



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y
TECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TESIS

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS
PRESENTES EN TRES ESPECIES DE BIVALVOS DE
IMPORTANCIA COMERCIAL DEL GOLFO DE
PANAMÁ**

**Por:
ASQUENA RUTH AGUILAR**

**Director de Tesis:
Dr. ALEX O. MARTÍNEZ TORRES**

**Tesis presentada como
uno de los requisitos
para optar al grado de
Maestro en Microbiología
Ambiental**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

ALEX O. MARTÍNEZ TORRES, Profesor Titular II del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: ASQUENA RUTH AGUILAR

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS PRESENTES EN TRES ESPECIES DE BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL DEL GOLFO DE PANAMÁ.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 18 de noviembre de 2022

DEDICATORIA

Le dedico el éxito de este trabajo a todos esos jóvenes con aspiraciones de aportar su granito de conocimiento y ansias de hacer ciencia e impactar a la comunidad científica con innovación. Principalmente, a esas mujeres que día tras día nos hemos ganado un pequeño lugar para contribuir con nuevas ideas y soluciones a la problemática que se enfrenta el mundo, tanto en el área ambiental que impacta de manera directa el área de la salud. También a esos jóvenes llenos de sueños que inician su recorrido en el mundo científico y que encuentran miles de obstáculos. Ha ellos que muchas veces quieren soltar todo, pero continúan en este camino.

Finalmente, pero lo más importante a los pilares de mi vida mis padres. Aquellos pequeños que son mi inspiración día tras días, mis sobrinos y ahijada. Y sobre todo esa personita que me recuerda lo fuerte y capaz que soy, a ti, mi querida amiga Esther S. Carty.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría de Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá y SENACYT bajo el Convenio de Colaboración Educativa 68-2018, por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

Al Ministerio de Ambiente por el financiamiento del proyecto: **“Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**, mediante el convenio 041-53-2019 del Fondo de Agua, Área Protegida y Vida Silvestre, en el cual el Dr. Alex O. Martínez Torres es el Investigador Principal.

A la Vicerrectoría de Investigación y Post Grado de la Universidad de Panamá (VIP) por los fondos obtenidos en la convocatoria universitaria a fondos de investigación -2018, en la categoría de Estudiante de Postgrado, bajo el título de **“Caracterización genética de virus y bacterias en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**

Al Sistema Nacional de Investigación (SNI) de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT), como ganadora en la categoría de Estudiante de Maestría.

A mi director de tesis, el Dr. Alex O. Martínez Torres y al Dr. Jordi Querol-Audi, por toda la asesoría, recomendaciones, conocimientos, tiempo, motivación y apoyo incondicional para la ejecución de este estudio.

Al profesor Fermín Mejía por su constante motivación, colaboración, recomendaciones en cada etapa de este recorrido.

A la Dra. Gesabel Navarro, por todos los conocimientos compartidos y colaboración en el uso de equipos.

Al profesor Humberto Cornejo director del Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y al Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA) por brindar el espacio para la elaboración de la etapa experimental de este trabajo. A LAMEXA y LAMA de la VIP, y a todo el equipo de trabajo de LAMEXA y LAMA, por la colaboración en este estudio.

Al Departamento de Bioquímica, Farmacología y al Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, por el apoyo con equipos indispensables para el procesamiento de las muestras.

Al Dr. José González Santamaria y la MSc. Madelaine Sugasti, del Departamento de Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por la donación de las líneas de células utilizadas en este estudio.

A la MSc. Ilka Guerra del Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por la donación de controles positivos de AdV y las líneas de células utilizadas en este estudio.

Al Dr. Julio Nieto del Hospital del Niño por la donación de controles positivos para AdV y RoV entéricos, y la vacuna de EV de virus vivo atenuado, utilizado como control positivo para EV.

A los Drs. Nohelia Castro y Cristobal Chaidez, del CIAD de México por sus recomendaciones en la metodología del estudio.

A todos los estudiantes de Licenciatura de la Orientación de Microbiología que han sido parte del proyecto de **“Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**, por toda la colaboración en logística, preparación de reactivos y muestras.

A Gabriela Rodríguez, por su apoyo para la secuenciación de las muestras positivas.

A Yeimisol Madrid, por toda la colaboración para la ejecución de este estudio hasta el último día. Gran compañera y amiga.

A Máximo Montalvo por la donación de reactivos e insumos para el proyecto, por su asesoría para la detección de colífagos. Y a su equipo de trabajo (Alison y Ginna) por compartir sus conocimientos adquiridos y asesoramiento en la preparación de estos reactivos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
CAPITULO I INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	7
INTRODUCCIÓN-----	8
MARCO TEÓRICO	9
Características Generales de los Virus -----	10
Generalidades.....	10
Tamaño de los Virus	10
Estructura de los Virus.....	10
Simetría Viral.....	11
Sensibilidad de los virus a factores del ambiente y otros agentes	12
Origen y distribución de los virus en el ambiente.....	12
BACTERIÓFAGOS-----	15
Generalidades.....	15
Estructura de los Bacteriófagos	16
Ciclo Replicativo de los Bacteriófagos	17
Supervivencia de los Bacteriófagos	18
Implementación de los Bacteriófagos	19
Bacteriófagos como indicador de contaminación viral en los Bivalvos	20
Gastroenteritis por Infección Viral	21
ADENOVIRUS -----	21
Generalidades.....	21
Estructura del Adenovirus.....	22
Sintomatología clínica de la Infección por AdV.....	25
Supervivencia de los AdV.....	26
Diagnóstico	26
Epidemiología de los brotes producidos por AdV	28
Mecanismo de transmisión	34
Prevención.....	34
ENTEROVIRUS -----	35
Generalidades.....	35
Estructura del Enterovirus.....	35

Sintomatología clínica	43
Diagnóstico	43
Epidemiología de los brotes causados por EV	46
Mecanismo de transmisión del EV	48
Prevención.....	49
ROTAVIRUS -----	50
Generalidades.....	50
Estructura del RoV.....	51
Sintomatología Clínica del RoV	56
Supervivencia.....	57
Diagnóstico	58
Epidemiología de los brotes producidos por RoV	59
Mecanismos de Transmisión.....	61
Prevención.....	62
Los Moluscos Bivalvos como Agentes Transmisores de Enfermedades Infecciosas.....	64
OBJETIVOS -----	68
Objetivo General	68
Objetivos Específicos.....	68
Hipótesis de trabajo.....	68
CAPÍTULO II	69
MATERIALES Y MÉTODOS	69
METODOLOGÍA -----	70
Procedencia de las muestras.....	70
Diseño experimental	71
Procesamiento de las muestras.....	72
Detección de colífagos -----	73
Aislamiento viral -----	74
Cultivo celular.....	74
Crecimiento de cultivo celular	75
Tripsinización y pasaje o sub-cultivo	75
Preparación de platos para infección viral	76
Infección viral	77
Clarificación de las muestras	78
Detección molecular-----	78

Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación de los ácidos nucleicos.....	78
Estandarización de técnicas moleculares para la detección viral de AdV, EV y RoV en bivalvos -----	78
Detección molecular de AdV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-PCR anidada -----	79
Detección molecular de EV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-RT-PCR anidada -----	80
Detección molecular de RoV en muestras directas de tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de RT-PCR anidada-----	81
PCR anidadas	82
Estandarización para la secuenciación de AdV por PCR anidada y de EV por RT-PCR anidada-----	83
CAPÍTULO III.....	87
RESULTADOS Y.....	87
DISCUSIÓN	87
DETECCION DE COLIFAGOS	88
AISLAMIENTO VIRAL	91
DETECCION MOLECULAR -----	94
ESTANDARIZACION PARA LA DETECCION VIRAL DE AdV, EV Y RoV EN BIVALVOS	94
Detección molecular de AdV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-PCR anidada -----	97
Detección molecular de EV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-RT-PCR anidada -----	100
Detección molecular de RoV en muestras directas de tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de RT-PCR anidada-----	104
DETECCIÓN DE COINFECCIÓN VIRAL EN BIVALVOS -----	104
Estandarización para la secuenciación de AdV por PCR anidada y de EV por RT-PCR anidada -----	106
DISCUSIÓN -----	111
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	128
CONCLUSIONES -----	129
RECOMENDACIONES-----	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	131
ANEXOS	164

