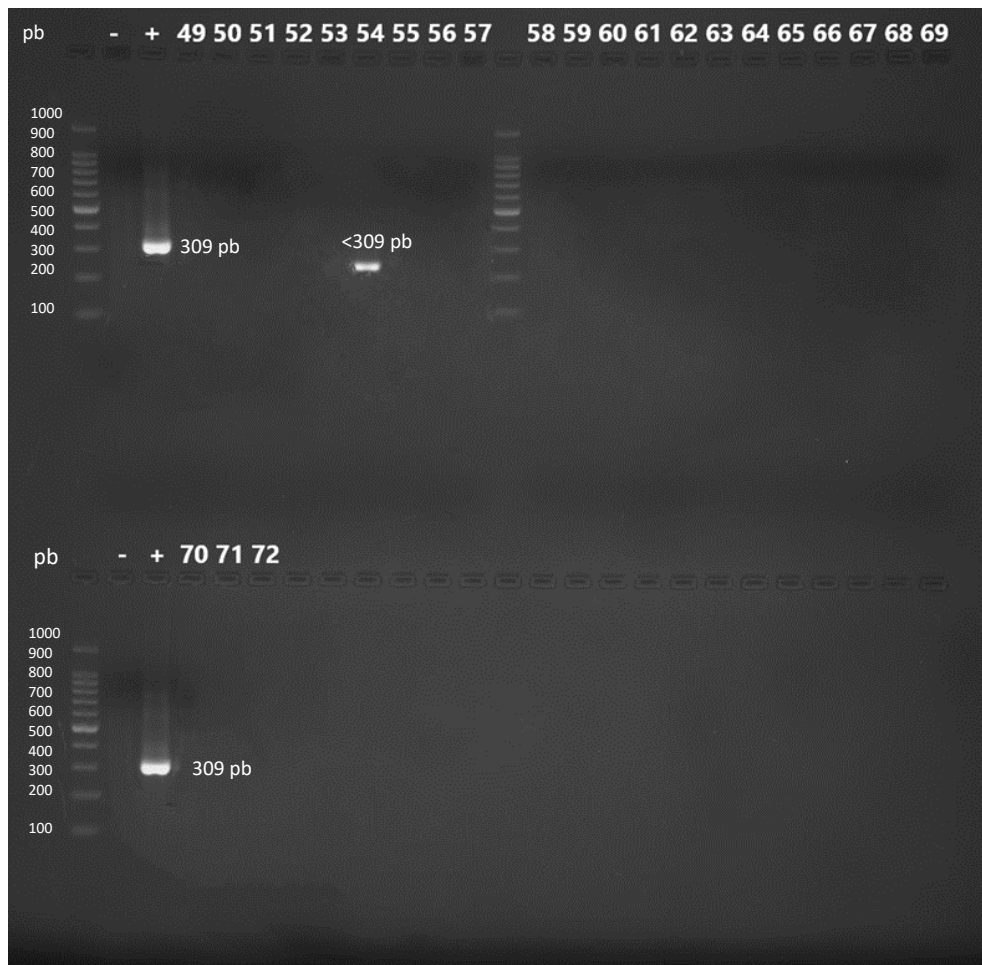
mes de noviembre el cual amplificó, pero no para el tamaño de fragmento esperado (Figura 10).



**Figura 8.** Detección de *Enterovirus* por PCR en cultivo celular, muestras 1-24. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, conteniendo 6.0 µL del producto de PCR anidada que incluye muestras de cultivo celular, controles negativos y positivos, y 2.0 µL de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). Se reportó solo 1 muestra positiva en matriz de aire correspondiente a Hospital Santo Tomas en el mes de octubre.



**Figura 9.** Detección de *Enterovirus* por PCR en cultivo celular, muestras 25-48. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de bromuro de etidio, conteniendo 6.0  $\mu\text{L}$  del producto de PCR anidada que incluye muestras de cultivo celular, controles negativos y positivos, y 2.0  $\mu\text{L}$  de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). No se reportó ninguna muestra positiva.

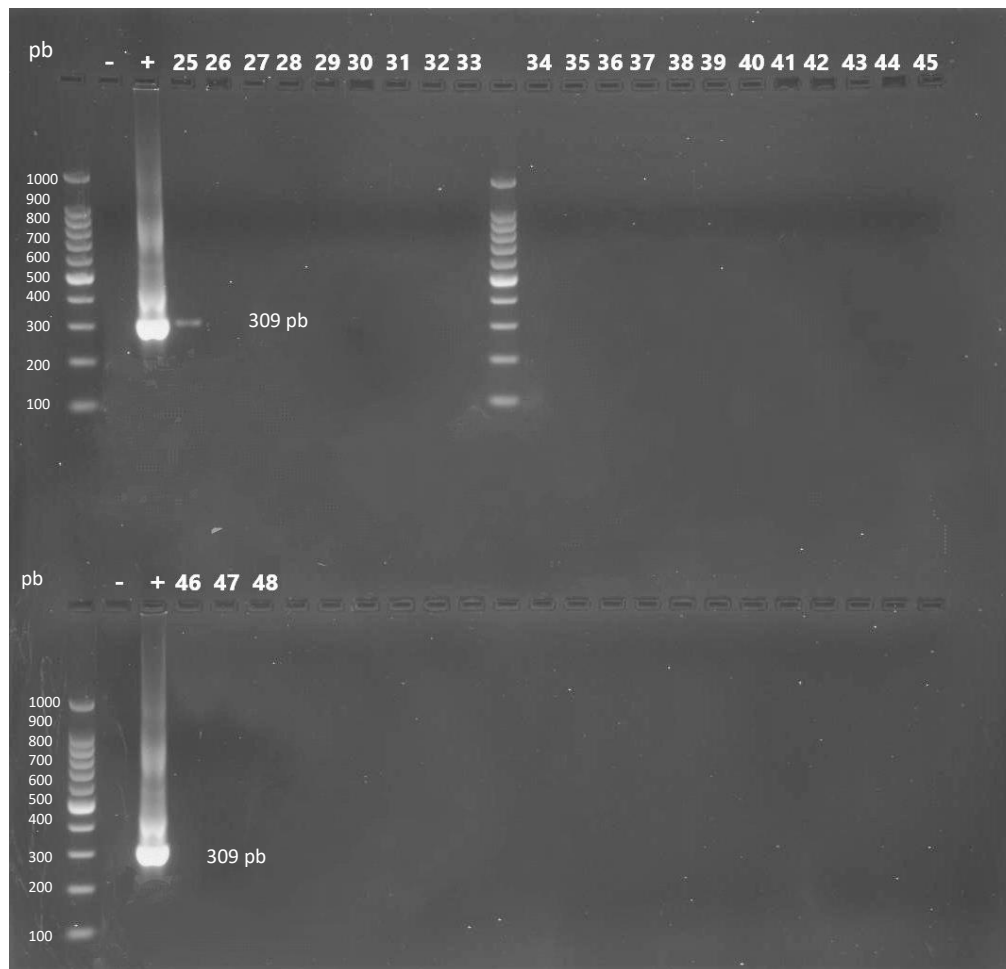


**Figura 10.** Detección de *Enterovirus* por PCR en cultivo celular, muestras 49-72. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, conteniendo 6.0 µL del producto de PCR anidada que incluye muestras de cultivo celular, controles negativos y positivos, y 2.0 µL de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). No se reportó ninguna muestra positiva, pero se observó la amplificación de una banda con un tamaño de fragmento menor que el esperado de 323 pb.