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas integrantes de la cápside de los AdV (Pina, 2001).	24
Tabla 2. Tipos de Virus y rango de huéspedes a los que infectan (Hernández y Garcia, 2014).....	41
Tabla 3. Clasificación de los enterovirus humanos (Sánchez y Martí, 2019).	42
Tabla 4. Preparación de medio de cultivo de crecimiento al 10 % y mantenimiento al 2 %, para un volumen final de 500 mL.....	75
Tabla 5. Secuencia (5´- 3´) específica para 60 serotipos de AdV humanos.....	80
Tabla 6. Secuencia (5´- 3´) específica para la detección de EV humanos.....	81
Tabla 7. Secuencia (5´- 3´) específica para la detección de RoV humanos.....	82
Tabla 8. Secuencia (5´- 3´) específica para la secuenciación de AdV humanos.....	84
Tabla 9. Secuencia (5´- 3´) específica para la secuenciación de EV humanos.....	86
Tabla 10. Análisis estadístico de colífagos (X^2 y Odd).	88
Tabla 11. Análisis estadístico de virus en bivalvos (X^2 y Odd).....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de transmisión de los virus entéricos a los humanos en el ambiente (Melnick <i>et al.</i> , 1978).....	15
Figura 2. A) Estructura general de los bacteriófagos de cola. B) Morfología de las tres familias de bacteriófagos pertenecientes al orden <i>Caudovirales</i> (Ríos-Sandoval, 2019).....	17
Figura 3. Ciclo replicativo del bacteriófago Lambda (λ). El fago infecta a una célula bacteriana, inyectando su ADN y en caso de entrar en estado lisogénico, puede pasar al estado lítico mediante inducción (Ríos-Sandoval, 2019).....	18
Figura 4. Estructura del AdV. Diagrama esquemático del AdV Humano (AdVH) el cual muestra las trece proteínas estructurales del virión (Bolón, 2016).	23
Figura 5. Organización del genoma de AdV (Pina, 2001).	25
Figura 6. A) Esquema de la cápside icosaédrica T=3 (pequeño dodecaedro estrellado). Cada una de las 60 facetas comprende tres protómeros (protómero = una copia de la proteína CP de la cápside) y coincide con la unidad asimétrica cristalográfica (líneas gruesas). B) Esquema de la cápside icosaédrica T=1 pseudoT=3. El protómero de picornavirus (que comprende una copia de cada una de las proteínas de la cápside VP1, VP0, VP3) y las facetas de la cápside T=3 son distintas. De hecho, tres protómeros constituyen cada una de las 20 facetas del icosaedro (así T=1). Donde se escinde VP0, la cuarta proteína de la cápside (VP4) se ubica sobre la superficie interna del vértice pentamérico del icosaedro (Zell <i>et al.</i> , 2017). C) Estructura de la cápside de EV. Las proteínas estructurales VP1-3 se encuentran en la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en la cara interna. En el interior se encuentra un ARN+ monocatenario unido a una proteína viral (VPg) (Hernández y García, 2014).....	37
Figura 7. Mapa genómico de EV y la secuencia de procesamiento sobre la poliproteína (Lulla <i>et al.</i> , 2019; Hernández y García, 2014).....	39
Figura 8. Ciclo de vida del EV (Baggen <i>et al.</i> , 2018).	40
Figura 9. A). Microfotografía electrónica. B) Estructura del Rotavirus (Tamayo <i>et al.</i> , 2007; Estes y Cohen, 1989).	53
Figura 10. Ciclo de Replicación Viral de Rotavirus (Trask <i>et al.</i> , 2012).....	55
Figura 11. Destino de los virus en los ecosistemas marítimos (Melnick y Gerba,	

1980).....67

Figura 12. Área de estudio y recolección de los bivalvos en el Golfo de Panamá. Elaborado por Asquena Aguilar. 71

Figura 13. Platos de agar con UFP. A) UFP de colífagos de la muestra 5 de *Leukoma* sp. del mes de marzo, dilución 10^{-7} , temporada seca. B) UFP de colífagos de la muestra 2 de *Donax* sp. del mes de marzo, dilución 10^{-8} , temporada seca. C) UFP de colífagos de la muestra 3 de *Donax* sp. del mes de octubre, dilución 10^{-8} , temporada lluviosa. D) UFP de colífagos de la muestra 2 de *A. tuberculosa* del mes de noviembre, dilución 10^{-8} , de la temporada lluviosa. 89

Figura 14. Porcentaje de presencia de Colífagos durante todo el periodo de estudio según frecuencia absoluta. 89

Figura 15. Porcentaje de presencia de Colífagos en las temporadas de estudio según frecuencia absoluta. 90

Figura 16. Porcentaje de presencia de Colífagos en los meses de estudio según frecuencia absoluta. 90

Figura 17. Porcentaje de presencia de Colífagos en los tres géneros de bivalvos en estudio según frecuencia absoluta. 90

Figura 18. Aislamiento viral en células Vero de muestras de Bivalvos de importancia comercial. A) Control negativo. B) Primera infección, ECP con la muestra 2 de *Leukoma* sp. del mes de marzo, posterior a 1 h de la infección. C) Células Vero levantadas a las 24 h de la infección correspondientes a la muestra 2 del género *Leukoma* sp. D) Segundo pasaje, células infectadas con muestras después de 1 h de infección. E) ECP en las células Vero posterior a las 48 h de infección. F) Células Vero al transcurrir 72 h de infección. 93

Figura 19. Porcentaje de ECP del segundo pasaje en las muestras de bivalvos según frecuencia absoluta. 94

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la estandarización de AdV utilizando los controles positivos donados por el ICGES y el HDN. En la parte superior se indica el número de pocillo, ¹Marcador de peso molecular de 100 bp, ²AdV procedentes de células Vero pasaje 27 infectadas en LAMEXA, ³AdV procedente del ICGES producto del aislamiento viral de muestras respiratorias, ⁴AdV de procedencia desconocida, ⁵AdV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN, ⁶Control negativo de PCR, ⁷Control negativo PCR anidada. 95

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la

estandarización de EV humano utilizando los controles positivos donados por el HDN. A) ¹Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo A, ²Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo A, ³Control negativo del cebador del grupo A, ⁴Marcador de peso molecular 100 pb, ⁵Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo B, ⁶Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo B, ⁷Control negativo del cebador del grupo B. B) ³Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador seleccionado y una concentración de 2.5 MgCl₂, ⁴Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador seleccionado y una concentración de 3.0 MgCl₂, ^mMarcador de peso molecular de 100 pb, ⁶Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) para el cebador seleccionado y una concentración de 3.5 MgCl₂, ⁷Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) para el cebador seleccionado y una concentración de 4.0 MgCl₂. 96

Figura 22. ¹Marcador de peso molecular 100 pb, ³RoV procedente de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (vacuna Rotateq) con la secuencia 2.1, ⁴RoV procedente de la Universidad Nacional Autónoma de León, Nicaragua (vacuna Rotateq) con la secuencia 2.2. ⁵RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.10, secuencia 2.1, ⁶RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.10, secuencia 2.2, ⁷RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.2, secuencia 2.1, ⁸RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.2, secuencia 2.2, ⁹Control negativo de RT-PCR secuencia 2.1 ¹⁰Control negativo de RT-PCR secuencia 2.2, ¹¹Control negativo de PCR secuencia 2.1, ¹²Control negativo de PCR secuencia 2.2.....97

Figura 23. Presencia de AdV durante periodo de estudio según frecuencia absoluta.98

Figura 24. Presencia de AdV en las temporadas de estudios según frecuencia absoluta... 98

Figura 25. Presencia de AdV en los meses de estudios según frecuencia absoluta.99

Figura 26. Presencia de AdV en los tres géneros de bivalvos en estudio según frecuencia absoluta. 100

Figura 27. Detección de AdV en bivalvos visualizado en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. A) ¹Marcador de peso molecular, ²DF1, ³DF2, ⁴DF3, ⁵DF4, ⁶DF5, ⁷AM1, ⁸AM2, ⁹AM3, ¹⁰AM4, ¹¹AM5, ¹²C+ AdV, ¹³C-. B) ¹Marcador de peso molecular, ²AA1, ³AA2, ⁴AA3, ⁵AA4, ⁶AA5, ⁷PA1, ⁸PA2, ⁹PA3, ¹⁰PA4, ¹¹PA5, ¹²C+ AdV, ¹³C-. ***DF (*Donax sp.* de febrero, seguido por el número de muestra), AM (*A. tuberculosa* de marzo, seguido por el

número de muestra), AA (*A. tuberculosa* de abril, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma sp.* de abril, seguido por el número de muestra), C+ (control positivo AdV), C- (control negativo). 100

Figura 28. Porcentaje de presencia de EV en el periodo de estudio según frecuencia absoluta. 101

Figura 29. Porcentaje de presencia de EV en las temporadas de estudio según frecuencia absoluta. 102

Figura 30. Porcentaje de presencia de EV en los meses de estudio según frecuencia absoluta. 102

Figura 31. Porcentaje de presencia de EV en los géneros de bivalvos según frecuencia absoluta.;Error! Marcador no definido.

Figura 32. Detección de EV en bivalvos visualizado en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la detección de EV en las muestras de bivalvos. A. ¹EM, ²AO1, ³AO2, ⁴AO3, ⁵AO4, ⁶AO5, ⁷PO1, ⁸PO2, ⁹PO3, ¹⁰PO4, ¹¹PO5, ¹²DO1, ¹³DO2, ¹⁴DO3, ¹⁵DO4, ¹⁶DO5, ¹⁷AN1, ¹⁸AN2, ¹⁹AN3, ²⁰AN4, ²¹AN5, ²²C+, ²³C-, ²⁴EM. B. ¹EM, ²DA1, ³DA2, ⁴DA3, ⁵DA4, ⁶DA5, ⁷AS1, ⁸AS2, ⁹AS3, ¹⁰AS4, ¹¹AS5, ¹²PS1, ¹³PS2, ¹⁴PS3, ¹⁵PS4, ¹⁶PS5, ¹⁷DS1, ¹⁸DS2, ¹⁹DS3, ²⁰DS4, ²¹DS5, ²²C+, ²³C-, ²⁴EM. ***EM (marcador de peso molecular, 100bp), AO (*A. tuberculosa* de octubre, seguido por el número de muestra), PO (*Leukoma sp.* de octubre, seguido por el número de muestra), DO (*Donax sp.* de octubre, seguido por el número de muestra), AN (*A. tuberculosa* de noviembre, seguido por el número de muestra), DA (*Donax sp.* de abril, seguido por el número de muestra), AS (*A. tuberculosa* de septiembre, seguido por el número de muestra), PS (*Leukoma sp.* de septiembre, seguido por el número de muestra), DS (*Donax sp.* de septiembre, seguido por el número de muestra), (C+ (control positivo EV), C- (control negativo)).103

Figura 33. Detección de RoV en bivalvos visualizaados en gel de agarosa al 1.5%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la detección de RoV en las muestras de bivalvos. A. ¹PM1, ²PM2, ³PM3, ⁴PM4, ⁵PM5, ⁶DM1, ⁷DM2, ⁸DM3, ⁹DM4, ¹⁰DM5, ¹¹Marcador de peso molecular 100bp. B. ¹Marcador de peso molecular 100bp, ²PA5, ³DA1, ⁴DA2, ⁵DA3, ⁶DA4, ⁷DA5, ⁸C+, ⁹C- RT-PCR, ¹⁰C- PCR. ***PM (*Leukoma sp.* de marzo, seguido por el número de muestra), AM (*A. tuberculosa* de marzo, seguido por el número de muestra), DM (*Donax sp.* de marzo, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma sp.* de abril, seguido por el número de muestra), DA (*Donax sp.* de abril, seguido por el número de muestra), C+ (control positivo RoV), C- (control negativo). 104

Figura 34. Porcentaje de infección y coinfección en los bivalvos analizados, según frecuencia absoluta. 105

Figura 35. Estandarización para la secuenciación de AdV utilizando muestras de bivalvos previamente detectadas visualizadas en gel de agarosa al 2.0%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. ¹C+ para AdV concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ²C+ para AdV concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ³C+ para AdV concentración de 3.0 mM de MgCl₂, ⁴C+ para AdV concentración de 3.0 mM de MgCl₂, ⁵Carril vacío, ⁶Marcador de peso molecular 100 bp, ⁷C+ para AdV concentración de 4.0 mM de MgCl₂, ⁸C+ para AdV concentración de 4.0 mM de MgCl₂. 107

Figura 36. Estandarización para la secuenciación de EV utilizando muestras de bivalvos previamente detectadas visualizadas en gel de agarosa al 2.0%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. ^M Marcador de peso molecular, ^{A+}C+ para EV con cebadores del grupo A concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{A-}C- para EV con cebadores del grupo A concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{B+}C+ para EV con cebadores del grupo B concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{C+}C+ para EV con cebadores del grupo C concentración de 2.0 mM de MgCl₂. * Cada sección se repite cambiando las concentraciones de MgCl₂. 109**

Figura 37. Amplificación para la secuenciación de EV en muestras de bivalvos previamente detectadas con la infección de EV. ^MMarcador de peso molecular, ^{A6}PM4, ^{A11}PA1, ^{A12}PA4, ^{A1}DF3, ^{A7}DM2, ^{A8}DM3, ^{A10}AA3, ^{A13}DA2, ^{A16}PO1, ^{A17}PO3, ^{A19}PN1, ^{A15}PS5, ^{A14}PS1, ^{B1}DF3, ^{B7}DM2, ^{B8}DM3, ^{B10}AA3, ^{B13}DA2, ^{B16}PO1, ^{B17}PO3, ^{B19}PN1, ^{C1}DF3, ^{C7}DM2, ^{C8}DM3, ^{C10}AA3, ^{C13}DA2, ^{C16}PO1, ^{C17}PO3, ^{C19}PN1. *PM(*Leukoma* sp. mes de marzo, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), DF (*Donax* sp. mes de febrero, seguido por el número de muestra), DM (*Donax* sp. mes de marzo, seguido por el número de muestra), AA (*Anadara tuberculosa* mes de abril, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), PO (*Leukoma* sp. mes de octubre, seguido por el número de muestra), PN (*Leukoma* sp. mes de noviembre, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), las letras A, B, C, son los grupos de cebadores. 110**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdV	Adenovirus
ARN	Ácido ribonucleico
AstV	Astrovirus
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CV	Coxsackievirus
ECP	Efecto Citopático
EIA	Inmunoensayo Enzimático
ETESA	Empresa de Transmisión Eléctrica S.A.
EV	Enterovirus
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FRI	Infección Respiratoria Febril
HAdV	Adenovirus humano
HAV	Virus de Hepatitis A
HDN	Hospital del Niño
HEV	Virus de Hepatitis E
ICC-PCRn	Cultivo Celular Integrado – Reacción en Cadena de Polimerasa anidada
ICC-RT-PCRn	Cultivo Celular Integrado – Transcriptasa Inversa-Reacción en Cadena de Polimerasa anidada
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IGNTG	Instituto Geográfico Nacional “Tommy Guardia”

INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censo
IRAG	Infección Respiratoria Aguda Grave
LA	Aglutinación por Látex
LAMA	Laboratorio de Microbiología de Aguas
LAMEXA	Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
NoV	Norovirus
NSP	Proteínas No Estructurales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Tamponada de Fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
RoV	Rotavirus
RVA	Rotavirus tipo A
SaV	Saporovirus
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
UCR	Universidad de Costa Rica
UFP	Unidad Formadora de Placas
UV	Ultravioleta
VIP	Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

RESUMEN

Los virus entéricos se transmiten por la ruta oral-fecal infectando células del tracto gastrointestinal, causando gastroenteritis e incluso enfermedades sistémicas. Varios de ellos, como los son Rotavirus, Enterovirus y Adenovirus, han producido síntomas clínicos en humanos asociados al consumo de bivalvos. Por otro lado, los colífagos presentan un gran potencial como indicadores de contaminación fecal de virus antropogénicos, porque diversos estudios muestran una alta correlación entre la presencia de fagos y virus humanos en bivalvos. Con el fin de detectar virus entéricos y colífagos en *Anadara tuberculosa*, *Leukoma sp.* *Donax sp.* en tres zonas específicas del Golfo de Panamá, se colectaron 90 muestras de estos bivalvos. Se colectaron cinco muestras de cada especie por tres meses en temporada lluviosa (septiembre, octubre y noviembre) de 2020 y tres meses en temporada seca (febrero, marzo y abril) de 2021. Se detectaron de colífagos utilizando la técnica de doble capa de agar, obteniéndose 87.8% de presencia de colífagos total, en la temporada lluviosa un 91.1% y en temporada seca un 84.4%. Mediante ensayos de infección en cultivo celular en células Vero, se observó un 97.8% de ECP después de 72 h de infección. Seguido, la detección de AdV y EV utilizando la técnica de ICC-PCR e ICC-RT-PCR anidada, y la detección directa con RT-PCR anidada para RoV. Se detectó un 12% de AdV en las muestras analizadas. Con mayor presencia en la temporada seca (17.8% de positividad). Las tres especies de bivalvos presentaron AdV, con un 20.0%, 13.3% y 3.3% para *Donax sp.*, *Leukoma sp.* y *A. tuberculosa*, respectivamente. Se observó la presencia de EV en 21.1% de las muestras analizadas, con mayor presencia en temporada seca con 28.8%. El género *Leukoma sp.* dominó en la presencia viral con 30.0%, seguido por *Donax sp.* con 20.0% y *A. tuberculosa* con 13.3%. RoV solo se detectó en 0.9% en el género de *Leukoma sp.* del mes de marzo. Se reporta coinfección en 6.7% de las muestras analizadas para AdV-EV y en 1.1% para EV-RoV. Se estandarizó la metodología de la RT-PCR anidada y PCR anidada para la secuenciación parcial del genoma de AdV y EV. Estos resultados

demuestran la presencia de virus entéricos en los bivalvos de consumo en la población panameña, siendo de importancia para establecer futuras investigaciones en estos productos de mar a lo largo del litoral panameño, para establecer gestión de manejo en las zonas de producción, que contribuyan a la salud pública y a la vigilancia epidemiológica en nuestro país.

Palabras claves: Virus entéricos, Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus, colífagos, cultivo celular, ICC-PCR, Bivalvos.