También, se realizó el análisis molecular de las muestras crudas extraídas con el Mini Kit PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen, EEUU), en donde se observó la amplificación con el tamaño de fragmento esperado de 24 muestras positivas para *Enterovirus*. La matriz de aire presentó 12 muestras positivas, de las cuales 7 corresponden al mes de octubre (Panamá Viejo, Club Unión, Hospital Santo Tomas, Mercado del Marisco, Las Bóvedas, Av. Los Poetas e Isla flamenco), 4 al mes de noviembre (Costa del este, Club Unión, Rio Matasnillo y Av. Los Poetas) (Figura 11) y 1 al mes de diciembre (Costa del Este) (Figura 12). La matriz de agua presentó 12 muestras positivas, de las cuales 7 corresponden al mes de noviembre (Club Unión, Rio Matasnillo, Hospital Santo Tomas, Mercado del Marisco, Av. Los Poetas, Antigua ARI e Isla Flamenco) y 5 al mes de diciembre (Costa del Este, Panamá Viejo, Club Unión, Rio Matasnillo y Mercado Marisco) (Figura 13).



**Figura 11.** Detección de *Enterovirus* por PCR en muestras crudas, muestras 1-24. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, conteniendo 6.0 µL del producto de PCR anidada que incluye muestras crudas, controles negativos y positivos, y 2.0 µL de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). Se reportó 11 muestras positiva en matriz de aire, de las cuales 7 son del mes de octubre (Panamá Viejo, Club Unión, Hospital Santo Tomas, Mercado del Marisco, Las Bóvedas, Av. Los Poetas e Isla flamenco) y 4 son del mes de noviembre (Costa del este, Club Unión, Río Matasnillo y Av. Los Poetas).

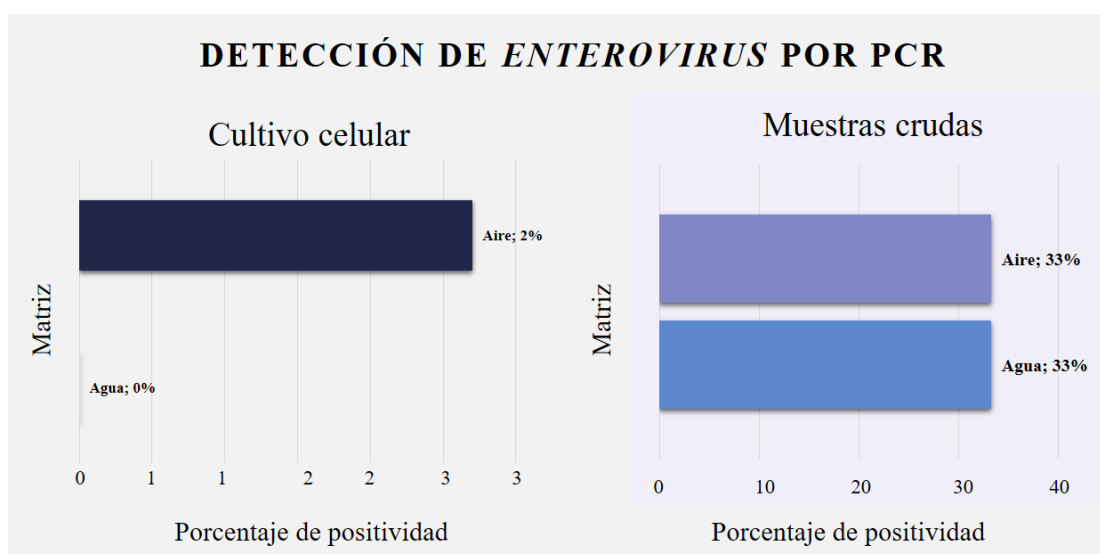


**Figura 12.** Detección de *Enterovirus* por PCR en muestras crudas, muestras 25-48. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, conteniendo 6.0 µL del producto de PCR anidada que incluye muestras crudas, controles negativos y positivos, y 2.0 µL de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). Se reportó 1 muestra positiva en matriz de aire correspondiente a Costa del Este en el mes de diciembre.



**Figura 13.** Detección de *Enterovirus* por PCR en muestras crudas, muestras 49-72. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% coloreado con 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de bromuro de etidio, conteniendo 6.0  $\mu\text{L}$  del producto de PCR anidada que incluye muestras crudas, controles negativos y positivos, y 2.0  $\mu\text{L}$  de loading buffer. El canal 1 y 13 indica el marcador de 100 pb DNA ladder (Promega), los tamaños de los fragmentos se indican a la izquierda y los tamaños de fragmentos del producto amplificado a la derecha. En la parte de arriba se indica el canal del control negativo, positivo, seguido de los códigos asignados a cada muestra que se utilizó en esta electroforesis (Tabla 2). Se reportó 12 muestras positiva en matriz de agua, de las cuales 7 son del mes de noviembre (Club Unión, Río Matasnillo, Hospital Santo Tomas, Mercado del Marisco, Av. Los Poetas, Antigua ARI e Isla Flamenco) y 5 son del mes de diciembre (Costa del Este, Panamá Viejo, Club Unión, Río Matasnillo y Mercado Marisco).

Las muestras de cultivo celular presentaron un porcentaje de positividad en la matriz de aire del 2%, ya que solo una muestra de treinta y seis (1/36) amplificó la banda, en comparación con las muestras de agua, en donde no se logró observar la amplificación de ninguna de las muestras (0/36), lo que equivale a un 0% de porcentaje de positividad (Figura 14).

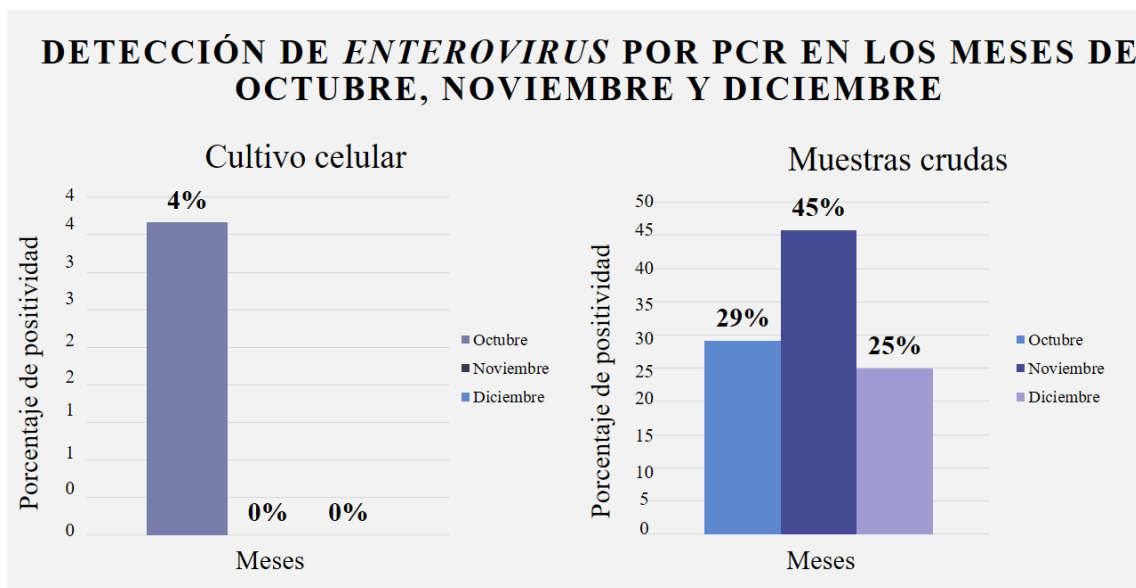


**Figura 14.** Detección de *Enterovirus* por PCR en matriz de agua y aire de doce puntos de la Bahía de Panamá, en muestras de cultivo celular y muestras crudas.