ABSTRACT

Enteric viruses are transmitted by the oral-fecal route, infecting cells of the gastrointestinal tract, causing gastroenteritis and even systemic diseases. Several of them, such as Rotavirus, Enterovirus and Adenovirus, have produced clinical symptoms in humans associated with the consumption of bivalves. On the other hand, coliphages have great potential as indicators of fecal contamination of anthropogenic viruses, because several studies show a high correlation between the presence of phages and human viruses in bivalves. In order to detect enteric viruses and coliphages in *Anadara tubers*, *Leukoma sp.* and *Donax sp.* In three specific areas of the Gulf of Panama, 90 samples of these bivalves were collected. Five samples of each species were collected for three months in the rainy season (September, October and November) of 2020 and three months in the dry season (February, March and April) of 2021. Coliphages were detected using the double layer agar technique, obtaining 87.8% of total coliphage presence, 91.1% in the rainy season and 84.4% in the dry season. Using cell culture infection assays in Vero cells, 97.8% CPE was observed after 72 h of infection. Followed by the detection of AdV and EV using the ICC-PCR and nested ICC-RT-PCR technique, and direct detection with nested RT-PCR for RoV. The 12% AdV was detected in the analyzed samples. With greater presence in the dry season (17.8% positivity). The three species of bivalves presented AdV, with 20.0%, 13.3% and 3.3% for *Donax sp.*, *Leukoma sp.* and *A. tuberculosa*, respectively. The presence of EV was observed in 21.1% of the samples analyzed, with a greater presence in the dry season with 28.8%. The genus *Leukoma sp.* dominated in the viral presence with 30.0%, followed by *Donax sp.* with 20.0% and *A. tuberculosa* with 13.3%. RoV was only detected in 0.9% of the genus *Leukoma sp.* of the month of March. Coinfection is reported in 6.7% of the samples analyzed for AdV-EV and in 1.1% for EV-RoV. The nested RT-PCR and nested PCR methodology was standardized for the partial sequencing of the AdV and EV genome. These results demonstrate the presence of enteric viruses in bivalves for consumption in the

Panamanian population, being important to establish future research on these seafood along the Panamanian coast, to establish management management in production areas, which contribute public health and epidemiological surveillance in our country.

Keywords: Enteric viruses, Adenoviruses, Enteroviruses, Rotaviruses, coliphages, cell culture, ICC-PCR, ICC-RT-PC, Bivalves.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Los moluscos-bivalvos son parte importante de los recursos alimenticios a escala mundial que son extraídos de las zonas marino-costeras. La actividad económica relacionada con la explotación de los criaderos naturales de moluscos bivalvos y el cultivo artificial tiene una gran importancia en la Comunidad Europea. Los brotes de enfermedades producidas por virus entéricos tras el consumo de moluscos constituyen un peligro importante para la salud pública a nivel mundial. Una detección eficiente de estos patógenos en el ambiente es de importancia para preservar la salud de la población (Romalde, 2014). La presencia de virus entéricos en moluscos está asociado a la contaminación antropogénica, ya sea a la cercanía de zonas urbanas, factores físicos como la profundidad y poco movimiento de agua, y su cercanía a la zona de cosechas de estos recursos marinos para consumo dietético (Romalde *et al.*, 2018).

La gastroenteritis relacionada a una infección viral presenta una alta incidencia en los diagnósticos clínicos. En el mundo, mantiene una prevalencia de un 30 al 40% de frecuencia en diagnóstico de cuadro de diarrea aguda o crónica. Esta recurrencia ha sido liderizada por los virus de interés para este estudio los cuales podemos mencionar: Adenovirus (AdV) grupo F, Enterovirus (EV), Rotavirus (RoV) del grupo A, pero también, otros virus que no serán estudiado en esta ocasión pero mantienen una alta relevancia en el tema como: Norovirus (NoV), virus de Hepatitis A (HAV), virus de Hepatitis E (HEV), Saporovirus (SaV), Astrovirus (AstV), Parvovirus y otros menos comunes como Reovirus, Coronavirus y Torovirus (Shaheen, 2018; Díez-Valcarce *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2017; Martínez-Azcona *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Kittigul *et al.*, 2015; Suffredini *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014; Rodríguez-Frias *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2008; Le Guyader *et al.*, 2008; Shieh *et al.*, 2007; Baert *et al.*, 2007; Elamri *et al.*, 2006; Fong y Lipp, 2005, Koizumi *et al.*, 2004; Beuret *et al.*, 2003; Di Pinto *et al.*, 2003; Mullendore *et al.*, 2001).

MARCO TEÓRICO

Características Generales de los Virus

Generalidades

Los virus son pequeñas partículas infecciosas de aproximadamente 20 – 300 nm, están constituidos por un solo ácido nucleico, ADN o ARN, su organización estructural es simple y su mecanismo de replicación se da en el interior de una célula viva, por lo que son considerados parásitos estrictos u obligados que necesitan la maquinaria celular del huésped para producir sus proteínas (Nasir et al., 2020). Además, tienen la capacidad de infectar bacterias, hongos, parásitos, plantas y animales, incluyendo al hombre (Etchegaray, 2011). La primera definición de virus fue propuesta por Lwoff (1957), quien definió a los virus como “entidad estrictamente celular y potencialmente patogénica con una fase infecciosa. Posee un solo tipo de ácido nucleico, es incapaz de crecer y reproducirse por fisión binaria, y carecen de enzimas para producir energía”. Una segunda definición fue propuesta en 1967 por Luria y Darnell: “los virus son entidades cuyo genoma se replica dentro de células vivas usando su maquinaria de síntesis. Esto determina la formación de elementos que permiten la transferencia del genoma viral a otras células” (Negroni y González, 2018; Santos *et al.*, 2004).

Tamaño de los Virus

Los virus son microorganismos que solo pueden ser observados mediante microscopía electrónica (Peña y Faúndes, 2019; Negroni y González, 2018). Presentan una gran variedad de tamaños y formas de virus, y se han reportado virus con un tamaño de aproximadamente 20 nm como por ejemplo el Parvovirus B19 (B19V) de 22 nm (Gallinella, 2013) y virus de hasta 300 nm como el Virus del Molusco Contagioso (Bakshi y Rajalakshmi, 2016).

Estructura de los Virus

El ácido nucleico portador de la información genética y que constituye el genoma viral, está compuesto por un tipo específico de ácido nucleico, ya

sea, por ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) (Peña y Faúndes, 2019; Santos *et al.*, 2004). El ácido nucleico puede ser de doble o simple cadena, es decir, monocatenario o bicatenario, segmentado o no, circular o lineal (Negroni y González, 2018).

El genoma viral es considerado la parte central del virus y puede estar rodeado por una cubierta proteica denominada cápside. La cápside protege al genoma viral, otorga la simetría viral y además, facilita la absorción de los virus (virus desnudos) a los receptores de las células y capacidad antigénica. Algunos virus presentan una estructura más externa, denominada envoltura. La presencia o ausencia de esta estructura es una característica significativa para la clasificación de los virus en dos grandes grupos: virus desnudos y virus envueltos. Los virus envueltos, son aquellos con presencia de envoltura y los virus desnudos, son aquellos que carecen de envoltura, siendo el grupo de interés para este estudio (Peña y Faúndes, 2019).

La envoltura es una bicapa lipoproteica, que favorece a los virus que la poseen en la fijación a las células que van a infectar. Aunque la presencia de esta estructura hace a los virus sensibles a los solventes lipídicos, los detergentes, la desecación o la acidez, esta estructura brinda protección a la nucleocápside, adherencia a los receptores celulares y la antigenicidad. Por tal razón, una vez se pierde la envoltura, el virus deja de ser infectivo (Etchegaray, 2011).

Simetría Viral

El distinto ordenamiento de la nucleocápside le da al virus una determinada morfología que puede ser:

Icosaédrica: poliedro regular de 20 caras planas triangulares. Se puede mencionar el virus del papiloma humano que es un virus desnudo (Rincón *et al.*, 2017) o virus envueltos como el virus herpes (Amor y Sánchez-Conde, 2006).

Helicoidal: estructura en espiral o hélice. Es cuando el capsómero se encuentra dispuesto en forma de hélice, parecida a una escalera caracol. Puede ser rígida y extendida como un tubo cilíndrico sin envoltura como el virus del mosaico del tabaco (Scholthof, 1997) o flexible y enrollada sobre sí misma, con envoltura como el virus de la gripe (Garrido, 2010).

Binaria: son virus que presentan ambas simetrías (icosaédrica y helicoidal) en su estructura; los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) son un claro ejemplo dado que una cabeza icosaédrica y una cola helicoidal (Etchegaray, 2011).

Compleja: no hay simetría regular. Aquellos que no tienen cápsides claramente identificables, no son ni icosaédricos ni helicoidales. Un ejemplo son los Poxvirus, como el virus de la viruela (García, 2014).

Sensibilidad de los virus a factores del ambiente y otros agentes

Virus desnudos: son más resistentes a las condiciones ambientales como temperatura, acidez, proteasas, sales biliares, detergentes o desecación. Superan condiciones adversas como las del intestino o aguas residuales con insuficiencias al ser tratadas. Estos se encuentran con mayor facilidad sobre fomites, manos, polvos y pequeñas gotitas o aerosoles (Peña y Faúndes, 2019).

Virus envueltos: son más lábiles a condiciones ambientales y son alterados por acidez, detergentes, desecación, calor, etc. Necesitan humedad, no sobreviven en el tracto intestinal, se diseminan por gotitas grandes, secreciones o trasplantes de órganos o sangre (Negroni y González, 2018).

Origen y distribución de los virus en el ambiente

Los ecosistemas acuáticos no contaminados presentan poblaciones abundantes de virus que pertenecen a la comunidad planctónica, estimándose la población natural de virus en los océanos en 3.0×10^{30} partículas virales/mL (Suttle, 2007). Los medios acuáticos cercanos a

núcleos de población, además, reciben grandes aportes de cargas virales y de otros microorganismos que son excretados por el hombre, y otros animales a través de las heces y la orina de individuos infectados, convirtiéndose en un riesgo para la salud pública (Saavedra *et al.*, 2012; Formiga-Cruz *et al.*, 2005). Esto altera la dinámica de los niveles tróficos desde fuentes planctónicas hasta los consumidores terciarios y por tanto, son de importancia para entender el funcionamiento de las relaciones específicas entre las comunidades. La influencia que ejercen los virus en la composición de las comunidades marinas y su comportamiento al infectar a otros organismos, introduciendo nueva información genética en estos, impulsan la evolución tanto del huésped como de los propios conjuntos virales (Suttle, 2007).