Las muestras crudas presentaron un porcentaje de positividad del 33% en ambas matrices, ya que se observó la amplificación de doce muestras de treinta y seis (12/36) tanto en la matriz de aire como en la de agua (Figura 14).

Con respecto al porcentaje de positividad mensual de las muestras de cultivo celular en la matriz de agua y aire, podemos indicar que en octubre solo una muestra de veinticuatro (1/24) amplificó la banda lo que equivale a un 4% de porcentaje de positividad. En el caso de los

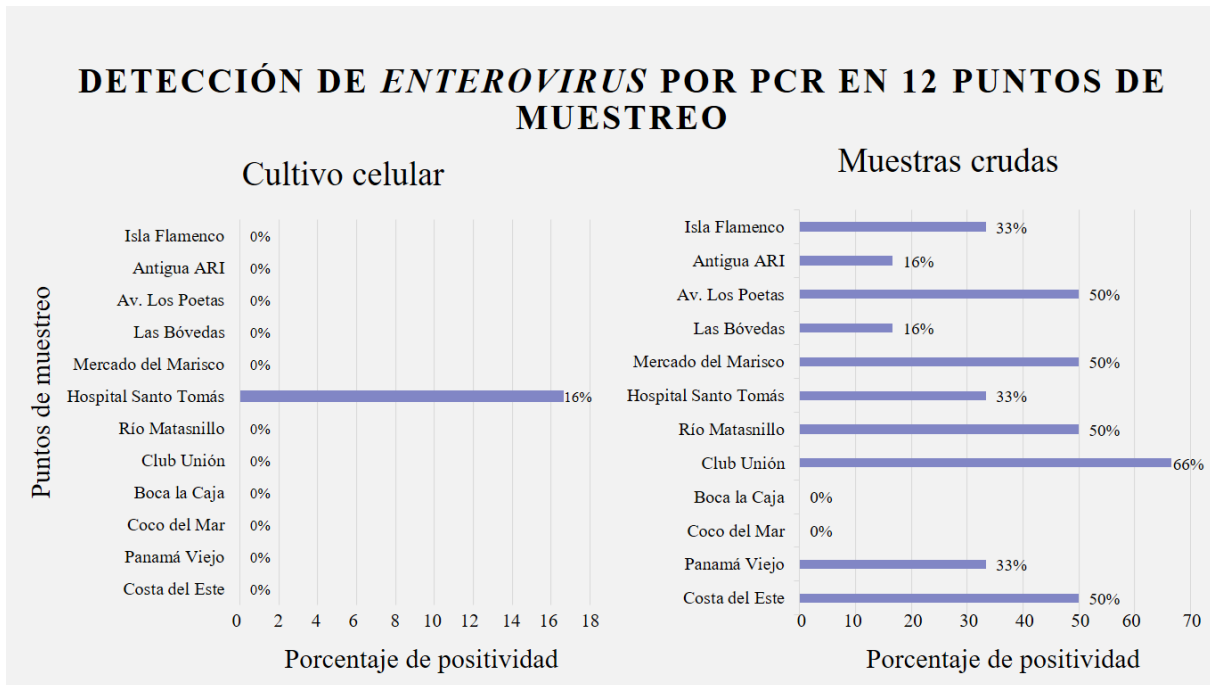
meses de noviembre y diciembre no se logró observar la amplificación de ninguna muestra de veinticuatro (0/24) lo que equivale a un 0% de porcentaje de positividad (Figura 15).



**Figura 15.** Detección de *Enterovirus* por PCR en los meses de octubre, noviembre y diciembre de la estación lluviosa del 2019, en muestras de cultivo celular y muestras crudas.

El porcentaje de positividad mensual de las muestras crudas en la matriz de agua y aire presento la amplificación en octubre diecisiete muestras de veinticuatro (7/24) lo que equivale a un 29% de porcentaje de positividad. En noviembre once muestras de veinticuatro (11/24) amplificaron lo que equivale a un 45%. Diciembre fue el mes que presentó menor porcentaje de positividad de 25%, ya que solo seis muestras de veinte cuatro (6/24) amplificaron (Figura 15).

El porcentaje de positividad con respecto a los puntos de muestreo en las muestras de cultivo indica que, Hospital Santo Tomas fue el único punto que amplificó de todos los meses y matrices, lo que indicia un 16% de porcentaje de positividad (Figura 16).



**Figura 16.** Detección de *Enterovirus* por PCR en doce puntos de muestreos de la Bahía de Panamá en la estación lluviosa del 2019, en muestras de cultivo celular y muestras crudas.

Por otra parte, el porcentaje de positividad con respecto a los puntos de muestreo en las muestras crudas indica que, Club Unión es la muestra con mayor porcentaje de positividad de 66%, ya que amplificaron cuatro muestras de seis (4/6), seguido de Ave, Los Poetas, Mercado de Marisco, Río Matasnillo y Costa del este con 50% de porcentaje de positividad. Isla Flamenco, Hospital Santo Tomas y Panamá Viejo presentaron amplificación de dos muestras de seis (2/6), lo que indicia un 33% de porcentaje de positividad. Las Bóvedas y Antigua Ari fueron los puntos de menor porcentaje de positividad con 16%, presentando amplificación en una sola muestra de seis (1/6) con respecto al mes y matriz (Figura 16).

# **CAPITULO VI DISCUSIÓN**

La Bahía de Panamá es considerada como un punto de interés para fines recreacionales y se encuentra incluida en el Programa de Saneamiento de Panamá, que tiene como objetivo la eliminación de contaminación por aguas residuales no tratadas en la zona costera de la bahía, mejorando las condiciones de salud, ambiente y calidad de vida de la población panameña (MINSA, 2014).

Este estudio tenía como objetivo la detección de distintos virus entéricos de importancia en salud pública como *Adenovirus*, *Enterovirus* y *Rotavirus* en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en la estación lluviosa que incluyen los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2019. Los virus entéricos humanos representan un excelente indicador de contaminación fecal en agua (Albinana-Gimenez, 2009; Lambertini, *et al.*, 2008) y se han documentado como patógenos importantes que pueden llegar a las personas a través de una vía aérea en la zona costera (Pendergraft, *et al.*, 2021).

Para abordar el objetivo de este estudio, se realizó cultivo celular de las muestras de agua y aire con la línea celular Vero que se ha demostrado que se utiliza para la concentración de distintos virus entéricos por ser bastante permisible (Ponce, *et al.*, 2021; Dilnessa y Zeleke, 2017). Sin embargo, es una línea celular con una sensibilidad muy baja en comparación con otras (She, *et al.*, 2006; Reina, *et al.*, 2000).

La línea celular Vero mostró una gran actividad con respecto a la viabilidad viral por ECP presentado por las muestras, permitiendo el crecimiento viral en todas las muestras de agua (100% de positividad) y en la mayoría de las muestras de aire (69% de positividad), datos que contrastan con los obtenidos en otros estudios en donde se considera una línea celular con baja sensibilidad para el crecimiento de virus entéricos (Ponce, *et al.*, 2021; Gónzales, 2007).

El aislamiento viral o cultivo celular, si bien ha sido denominado el “estándar de oro”, es una técnica costosa y en ocasiones, un número significativo de muestras resultan negativas (Gharabaghi, et al., 2008), y es por eso, que varios autores recomiendan realizar una confirmación ya sea con Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y/o con técnicas moleculares por PCR (Corvalán, et al., 2018; Gónzales, 2007).