Los virus pueden sobrevivir durante varios meses en el medio, pueden resistir los procesos de tratamiento convencionales del agua, incluyendo la cloración, lo que constituye un riesgo potencial en la población expuesta a nuevas infecciones (Bosch *et al.*, 2016; Saavedra *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2006). Pero estos, deben depender en gran medida del grado de robustez, lo que les permite permanecer infecciosos frente a las diversas condiciones que encuentran en el ambiente y los alimentos, y factores físicos, químicos y biológicos que influyen en la persistencia de los virus en el ambiente (Bosch *et al.*, 2016):

1. Parámetros Físicos:

- a. Temperatura: una alta temperatura promueve la inactivación.
- b. Luz ultravioleta (UV): es un germicida.
- c. Dsecación: se da la inactivación por disminución de la humedad.
- d. Presión: una alta presión induce la inactivación.
- e. Adsorción/humedad: protege de la inactivación.

2. Parámetros Químicos:

- a. pH: valores de pH extremos aumenta la inestabilidad.

- b. Salinidad: es un virucida a concentraciones extremas de salinidad.
- c. Amonio: es un virucida.
- d. Iones inorgánicos: algunos son virucidas como Ag, Pt, Pd, Rh
- e. Materia orgánica: materia orgánica disuelta, sólida y coloidal protegen de la inactivación.
- f. Enzimas: las nucleasas y proteasas ayudan a la inactivación.

3. Parámetros Biológicos:

- a. Actividad Microbiana: contribuye a la inactivación.
- b. Depredación de protozoos: contribuyen a la muerte.
- c. Biopelículas: la adsorción de las biopelículas protege de la inactivación, mientras que la actividad microbiana en las biopelículas puede ser virucida.
- d. Tipo de virus: la estabilidad varía dependiendo de la familia, género, cepa y tipo de virus.

El conocimiento de las diversas vías de transmisión de los virus en el ambiente, ha provocado una creciente alarma al comprobarse que las poblaciones presentan altas posibilidades de adquirir alguna infección procedente de algún agente viral (Saavedra *et al.*, 2012). Las vías de transmisión incluyen (Bosch *et al.*, 2016) (Figura 1):

- Consumo de agua contaminada.
- Consumo de moluscos bivalvos o mariscos crudos o poco cocidos, donde los sitios de cosecha de estos recursos marinos estén contaminados, con descargas de aguas residuales poco tratadas o sin tratamiento.
- Consumo de vegetales con un sistema de regadío sin los tratamientos adecuados en la inactivación de estos agentes virales o que se han cultivado en terrenos abonados con mezcla de abono que contienen virus infecciosos.

- Contacto con aguas de baño que han recibido aporte de aguas contaminadas.
- Contacto con aerosoles generados a partir de aguas contaminadas.

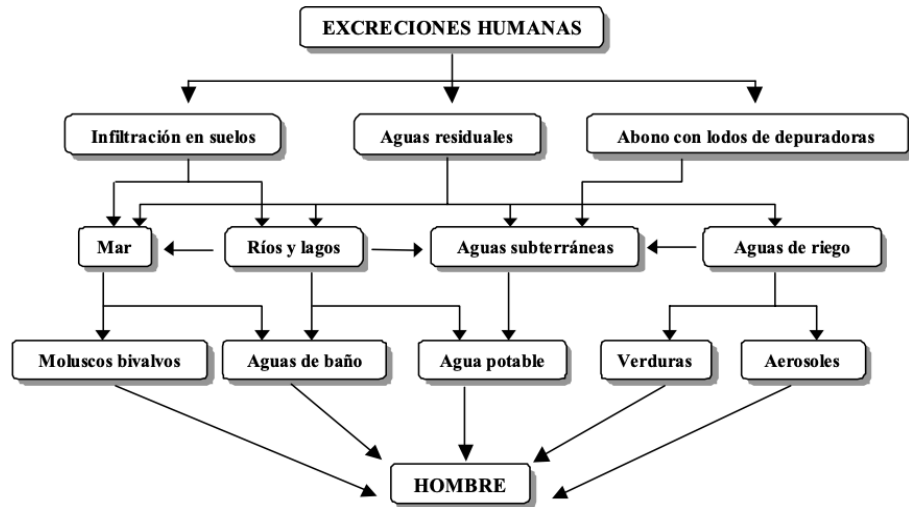


Figura 1. Ruta de transmisión de los virus entéricos a los humanos en el ambiente (Melnick *et al.*, 1978).

BACTERIÓFAGOS

Generalidades

El primer reporte de la presencia de los bacteriófagos fue en 1896 por Ernest Hanbury Hankin, quien informa una acción antibacteriana contra la bacteria que ocasiona el cólera, en el agua de los ríos Ganges y Yamuna en India (Hankin, 2011). Twort (1915), describió la presencia de un agente que infecta y mata bacterias, sin embargo, aunque él consideró que podía tratarse de un virus que creció y destruyó a las bacterias, no descartó la posibilidad de que solo se tratara de una etapa en el ciclo de vida de la bacteria o una enzima producida por la propia bacteria. Posteriormente, Félix Hubert d'Hérelle, del Instituto Pasteur de París, en 1917, anunció que había descubierto un microbio invisible antagónico del bacilo de la disentería, el cual mencionó como un microbio invisible, posiblemente un virus parásito de las bacterias y además, sugirió que este fenómeno no era específico de la disentería.

También, D'Hérelle fue quien acuñó el término “bacteriófago”, comedor de bacterias (del griego phagein = comer), realizó diversas investigaciones sobre bacteriófagos e introdujo el concepto de terapia de fagos o fagoterapia (Roux y D'Hérelle, 2011). Pronto los bacteriófagos fueron utilizados como agentes antimicrobianos para tratar y prevenir infecciones bacterianas en humanos, además de controlar enfermedades en plantas, detectar patógenos y evaluar la seguridad alimentaria (Pires *et al.*, 2016).

Estructura de los Bacteriófagos

Los bacteriófagos según su forma se dividen en fagos de cola o caudovirales, poliédricos, filamentosos y pleomórficos (Ackermann, 2003), de los cuales los más abundantes son los Caudovirales (cerca del 96%), fagos de cola (Hendrix, 2002). Aunque la mayoría de los autores manejan un orden (Caudovirales) y tres familias (Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae), la presente clasificación del Comité Internacional de Taxonomía Viral (por sus siglas en inglés, ICTV), incluye cinco familias Ackermannviridae, Herelleviridae, Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae dentro del mismo orden (ICTV, 2021). La mayoría de los Caudovirales contienen un genoma de ADN de doble cadena, pero hay pequeños grupos de fagos con genomas de ADN de cadena sencilla, ARN de cadena sencilla o ARN de cadena doble. Las familias se definen principalmente por la naturaleza del ácido nucleico y su morfología. Por otro lado, las pruebas de inactivación, patrones de restricción y rango de hospedero, son identificadores de especie y cepa (Abedon *et al.*, 2009; Ackermann, 2003).

La mayoría de los virus se encuentran usualmente en un rango de tamaño de cápside entre 30 y 60 nm, aunque existen excepciones de virus con cápsides mayores de 60 nm y menores de 30 nm. Sin embargo, han sido reportados virus gigantes con cápsides de 200 a > 700 nm en aguas dulces y ambientes marinos (Weinbauer, 2004). Todos los fagos de cola, presentan la misma estructura general, poseyendo una cápside en cuyo interior,

empaqueta el ADN, collar, cola, placa basal, fibras de la cola y vaina (Figura 2A). La familia Myoviridae tiene colas contráctiles y rígidas, Podoviridae tiene colas cortas no contráctiles y Siphoviridae tiene colas largas y flexibles. Los fagos pertenecientes a otras familias, tienen morfologías altamente variables con genomas de diferente composición de ácidos nucleicos (Buttimer *et al.*, 2017) (Figura 2B).

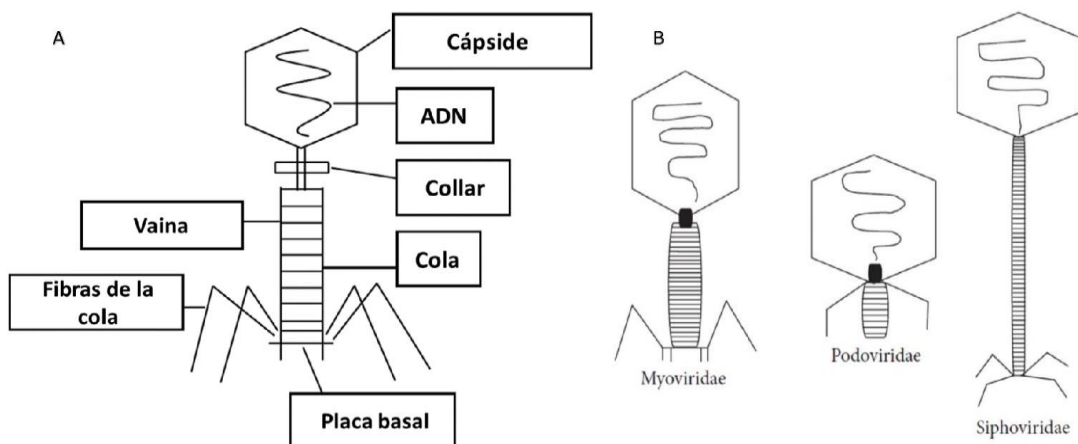


Figura 2. A) Estructura general de los bacteriófagos de cola. **B)** Morfología de las tres familias de bacteriófagos pertenecientes al orden *Caudovirales* (Ríos-Sandoval, 2019).