La IFI a lo largo de los años ha sido considerada como una de las principales herramientas utilizadas para confirmar o descartar el crecimiento viral en cultivo celular y a la vez detectar casos positivos en donde el ECP es nulo o escaso. Por otra parte, la técnica más sensible y objetiva para la detección del crecimiento viral es la RT-PCR y PCR anidada del sobrenadante del cultivo celular (Corvalán, et al., 2018; Gónzales, 2007).

En nuestro caso, solo se utilizó la confirmación mediante técnica molecular y solo se logró estandarizar una RT-PCR para detectar ARN viral de *Enterovirus* después de la transcripción inversa y amplificaciones subsiguientes mediante PCR anidada. Los cebadores que se utilizaron poseen alta especificidad que permite la tipificación posterior mediante PCR anidada utilizando de igual manera cebadores específicos. Los cebadores fueron diseñados para detectar la región conservada 5'NTR del genoma de 24 tipos de *Enterovirus* (Pina, et al., 1998; Casas, et al., 1997).

Su utilización nos permitió detectar la presencia de *Enterovirus* en la muestra Hospital Santo Tomas en matriz de aire y mes de octubre, en donde no se observó viabilidad por ECP en el cultivo celular, probablemente por contener una carga viral baja o nula al ser una muestra ambiental.

Con respecto al resto de las muestras de agua y aire que presentaron viabilidad por ECP en cultivo celular, en la literatura se encontraron datos referentes a co-infección entre virus entéricos como *Adenovirus*, *Rotavirus* y *Enterovirus* (Le-Corre, *et al.*, 2021; Gonzalez-Martin, *et al.*, 2018; Araya-Paredes, 2017; Maurer, *et al.*, 2015); además existen estudios en la Bahía de Panamá en donde se reportó la presencia de *Adenovirus* en muestras de agua y aire (Garibaldo y Samudio, 2017; González y González, 2015). Por ende, es muy probable que las muestras que presentaron ECP se deba a la presencia de otros virus entéricos que son capaces de infectar las células Vero al ser estas muy permisibles, como se había mencionado anteriormente (Ponce, *et al.*, 2021).

Numerosos estudios han resaltado la importancia de combinar diferentes líneas celulares, para así, permitir el crecimiento de diferentes virus entéricos y aumentar las posibilidades de detección. Entre ellas podemos mencionar las líneas celulares como: BGM, Caco-2, RD, L20B, MRC-5, Hep-2 o A-549 (Adeniji, *et al.*, 2017; Gónzales, 2007; Sarmiento, *et al.*, 2007). En este análisis se ha demostrado la eficiencia de la línea celular Vero a la hora de detectar presencia viral mediante el ECP. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de realizar una comparación con las líneas celulares más sensibles y con mayor espectro de infección, al igual que un co-cultivo de las muestras positivas después de 48 - 72 h, para aumentar la carga viral. De igual manera, realizar una confirmación con IFI para descartar los falsos positivos y a la vez, detectar casos positivos con ECP nulo o escaso como la muestra de Hospital Santo Tomas, aunque cabe destacar que la efectividad de esta técnica depende de la complementariedad de los anticuerpos monoclonales utilizados con las estructuras virales y

requiere de una cantidad de virus adecuada en el medio para ser visualizada (Corvalán, *et al.*, 2018; Gónzales, 2007).

Además de realizar una confirmación por PCR de las muestras de cultivo, se incluyó la confirmación de las muestras crudas, las cuales solo se encontraban concentradas con PEG, dando como resultado la presencia de *Enterovirus* en 24/72 (33%) muestras de agua y aire analizadas. La muestra Hospital Santo Tomas, en matriz de aire y mes de octubre que había salido positiva en la PCR de cultivo celular, nuevamente volvió a dar positiva en la muestra cruda, corroborando la presencia viral, y por ende, se puede considerar como virión o partícula infectiva, ya que aunque no haya presentado ECP, se pudo demostrar la presencia viral por la técnica de ICC-RT-PCR.

En este estudio interesaba comparar la presencia de virus entéricos que se encontraban entre puntos de muestreo, en muestras de aire y agua, además de la frecuencia a lo largo del tiempo en la estación lluviosa.

Con respecto a los puntos de muestreo en muestras crudas de aire y agua, Club Unión fue el que presentó mayor frecuencia de *Enterovirus* (66% de positividad por RT-PCR anidada), seguido de Costa del Este, Mercado de Marisco, Av. de Los Poetas y Río Matasnillo (50% de positividad por RT-PCR anidada), mientras que el Mercado de Marisco, Coco del Mar y Panamá Viejo fueron los puntos de muestreo con mayor ECP (100% de positividad), datos que contrastan con los obtenidos en otros estudios en donde se reportó la presencia de *Adenovirus*, uno de los virus entéricos de nuestro interés, en los puntos de Río Matasnillo, Ave. de Los Poetas, Hospital Santo Tomas y Boca La Caja, considerándose como puntos recurrentes (Garibaldo y Samudio, 2017; González y González, 2015).

El porcentaje de positividad en la PCR de muestras crudas de agua y aire fue el mismo en ambas muestras (33% de positividad), mientras que para la detección molecular en cultivo celular por la Técnica de ICC-RT-PCR, el porcentaje de positividad fue de 2% en muestras de aire y 0% en muestras de agua. Por otra parte, el porcentaje de positividad con respecto al ECP en cultivo celular varió de 69% en muestras de aire y 100% en muestras de agua. Datos que contrastan con los estudios realizados anteriormente para la detección de *Adenovirus* en la estación de transición de época seca a lluviosa del 2015 en la Bahía de Panamá, donde la matriz de aire fue la que mayor presencia viral presentó, con un 27% de positividad, en comparación con la de agua con un 8% de positividad (Garibaldo y Samudio, 2017; González y Gónzalez, 2015). No obstante, se ha demostrado la presencia de *Enterovirus* además de la co-infección con otros virus entéricos como *Adenovirus* y *Rotavirus* en otras partes del mundo en matriz de agua salada y en muestras de aire en espacios abiertos (Ginn, *et al.*, 2021; Gonzalez-Martin, *et al.*, 2018; Maurer, *et al.*, 2015; Aslan, *et al.*, 2011).

Los virus pueden aerosolizarse más fácilmente debido a su tamaño más pequeño y su posible unión a partículas de tamaño más fino, pero también son muy sensibles a las condiciones adversas (UV y deshidratación) durante el transporte (Griffin, *et al.*, 2011), mientras que los virus que se transmiten a través de agua contaminada suelen ser estables porque carecen de las envolturas lipídicas que hacen que otros virus sean más susceptibles a los cambios ambientales (Girones, *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta esto esperaríamos encontrar menor presencia de virus en la matriz de aire que en agua, sin embargo, esto solo fue demostrado en el ECP de cultivo celular mas no en la PCR para la detección de *Enterovirus*.

La frecuencia en cuanto a la presencia viral a lo largo del tiempo varió entre cultivo celular y PCR. En las muestras de cultivo celular se ve un aumento hasta el 100% de positividad a medida que van pasando los meses, mientras que en la PCR de muestras crudas aumenta hasta noviembre con 45% de positividad y disminuye a 25% de positividad en diciembre. Varios estudios han proporcionado datos valiosos respecto al hecho de que las concentraciones de EV suelen ser más altas en el período de verano-otoño en países de clima templado (septiembre, octubre y noviembre) (Amdiouni, et al., 2012; Petrinca, et al., 2009). Los resultados reportados en este trabajo y los reportados en la literatura, muestran similitudes en las frecuencias de EV. Así Brinkman, et al. (2017), reportaron EV-A con la misma dinámica que en este trabajo con la RT-PCR anidada de muestras crudas (Maurer, et al., 2015). También, se reportó el mes de noviembre con la carga viral de EV más alta en la playa de Lami, Brasil en comparación con los otros meses y solamente se reportó EV en temporadas lluviosas (García-Corzo, et al., 2017).