Ciclo Replicativo de los Bacteriófagos

Los bacteriófagos pueden estar presentes en cualquier ambiente donde se localice su hospedero bacteriano, desde suelos áridos y ambientes marinos, hasta aguas termales y alimentos (Abo-Senna, 2017; Jończyk *et al.*, 2011; Schoenfeld *et al.*, 2008). Pueden presentar dos fases en su ciclo replicativo, el lítico y el lisogénico. En el ciclo lítico, los fagos replican su ADN y producen nuevos fagos que son liberados al ambiente al destruir a la bacteria, y en el ciclo lisogénico, los genes líticos no se expresan, el ADN viral es integrado en el huésped y se replica junto con el ADN bacteriano, y esto otorga al virus, un mecanismo alternativo para hacer más copias de su genoma, provocando para los distintos fagos, que el cambio de un ciclo a otro pueda ocurrir mediante diferentes mecanismos (Ríos-Sandoval, 2019). El ciclo de vida de

un fago lítico, se puede dividir en tres etapas generales: adsorción, maduración (producción de la progenie dentro de la célula) y lisis (Shao y Wang, 2008). Mientras que el ciclo de vida lisogénico consta de: adsorción, integración del genoma viral al genoma bacteriano y replicación del genoma viral junto con el genoma bacteriano (Ríos-Sandoval, 2019) (Figura 3).

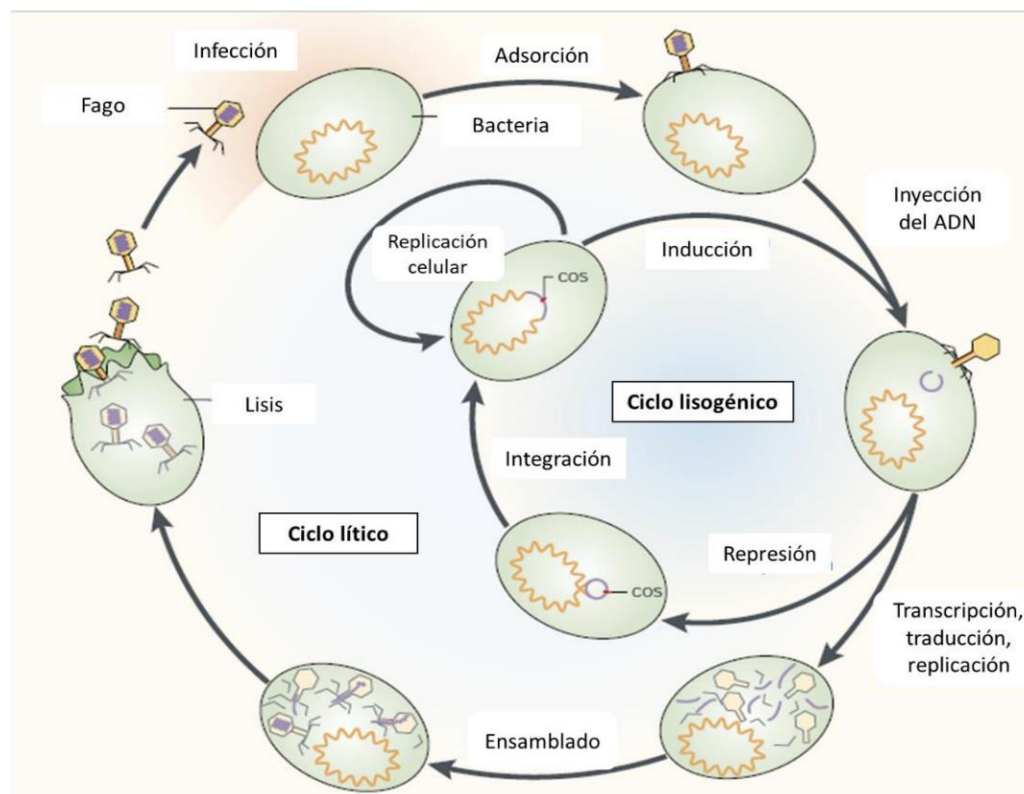


Figura 3. Ciclo replicativo del bacteriófago Lambda (λ). El fago infecta a una célula bacteriana, inyectando su ADN y en caso de entrar en estado lisogénico, puede pasar al estado lítico mediante inducción (Ríos-Sandoval, 2019).

Supervivencia de los Bacteriófagos

La persistencia de los bacteriófagos en el ambiente está relacionado con la morfología. Los fagos con cola presentan mayor estabilidad a condiciones adversas, sin mostrar diferencia sustancial en la sensibilidad entre los fagos con colas contráctiles y no contráctiles o cortas, aunque los fagos con una cápside grande (100 nm de diámetro) sobreviven mejor que los fagos con

cabeza pequeña (60 nm de diámetro) (Ackermann, 2003). Aunque ser miembro de una misma familia e incluso, una estrecha similitud, no determina las características y la resistencia de un fago a los factores ambientales (Lin *et al.*, 2010). Los bacteriófagos que residen en ambientes similares pueden presentar una gran variedad de formas morfológicas (Ackermann, 2007).

La temperatura es un papel crucial para la supervivencia de los bacteriófagos, influyendo en la adherencia, la penetración, la multiplicación y el periodo de latencia (para los fagos lisogénicos). Las temperaturas bajas evitan la penetración del material genético del fago en las células huésped, afectando la multiplicación de los fagos. Las temperaturas altas, influye en la prolongación del periodo de latencia (Tey *et al.*, 2009; Olson *et al.*, 2004). El pH del ambiente juega un papel importante en la estabilidad del fago. De manera general es más estable a pH entre 6 y 10, pero a pH menor o igual de 3, pierde su actividad, y a pH mayor de 10, también pierde actividad (Jończyk *et al.*, 2011).

Implementación de los Bacteriófagos

El uso de bacteriófagos se ha propuesto como método alternativo para el control de bacterias patógenas. Se han publicado varios informes sobre el uso exitoso de bacteriófagos en diferentes campos como la seguridad alimentaria, la agricultura, la acuicultura e incluso, la salud humana. Varias empresas están comercializando ahora bacteriófagos o productos a base de bacteriófagos con fines terapéuticos (García *et al.*, 2019). Sin embargo, esta tecnología aún está en desarrollo y hay desafíos que superar antes de que los bacteriófagos puedan usarse ampliamente para controlar las bacterias patógenas. Un gran obstáculo es, el desarrollo de métodos eficientes para la producción de bacteriófagos (García *et al.*, 2019).

Algunas empresas en Estados Unidos (EEUU) como OmniLytics Inc. (Sandy, UT, EEUU) e Intralytix Inc. (Baltimore, MD, EEUU) han desarrollado diferentes productos a base de bacteriófagos, para la aplicación como

desinfectantes en la industria alimentaria que pueden ser utilizados contra *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. En Europa, una empresa holandesa Microcos BV (Wageningen, Países Bajos), también comercializó productos a base de bacteriófagos contra *Salmonella* y *E. coli*, y además, una empresa alemana, Fink Tec (Hamm, Alemania) contra *E. coli* (Moye *et al.*, 2018). Se espera una aplicación más amplia de bacteriófagos en la cadena de valor de los alimentos, incluidas la agricultura y la acuicultura, donde un amplio espectro de diversos patógenos de plantas y peces causa pérdidas económicas significativas (Buttimer *et al.*, 2017; Doss *et al.*, 2017).

Bacteriófagos como indicador de contaminación viral en los Bivalvos

Los virus entéricos humanos se transmiten por diversas rutas incluida la transmisión fecal-oral. Los moluscos bivalvos contaminados están regularmente implicados en brotes de enfermedades virales transmitidas por los alimentos a nivel internacional. Tradicionalmente, las bacterias indicadoras, los coliformes y la *E. coli*, se han utilizado para detectar contaminación fecal en los mariscos y las aguas de cultivo. Sin embargo, estudios han establecido que son inadecuados como indicadores de contaminación por virus entéricos humanos (Hartard *et al.*, 2018; Hartard *et al.*, 2016; Gomes, 2013; Doré *et al.*, 2000). Los bacteriófagos han sido identificados como indicadores potenciales o sustitutos para los virus entéricos humanos debido a sus similitudes en morfología, comportamiento en el agua, ambientes y la resistencia a los tratamientos desinfectantes. Los colífagos somáticos (bacteriófagos que infectan *E. coli*), los colífagos de ARN (colífagos de ARNF) y los bacteriófagos de Bacteroides son los grupos más adecuados para las pruebas en aguas y mariscos (Hodgson *et al.*, 2017).

Gastroenteritis por Infección Viral

La gastroenteritis relacionada a una infección viral presenta una alta incidencia en los diagnósticos clínicos. En el mundo mantiene una prevalencia de un 30 al 40% de frecuencia en diagnóstico de cuadro de diarrea aguda o crónica. Esta recurrencia ha sido liderizada por los virus de interés para este estudio los cuales podemos mencionar: AdV grupo F, EV, RoV del grupo A, pero también otros virus que no serán estudiado en esta ocasión pero mantienen una alta relevancia en el tema como: NoV, HAV, HEV, SaV, AstV, Parvovirus y otros menos comunes como Reovirus, Coronavirus y Torovirus (Shaheen, 2018; Diez-Valcarce *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2017; Martínez-Azcona *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Kittigul *et al.*, 2015; Suffredini *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014; Rodríguez-Frias *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2008; Le Guyader *et al.*, 2008; Shieh *et al.*, 2007; Baert *et al.*, 2007; Elamri *et al.*, 2006; Fong y Lipp, 2005, Koizumi *et al.*, 2004; Beuret *et al.*, 2003; Di Pinto *et al.*, 2003; Mullendore *et al.*, 2001).

ADENOVIRUS

Generalidades

Los AdV fueron aislados por primera vez en 1953 de humanos e identificados como los agentes responsables de destruir las células epiteliales y de producir una enfermedad respiratoria febril entre reclutas militares en los años 50, donde se le denominó *adenoid degeneration agent*. En 1954, se aisló 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 (Hilleman y Werner, 1954; Rowe *et al.*, 1953). Posteriormente, fueron ubicadas en la familia Adenoviridae, que incluye seis géneros diferentes: Mastadenovirus (infectan a humanos y otros mamíferos), Aviadenovirus (infectan a aves), Atadenovirus (aislados de reptiles, aves,

marsupiales y mamíferos), Siadenovirus (aislados de reptiles y aves), Ichtadenovirus (aislados de peces), y Testadenovirus (aislados en quelonios). La familia consta de 86 especies (ICTV, 2020). Dentro del género Mastadenovirus, se encuentran los tipos de interés en este estudio.

Estructura del AdV

Los AdV son virus no envueltos de estructura icosaédrica, tienen un diámetro de 70 a 90 nm, con un peso molecular entre 175-185 KDa y una densidad de flotación de 1.33-1.34 g/cm⁻³ en cloruro de cesio (CeCl₂), y además, el virión contiene un 13% de ADN y un 87% de proteína (Green y Piña, 1963). La cápside icosaédrica consta de 240 capsómeros sin vértice (hexones), de 8 a 10 nm de diámetro, y 12 capsómeros de vértice (bases de pentón), cada uno con una fibra que sobresale de la superficie del virión que le da la morfología característica. Cada pentón consiste en la base y la fibra con una protuberancia terminal que es la que interactúa con los receptores celulares (Pina, 2001). La longitud de las fibras examinadas hasta ahora oscilan entre 9 y 77.5 nm. Los AdV humanos 40 y 41 tienen fibras de dos longitudes diferentes que ocurren alternativamente en los vértices (ICTV, 2020).

El exón es un trímero de la proteína II ensamblado en una estructura tipo hoja llamado "grupo nueve", el cual forma las 20 caras del icosaedro. Consta de dos partes distintas: una parte superior triangular con tres torres y una pseudohexagonal con una cavidad central. Las bases de los exones están apretadamente empaquetadas, formando una capa de proteína que protege los componentes internos (Figura 4).

Cada una de las 12 bases de pentón está formada por la interacción de cinco polipéptidos (III) y están estrechamente asociadas con una o dos fibras (solo en Aviadenovirus), cada una de las cuales consta de tres polipéptidos (IV) que interactúan para formar un eje de longitud. Los 12 pentones (III y IV) están menos estrechamente asociados con los hexones vecinos (peripentonaes). El polipéptido VIII se ha asignado a la superficie interna de

la cápside del exón. Otros polipéptidos (monómeros de IIIa, trímeros de IX y multímeros de VI), están en contacto con hexones, completando una capa de proteína continua. Los polipéptidos VI y VIII, parecen unir la cápside al núcleo del virus. El núcleo consiste en el genoma de ADN, un complejo con cuatro polipéptidos (V, VII, X, también conocido como μ o μ , y proteína terminal). La proteína V, se encuentra únicamente en los Mastadenovirus (Wong, 2013; Wu, 2003).

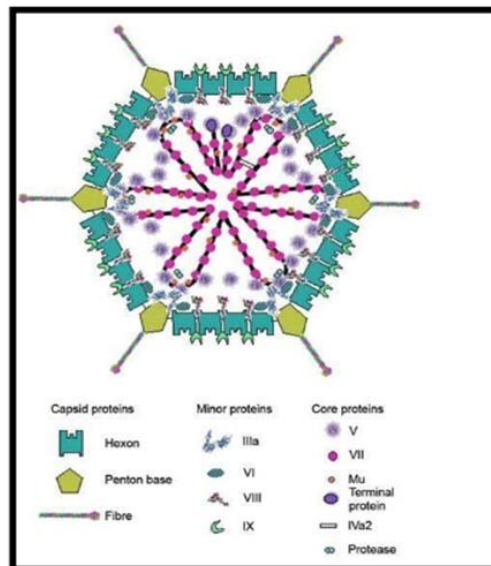


Figura 4. Estructura del AdV. Diagrama esquemático del AdV Humano (AdVH) el cual muestra las trece proteínas estructurales del virión (Bolon, 2016).

Tabla 1. Proteínas integrantes de la cápside de los AdV (Pina, 2001).

Nombre	Localización	Función
II	Monómero del hexon	Estructural
III	Pentón base	Penetración
IIIa	Asociada al pentón base	Penetración
IV	Fibra	Unión al receptor, hemoaglutinación
V	Core: asociada al ADN y al pentón base	Empaquetamiento del ADN (similar a las histonas)
VI	Polipéptidos minoritarios del hexon	Estabilización/ensamblaje de la partícula
VII	Core: asociada al ADN y al pentón base	Similar a las histonas
VIII	Polipéptido minoritario del hexon	Estabilización/ensamblaje de la partícula
IX	Polipéptido minoritario del exón	Estabilización/ensamblaje de la partícula
TP	Proteína terminal unida al ADN	Replicación del ADN

Los AdV presentan un genoma de una sola molécula lineal de ADN de doble cadena (ADNs), de aproximadamente de 36-38 Kb y contiene una repetición terminal invertida (ITR). Una proteína terminal codificada por el virus, TP (de 55 KDa) que está unida covalentemente al extremo 5' de cada cadena de ADN (Rekosh *et al.*, 1977). El genoma también presenta repeticiones invertidas redundantes de 103-165 pb en los extremos (Shinagawa *et al.*, 1987). Codifica 10 polipéptidos estructurales diferentes y 35 proteínas no estructurales (PNE) (Pettersson, 1984). Los dos extremos de la molécula pueden funcionar como origen de replicación. Las dos cadenas del ADN son transcritas. El contenido de G +C del ADN varía entre 33.6% y 66.9%. La

parte central del genoma está bien conservada en toda la familia, mientras que los dos extremos muestran grandes variaciones en longitud y contenido genético (Figura 5).

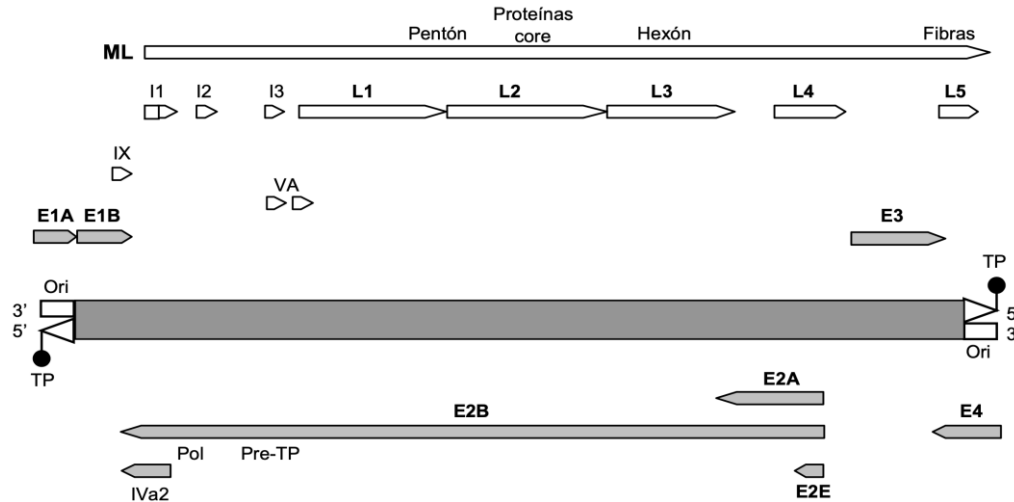


Figura 5. Organización del genoma de AdV (Pina, 2001).