Prussin *et al.*, (2019), hace énfasis en que el material genético de los virus puede influir en las tendencias de dispersión según la temporada. Para los virus de ADN, la variabilidad aumenta de primavera a otoño y luego, disminuye en el invierno. Para los virus de ARN, la variabilidad es más baja en el verano y más alta en el invierno. Dado que se ha demostrado la co-infección de *Enterovirus* con otros virus entéricos (Le-Corre, *et al.*, 2021; Gonzalez-Martin, *et al.*, 2018; Araya-Paredes, 2017; Maurer, *et al.*, 2015), la tendencia a un aumento en los resultados de cultivo celular dependerá de que virus se encuentra específicamente y que no se ha podido analizar mediante la RT-PCR anidada estandarizada.

Es importante hacer hincapié en que la detección de niveles altos o bajos de virus en un área geográfica específica depende no sólo de patrones de excreción de virus en la población, sino también del volumen de la muestra y el protocolo que se utiliza para la detección de virus (Girones, et al., 2010). El volumen utilizado en este estudio es menor al que generalmente se ha utilizado en la mayoría de las investigaciones: en muestras de agua se utilizan volúmenes que van desde 500 mL a 200 L (Maurer, et al., 2015; Aslan, et al., 2011), mientras que para las muestras de aire es de 200 L en adelante (Ginn, et al., 2021; Gonzalez-Martin, et al., 2018). A pesar de estas diferencias encontradas en la literatura, el volumen utilizado en nuestro estudio fue suficiente para la detección de virus entéricos tanto en cultivo celular como en PCR.

Por otra parte, para la concentración de partículas virales se utilizó la metodología de precipitación con PEG que es un método ampliamente utilizado para la captura y concentración de ARN, ADN viral, e incluida la sedimentación de virus de ADN y ARN entéricos en aguas residuales, y en otras muestras ambientales (Bofill-Mas y Rusiñol, 2020; Farkas, *et al.*, 2018). Además, se ha demostrado que el PEG posee hasta un 73% de recuperación viral (Ahmed, et al., 2020; Ye, et al., 2016) y la incubación a 4°C durante toda la noche mejora la recuperación de ARN (Farkas, et al., 2017), por lo tanto, resulta beneficioso para la epidemiología basada en aguas residuales, donde el estado de infectividad de los virus detectados no es relevante (Farkas, et al., 2021).

Con respecto a la diferencia encontrada en la PCR en ambos casos el procesamiento fue distinto: las muestras de cultivo celular se filtraron antes de realizar la extracción de ácidos nucleicos y se utilizaron dos kits de extracción (Kit GenElute™ Total RNA Purification para las muestras de cultivo y Mini Kit PureLink™ Viral RNA/DNA para las muestras crudas), y en

definitiva, la diferencia en el protocolo de extracción pudo haber influenciado en los resultados por ser un punto crítico en el proceso de detección molecular, al igual que la filtración que se realizó en las muestras de cultivo, ya que se ha indicado que una gran parte de los virus se puede perder durante la filtración con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Jiang, et al., 2001).

Los ensayos realizados no incluyeron la detección de otros virus entéricos como *Adenovirus* y *Rotavirus*, por lo que este podría ser un estudio a realizar y así, confirmar las conclusiones extraídas de este trabajo. Queda como incógnita, saber si al probar con otras líneas celulares más sensible como RD, Caco-2 u otras y confirmar con IFI y biología molecular, podría aumentar la detección de Enterovirus en muestras ambientales. Este es el primer estudio que se realiza para la detección de Enterovirus en matriz de aire y agua en espacios abiertos en Panamá, sin embargo, hasta nuestro conocimiento tampoco hay información de estudios de detección de *Enterovirus* en espacios cerrados en nuestro país.

# **CAPÍTULO VII**

# **CONCLUSIONES**

1. En este estudio se detectaron 61 muestras con viabilidad por ECP en cultivo celular y 24 muestras positivas para *Enterovirus* detectado por PCR en matriz de agua y aire en distintos puntos de la Bahía de Panamá durante la estación lluviosa del 2019.
2. Club Unión fue el punto con mayor detección de *Enterovirus*, seguido de Costa del Este, Mercado de Marisco, Av. Los Poetas, y Río Matasnillo en muestras crudas, mientras que Mercado de Marisco, Coco del Mar y Panamá Viejo presentaron mayor positividad en cultivo celular.
3. El punto Hospital Santo Tomas en matriz de aire y mes de octubre fue la única muestra de cultivo celular en ser positiva para *Enterovirus* y que presento partícula infectiva.
4. Las muestras crudas en las matrices de agua y aire presentaron 33% de positividad para la detección de *Enterovirus*, mientras que en cultivo celular la matriz de agua presento 100% de positividad por ECP y en matriz de aire 69%.
5. Las muestras de cultivo celular presentaron ECP durante todo el periodo de estudio destacando diciembre como el mes con mayor porcentaje de positividad de 100%, en comparación con los resultados de PCR en muestras crudas en donde noviembre es el mes con mayor detección de *Enterovirus* con 45% de positividad.
6. Este es el primer estudio que se realiza para la detección de *Enterovirus* en matriz de agua y aire en espacios abiertos en Panamá y el cual esperamos que sea un aporte valioso para posteriores estudios epidemiológicos en el país.

# **RECOMENDACIONES**

1. Verificar protocolos de concentración viral, extracción de ácidos nucleicos totales con kit adecuado y stock de soluciones o reactivos para evitar discordancia en los resultados.
2. Aumentar el volumen de recolección en las matrices de agua y aire para incrementar la posibilidad de detección de virus entéricos.
3. Probar otras líneas celulares más sensible como RD, Caco-2 u otras y realizar co-cultivo de las muestras positivas después de 48 y 72 h para aumentar la carga viral.
4. Confirmar resultados de cultivo celular con IFI en combinación con técnica molecular PCR para aumentar la detección de virus entéricos en muestras ambientales.
5. Estandarizar una PCR anidada múltiple para la detección de otros virus entéricos como Adenovirus y Rotavirus de interés en salud pública y a la vez la co-infección con Enterovirus para así poder concluir con nuestros resultados obtenidos.
6. Realizar estudios previos a nivel de secuenciación de las muestras positivas para poder establecer un árbol filogenético y dar a conocer cuáles son los genotipos de interés humano que circulan actualmente en el país.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA**

- Abdelnour, A., 2005. Vacunas de Rotavirus: pasado, presente y futuro. *SciELO*, p. 1.
- Abraham, R. *et al.*, 1993. Rapid detection of poliovirus by reverse transcription and polymerase chain reaction: application for differentiation between poliovirus and nonpoliovirus enteroviruses. *Clin Microbiol*, 2(31), pp. 395-9.
- Adeniji, J. *et al.*, 2017. Preponderance of enterovirus C in RD-L20B-cell-culture-negative stool samples from children diagnosed with acute flaccid paralysis in Nigeria. *Arch Virol*, Volumen 162, pp. 3089-3101.
- Ahmed, W. *et al.*, 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci. Total Environ.* 2020, 739, 139960, Volumen 739, p. 139960.
- Albinana-Gimenez, *et al.*, 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking water-treatment plants. *Water Res.*, Volumen 43, pp. 2011-2019.
- Alsved, M., 2019. Sources of Airborne Norovirus in Hospital Outbreaks. *Clinical Infectious Diseases*, p. 2023–2028.
- Amdiouni, H. *et al.*, 2012. Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett Appl Microbiol*, Volumen 54, p. 359–366.
- ARAP, 2010. Documento de referencia para la elaboración de estudios de impacto ambiental (EsIA) en zonas marino costeras y aguas continentales, Panamá: Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá para el Manejo Costero Integrado.
- Araya-Paredes, C., 2017. Circulación de enterovirus D-68 y sus características filogenéticas en Chile, Tesis de Posgrado. Santiago: Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
- Arcia, O., 2019. Aguas de la bahía mejora, Aún hay riesgo para la salud. *La Prensa*, 12 de agosto.
- Aslan, A., Xagorarakis, S. F., Rose, J. & Dorevitch, S., 2011. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J. Appl. Microbiol.*, 111(5), p. 1250–1271..
- Atlas, R. y Bartha, R., 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental, Madrid: Pearson Educación.

- Averza, A., 2010. Informe Final. Estado del Ambiente Marino, en el Pacífico de Panamá, para la Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP) / Comisión Permanente del Pacífico Sudeste, (CPPS), Actividad 2/10-Programa CONPACSE III. Ocean Docs Repository of Ocean Publications, pp. 126-128.
- Bernaola, G. y Luque, W., 2002. Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus. *Paediatrica*, 4(2), pp. 41 - 47.
- Bofill-Mas, S. y Rusiñol, M., 2020. Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.*, Volumen 16, pp. 7-13.
- Bofill-Mas, S. *et al.*, 2005. Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Rev Esp Salud Pública*, 2(79), pp. 253-269.
- Bracho G., M. *et al.*, 2008. Detección del virus de la *Hepatitis A*, *Adenovirus* 40 y 41 y bacteriófagos en agua para consumo humano. *Ciencia*, 16(3), pp. 271 - 278.
- Brinkman, N., Fout, G. and Keely, S., 2017. Retrospective Surveillance of Wastewater To Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus Infections. *mSphere* 2:e00099-17, 2(3), pp. e00099-17.
- Capital-Financiero, 2019. Proyecto de recuperación de las playas de la Bahía irá de la mano del saneamiento. *El Capital Financiero*, 7 Agosto, p. 1.
- Carter, M., 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol*, Volumen 98, pp. 1354-1380.
- Casas, I., Tenorio, A. and Echevarria, J., 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *Journal of Virological Methods*, Issue 66, pp. 39-50.
- Corvalán, P. *et al.*, 2018. Inmunofluorescencia indirecta versus reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico de virus respiratorios en niños ingresados en un hospital de la Región Metropolitana. *Rev Chilena Infectol*, 36(1), pp. 26-31.
- Crawford, S. E. *et al.*, 2017. Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17083).
- D'Croz, L. & Kwiecinski, B., 1980. Contribución de los manglares a las pesquerías de la Bahía de Panamá. *Revista de Biología Tropical*, pp. 13-29.

- De La Cruz-Lombardo, A., 2018. Impacto del cambio climático sobre la prevalencia de indicadores microbiológico, patógenos y parámetros físico químicos de aguas superficiales del río la villa usadas para actividades agrícola y humana, Panamá: Universidad de Panamá.
- De la Rosa, M. C., Mosso, M. A. y Ullán, C., 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*, Volumen 5, pp. 375-402.
- Desselberger, U., 2014. Rotavirus. En: Investigación de virus. Reino Unido, pp. 75-96.
- Dhingra, A. *et al.*, 2019. Evolución molecular de la especie C del adenovirus humano (HAdV). *Scientific Reports*, Volumen 1039.
- Dilnessa, T. and Zeleke, H., 2017. Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, 2(1), p. 102.
- Domínguez, A. *et al.*, 2009. Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. *Esp Salud Pública*, 83(5), pp. 679-687.
- Espigares-García, M., 2006. Virus en agua de consumo. *Hig. Sanid. Ambient.*, Volumen 6, pp. 173-189.
- Estes, M. K. and Kapikian, A. Z., 2007. Rotaviruses. L. W. and Wilkins, ed. *Fields Virology*. quinta ed. Philadelphia: *Wolters Kluwer Health*, pp. 1917-1974.
- Estes, M., 2001. Rotaviruses and their replication, *Fields Virology* Vol. 2: Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins.
- Farkas, K. *et al.*, 2017. Evaluation of molecular methods for the detection and quantification of pathogen-derived nucleic acids in sediment. *Front. Microbiol.*, Volumen 8, p. 53.
- Farkas, K. *et al.*, 2018. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci. Total Environ*, Volumen 634, p. 1174–1183.
- Farkas, K. *et al.*, 2021. Concentration and Quantification of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Using Polyethylene Glycol-Based Concentration and qRT-PCR. *Methods Protoc.*, 4(1), p. 17.
- Fenner, 2017. Adenoviridae. *Veterinary Virology*. pp. 217-227.
- Fong, T. y Lipp, E., 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Volumen 69, pp. 357-371.

García, M. E., 2006. Virus en aguas de consumo. *Higiene y Sanidad Ambiental*, Volumen 6, pp. 173-189.

García-Corzo, J. *et al.*, 2017. Etiología y estacionalidad de las infecciones respiratorias virales en menores de cinco años en Bucaramanga, Colombia. *Iatreia*, 30(2), pp. 107-116.

Garibaldo, A. y Samudio, S., 2017. Detección Molecular de Adenovirus en Muestras de Agua Provenientes de la Bahía de Panamá, Tesis de Licenciatura. Panamá: Universidad de Panamá, Vicerrectoría de Investigación y Posgrado.

Gerba, C., 2013. Assessment of a Portable Handheld UV Light Device for the Desinfection of Viruses and Bacteria in Water. pp. 87-90.

Gharabaghi, F. *et al.*, 2008. Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. *Journal of Clinical Virology*, Volumen 42, p. 190–193.

Ginn, O. *et al.*, 2021. Detection and quantification of enteric pathogens in aerosols near open wastewater canals in cities with poor sanitation. *medRxiv*, 2(14), p. 21251650.

Giordano, M. *et al.*, 2011. Evidence of closely related picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina. *J. Infect.*, Volumen 62, pp. 45-51.

Girones, R. *et al.*, 2010. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, Volumen 44, pp. 4325-4339.

Gloster, J., Freshwater, A. & Sellers RF y Alexandersen, S., 2005. Re-assessing the likelihood of airborne spread of foot-and-mouth disease at the start of the 1967-1968 UK foot-and-mouth disease epidemic. *Epidemiol. Infect.*, Volumen 133, pp. 767-783.

González, G., 2007. Estudio clínico-epidemiológico de enterovirus nopolio y optimización del cultivo celular. *Fundación Dialnet*, pp. 89-140.

González, M. y González, E., 2015. Detección Molecular de Adenovirus en Muestras de Aire Provenientes de la Bahía de Panamá, Tesis de Licenciatura. Panamá: Universidad de Panamá, Vicerrectoría de Investigación y Posgrado.

Gonzalez-Martin, C. *et al.*, 2018. Analysis of the Impact of African Dust Storms on the Presence of Enteric Viruses in the Atmosphere in Tenerife, Spain. *Aerosol and Air Quality Research*, Volumen 18, p. 1863–1873.

Grabow, W., Taylor, M. and Villiers, J., 2001. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, Volumen 43(12), pp. 1-8.

Green, M. and Pina, M., 1963. Biochemical studies on adenovirus multiplication: IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. 20(1), pp. 199-207.

Griffin, D. *et al.*, 2011. Observations on the use of membrane filtration and liquid impingement to collect airborne microorganisms in various atmospheric environments. *Aerobiologia*, Volumen 27, p. 25-35.

Herrero-Uribe, L., Ávila-Arias, R., Corrales-Aguilar, E. & Hun-Opfer, L., 2004. *Procedimientos en virología médica*. Primera ed. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

Hilleman, M. and Werner, J., 1954. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.*, Issue 85, pp. 183-188.

Hino, S. and Miyata, H., 2007. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.*, Volumen 17, pp. 45-57.

Ingemar-Panamá, 2005. Informe final del Estudio de Impacto Ambiental Categoría III del Saneamiento de la Ciudad y Bahía de Panamá. Ministerio de Salud de Panamá, pp. 17-19.

Invitrogen, 2016. Guía de usuario PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit. *Thermo Fisher Scientific Inc*, p. 4.

Jiang, S., Noble, R. and Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1), pp. 179-184..

Keswick, B., Gerba, C., DuPont, H. and Rose, J., 1984. Detection of Enteric Viruses in Treated Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), pp. 1290-1294.

Khetsuriani, N. *et al.*, 2006. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *National Center for Immunization and Respiratory Diseases*, 8(55), pp. 1-20.

Kingsley, D. H., 2016. Emerging foodborne and agriculture-related viruses. *Microbiology spectrum*, 4(4), pp. 4-4.

Lambertini, E. *et al.*, 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses and noroviruses from drinking water with glass wool filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10(2990-2996.), p. 74.

Launes, C. y Muñoz-Almagro, C., 2017. Enterovirus. *Española de Pediatría*, 1(73), pp. 88-89.

Le-Corre, N. *et al.*, 2021. Relevancia de la co-detección de virus respiratorios en la severidad de la infección respiratoria aguda en niños hospitalizados. *Revista Chilena de Pediatría*, 92(3), pp. 349-358.

Marie-Cardine, A. *et al.*, 2002. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clin Infect Dis*, Volumen 34, pp. 1170-1178.

Marrero Domínguez, K., Peidro Guzmán, H., Ledón Pérez, T. y Fando Calzada, R., 2017. Ensayo anidado de la reacción en cadena de la polimerasa específico para los genes de la toxina del cólera. CENIC. *Ciencias Biológicas*, 48(2), pp. 12-20.

Matsui, S. y G. H., 1996. Astroviruses. *Fields virology*, pp. 811-824.

Maurer, C. *et al.*, 2015. Adenovirus, enterovirus and thermotolerant coliforms in recreational waters from Lake Guaíba beaches, Porto Alegre, Brazil. *J Water Health*, 13(4), p. 1123–1129.

Mcintosh, K., 1996. *Diagnostic Virology*. 1 ed. Philadelphia: *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers.

Merck, 2016. Viral RNA Purification Protocol Using GenElute™ Spin Prep Kits, Germany: Sigma-Aldrich.

MINSAs, 2014. Plan Maestro del Programa Saneamiento de Panamá. Panamá: Ministerio de Salud - Programa Saneamiento de Panamá.

MINSAs, 2018. Guía nacional de epidemiología, Panamá: Ministerio de Salud.

MINSAs, 2019. Boletín Epidemiológico Semanal, Semana 42 (13 de oct-19 de oct), Panamá: Ministerio de Salud.

Moe, C., 2002. Waterborne transmission of infectious agents. *Manual of Environmental Microbiology*, pp. 184-204.

Morris, A. P. and Estes, M. K., 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and its enterotoxin. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2(281), pp. 303-310.

Oh, D. *et al.*, 2006. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch. Virol.*, Volumen 151, pp. 1199-1206.

Peláez, D. *et al.*, 2016. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica*, pp. 78-169.

- Pendergraft, M. *et al.*, 2021. Airborne transmission pathway for coastal water pollution. *PeerJ*, Volumen 9, p. e11358.
- Petrinca, A. *et al.*, 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *J Appl Microbiol*, Volumen 106, pp. 1608-1617.
- Pina, S., 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos, Barcelona.
- Pina, S. *et al.*, 1998. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *American Society for Microbiology*, 64(9), pp. 3376-3382.
- Pinto, I. y Yee, J., 2011. Diagnóstico de las áreas marinas protegidas y de las áreas marinas para la pesca responsable en el Pacífico panameño. Fundación Marviva, Panamá, p. 215.
- Ponce, L. *et al.*, 2021. Aislamiento y diagnóstico de cepas clínicas de enterovirus. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 9(1), pp. 1-8.
- Prussin, A., Torres, P. and Shimashita, J., 2019. Seasonal dynamics of DNA and RNA viral bioaerosol communities in a daycare center. *Microbiome*, Volumen 7, p. 53.
- Reina, J. *et al.*, 2000. Evaluation of different clinical samples and cell lines in the insolation of enterovirus in pediatric patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(3), pp. 116-119.
- Rekosh, D., Russell, W., Bellet, A. and Robinson, A., 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*, 11(2), p. 283-295.
- Reynolds, K., 2010. Evidence of novel waterborne parechoviruses associated with US infant deaths. *Water purification and conditioning*.
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. y Guitiérrez-Builes, L., 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, Volumen 35(2), pp. 236-247.
- Saavedra, M. C., Tovar, C. y Betancourt, W. Q., 2012. Virus entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. *Interciencia*, 37(4), pp. 260-265.
- Samudio, S. y Garibaldo, A., 2017. Detección molecular de Rotavirus y Adenovirus en muestras de agua provenientes de la Bahía de Panamá, Panamá: Universidad de Panamá.

- Sarmiento, L. *et al.*, 2007. Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells. *Rev Cubana Medicina Tropical*, 59(2), pp. 98-101.
- Schwab, K., 2007. Waterborne gastroenteritis viruses. *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda, pp. 27-38.
- Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J. & Sierra Palacios, E., 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México, pp. 53-69.
- She, R. *et al.*, 2006. Comparison of multiple shell vial cell lines for insolation of enteroviruses: A national perspective. *Journal of Clinical Virology*, 37(3), pp. 151-155.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), pp. 70-78.
- Valriberas, R. *et al.*, 1999. Infecciones gastrointestinales víricas notificadas al Sistema de Información Microbiológica, España. *Boletín Epidemiológico: Centro Nacional de Epidemiología.*, 7(21), pp. 1989-1999.
- Verreault, D., Moineau, S. and Duchaine, C., 2008. Methods for Sampling of Airborne Viruses. *Microbiology and Molecular Biology*, 72(3), p. 413–444.
- Ye, Y., Ellenberg, R., Graham, K. & Wigginton, K., 2016. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, Volumen 50, p. 5077–5085.

# **ANEXOS**



**Figura 17.** Punto de muestreo N°1 Costa del Este



**Figura 18.** Punto de muestreo N°2 Panamá Viejo



**Figura 19.** Punto de muestreo N°3 Coco del Mar



**Figura 20.** Punto de muestreo N°4 Boca La Caja



**Figura 21.** Punto de muestreo N°5 Club Unión



**Figura 22.** Punto de muestreo N°6 Río Matasnillo



**Figura 23.** Punto de muestreo N°7 Hospital Santo Tomás



**Figura 24.** Punto de muestreo N°8 Mercado Marisco



**Figura 25.** Punto de muestreo N°9 Las Bóvedas



**Figura 26.** Punto de muestreo N°10 Avenida Los Poetas



**Figura 27.** Punto de muestreo N°11 Antigua Autoridad de la Región Interoceánica (ARI)



**Figura 28.** Punto de muestreo N°12 Isla Flamenco



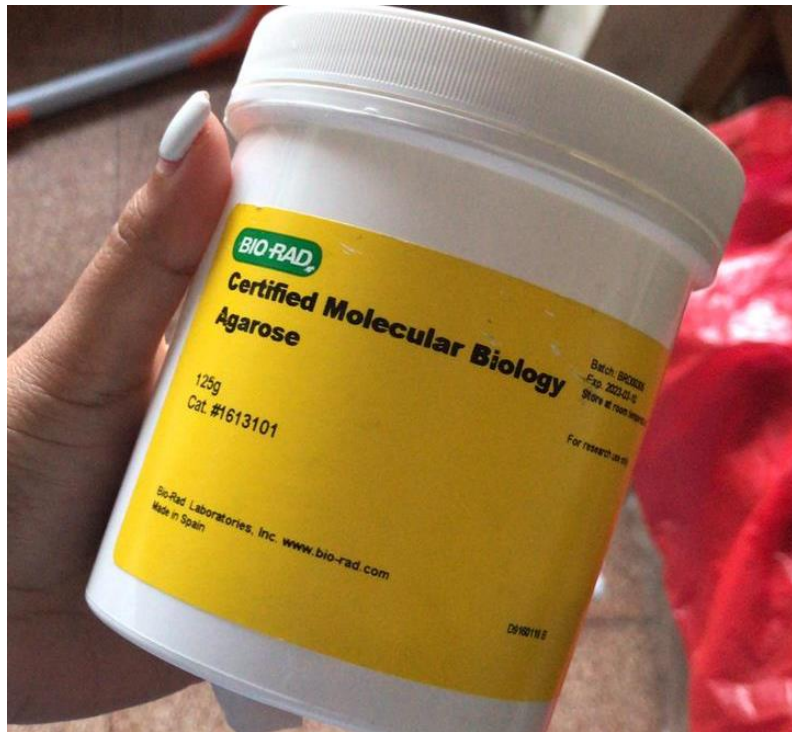
**Figura 29.** Preparación del sistema de recolección de muestras de aire



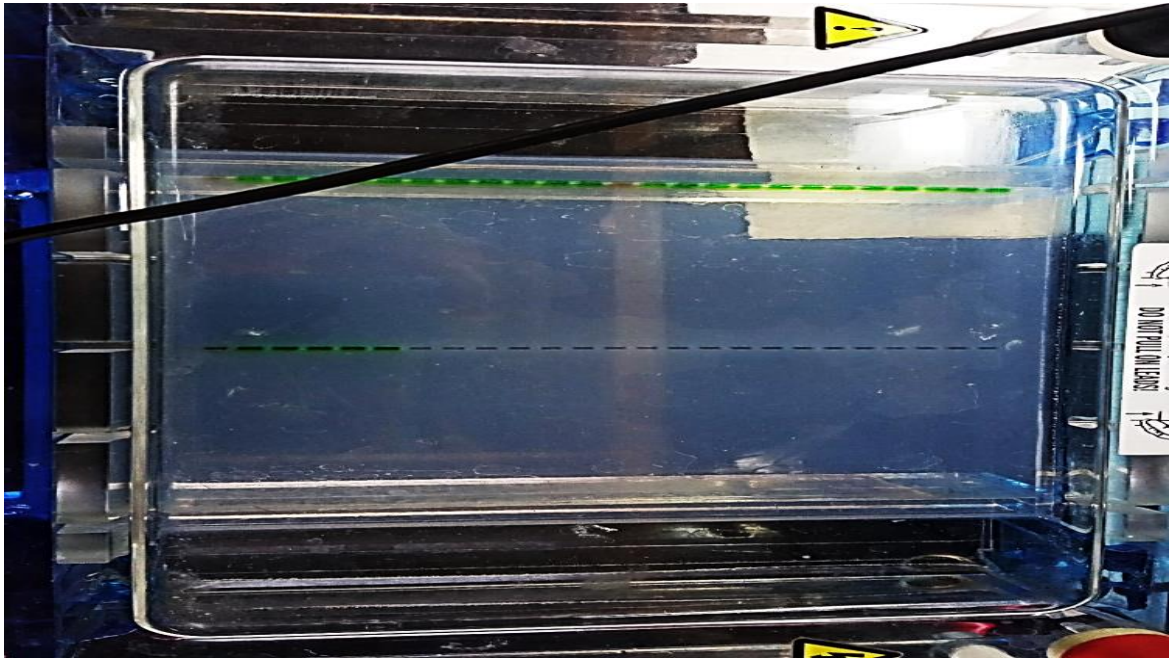
**Figura 30.** Lavado del sistema de recolecta de muestras de aire



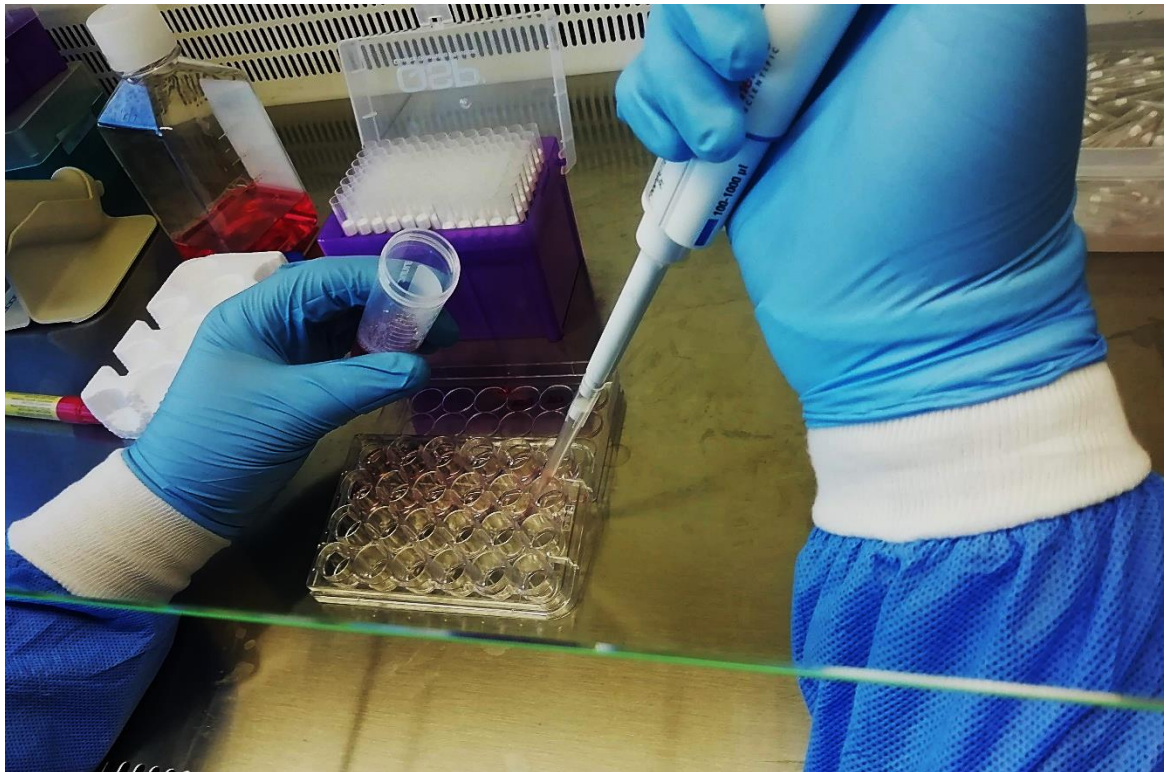
**Figura 31.** Sistema y recolecta de muestras de agua



**Figura 32.** Agar utilizado para la preparación del gel de agarosa 2%



**Figura 33.** Cámara de electroforesis con muestras inoculadas en el gel



**Figura 34.** Preparación de cultivo celular