➡ Dirección de la transcripción de las diferentes unidades

Ori. Origen de la replicación

TP. Proteína terminal

Pol. Polimerasa

E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4. Genes tempranos

L1, L2, L3, L4, I1, I2, I3, IX, genes tardíos

ML. Genes tardíos mayoritarios.

Sintomatología clínica de la Infección por AdV

Los AdV son patógenos ubicuos que pueden causar una amplia gama de enfermedades. Según el tipo de AdV, muestran varios tropismos que se correlacionan con las manifestaciones clínicas según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2020):

- Síntomas de resfriado común o similares a los de la gripe.
- Fiebre.
- Dolor de garganta.

- Bronquitis aguda (inflamación de las vías respiratorias de los pulmones, a veces llamada "resfriado del pecho").
- Neumonía (infección de los pulmones).
- Ojo rosado (conjuntivitis).
- Gastroenteritis aguda (inflamación del estómago o los intestinos que causa diarrea, vómitos, náuseas y dolor de estómago).
- Los síntomas menos comunes de la infección por AdV incluyen: inflamación o infección de la vejiga y enfermedad neurológica (afecciones que afectan el cerebro y la médula espinal).

Los AdV pueden causar enfermedades de leves a graves, aunque las enfermedades graves son menos comunes. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados o enfermedades respiratorias o cardíacas existentes, tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad grave a causa de una infección por AdV.

Supervivencia de los AdV

Los virus son estables en almacenamiento en estado congelado. Son estables frente a los ácidos suaves como la bilis y enzimas proteolíticas, lo que permite la multiplicación en el intestino humano (Allard, 1992) y no sensibles a los detergentes y a los solventes lipídicos, por la ausencia de membranas o estructuras lipídicas en su composición (Green y Piña, 1963).

Diagnóstico

Para el diagnóstico de las infecciones por AdV existen numerosas técnicas. Estas técnicas de diagnóstico se agrupan en aquellas dirigidas a la observación del patógeno, a la detección de sus antígenos o su genoma, al aislamiento por cultivo, o el estudio serológico:

1. Observación microscópica se da mediante:

- Microscopía electrónica: se aplica al diagnóstico de la gastroenteritis por AdV en muestras de heces. Es difícil el acceso al instrumento y no permite distinguir directamente entre los distintos serotipos de AdV.

2. Detección por antígenos:

- La aglutinación con partículas de látex: se aplica para el diagnóstico de las gastroenteritis por los AdV 40 y 41. Esta técnica puede arrojar falsos positivos, por reacción cruzada con otros tipos de AdV que pueden estar presentes en las heces del paciente en el momento.
- El ensayo inmunoenzimático (EIA): esta técnica puede estar dirigida contra un antígeno común del hexon, lo que permite la detección de cualquier serotipo de AdV. La especificidad es del 90-95% y su sensibilidad es de un 70-90% comparada a las técnicas más complejas y completas de aislamiento en cultivo celular.

3. Detección y amplificación genómica:

- Esta técnica ha demostrado superioridad en comparación a las técnicas de detección por antígenos y similar a las de un completo sistema de aislamiento convencional (Raty *et al.*, 1999).

4. Aislamiento por cultivo:

- Es considerada la prueba con alta sensibilidad para determinar la presencia de AdV en una determinada muestra debido a su gran especificidad. Pero puede arrojar falsos positivos dependiendo del tipo de muestra, calidad en el cultivo celular, tiempo de incubación. Adicionalmente, se recomienda un mayor número de muestras (réplicas) para aumentar el éxito y facilitar la interpretación clínica de los resultados. Se utilizan las líneas continuas derivadas de carcinomas epiteliales como (Li *et al.*, 1991; Savón *et al.*, 2003):
- Células NCI-H292 (ATCC CRL-1848), se obtuvieron en 1980 a partir de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón.
- Células HeLa (ATCC CC1-2), se obtuvieron en 1951 a partir de un carcinoma de cérvix humano.

- Células Hep-2 (ATCC CCL-23), se obtuvieron en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano.
- Células Vero (ATCC-CCL-81), se obtuvieron en 1952 a partir de un riñón de mono verde africano adulto normal.
- Células MDCK-L (ATCC-CCL-34), cepa de la línea celular MDCK, se obtuvieron en 1958 a partir de un riñón de Cocker Spaniel adulto aparentemente normal.
- Célula MRC-5, línea celular de MRC-5, se obtuvieron a partir del pulmón normal de un feto masculino de 14 semanas en 1966.
- Otras líneas celulares utilizadas son KB, riñón de embrión humano (alta dificultad para disponer de manera continua de este tipo de células), y la línea Graham 293 que es una línea modificada para los serotipos no cultivables, como los 40 y 41.

5. Pruebas serológicas:

- Para el diagnóstico de AdV se utilizan las técnicas de serología donde se aprovechan las propiedades biológicas del virión. Se utiliza la reacción de inhibición de hemaglutinación, con base en la capacidad hemaglutinante que tienen las glicoproteínas terminales de las fibras. Los antígenos comunes del exón son la base de la reacción de fijación de complemento. Se usa con frecuencia la técnica de la reacción de ensayo inmunoenzimático.

Epidemiología de los brotes producidos por AdV

La infección por AdV no presenta una marcada estacionalidad, pero es más común en inicio de la primavera o el invierno (Wang *et al.*, 2021). La infección puede ocurrir a partir de fuentes exógenas (sábanas, almohadas, casilleros, armas) y presenta un periodo de incubación de 2 a 14 días (Lynch y Kajon, 2016). Existe mayor susceptibilidad en niños de 6 meses a dos años de edad, pero puede ocurrir en niños de 5 a 9 años. Aunque también, infecta a los reclutas militares en los EEUU y otros países causando brotes que provocan

neumonía, enfermedades respiratorias agudas en estas personas, brotes diarreicos y conjuntivitis (Doerfler, 1996).

En la década de los 70, se observó la persistencia de la infección por AdV y se realizó un significativo avance en la comprensión de la estructura de este virus, su ciclo celular y el mecanismo de replicación (Winnacker, 1978). La década de los 80, se destaca por el desarrollo de la biología molecular, facilitando la comprensión de la expresión del gen y la estructura de los componentes del virus (Berkner, 1988, citado por Mennechet *et al.*, 2019). Además, en los años 80, se explora la seroprevalencia de otros tipos de AdVH. Los datos epidemiológicos sugirieron que algunos tipos de AdVH son comunes en todos los grupos de edad y poblaciones, mientras que otros tipos infectan más tarde en la vida. También, aproximadamente la mitad de las infecciones por AdVH eran asintomáticas, lo que significa que los médicos no detectaban infecciones por AdVH no patógenos. Por lo tanto, los estudios epidemiológicos sobre los AdVH generalmente se centraron en los tipos 1 a 8 y el tipo B21, que fueron los más frecuentemente asociados con la enfermedad sintomática (Mennechet *et al.*, 2019).

En 1983, Schmitz y col., abordaron la epidemiología de 31 tipos de AdVH, basándose en aproximadamente 25000 informes de la OMS entre 1967 y 1976. Encontraron una frecuencia absoluta de AdVH-C2, C1, B7, B3, C5, C6, E4 y D8 en orden decreciente (con una gran brecha entre AdVH-C5 y C6). El hemisferio sur mostró una mayor incidencia de AdVH-E4 y la especie B (sin AdVH-B3 y B7), y una menor incidencia de AdVH-C6, mientras que rara vez se encontraron AdVH-D8, D13, D19 y la especie A. Para la especie B, se encontraron muchas diferencias entre países y edades, principalmente con respecto a AdVH-B3 y B7 (Schmitz *et al.*, 1983).

Para finales de los 70 e inicio de los 80, fueron observados por microscopía electrónica en muestras de heces de niños con diarrea, se encontraron AdVH-F40 y F41, por lo que se relacionaron con infecciones entéricas (Uhnnoo *et al.*, 1984a). Además, se observó la diferencia genómica de Adv-

F40 y F41 en comparación con los 39 tipos descritos anteriormente, y eran resistentes a numerosos intentos de crecimiento en sistema de cultivo en células. Los AdVH-F40 y F41 no se pudieron distinguir entre sí mediante las pruebas clásicas de inhibición de la hemaglutinación, lo que indica una estrecha relación antigénica. Es de destacar que AdVH-F40 y F41 tienen las regiones hipervariables del hexón de AdV más cortas, lo que puede desempeñar un papel en su estabilidad a pH bajo. El comienzo de la década de 1980, también estuvo marcado por el desarrollo del análisis de mapas de restricción de los genomas de AdVH, que se convirtió en una valiosa herramienta epidemiológica para estudiar la aparición geográfica y temporal de diferentes tipos de AdV. El análisis por perfil de restricción de ADN, permitió la diferenciación entre AdV-F40 y F41. Posteriormente, se usaron anticuerpos monoclonales para diferenciarlos por ensayo de neutralización (Van der Avoort *et al.*, 1989). Según los primeros estudios epidemiológicos que utilizaron ensayos de neutralización, los AdVH-F40 y F41 probablemente eran pandémicos. Los sueros de niños sanos de Hong Kong, Nueva Zelanda, Gambia, Kuwait y el Reino Unido, fueron seropositivos en un 40-50% de los casos. Sorprendentemente, un total de 16 muestras analizadas provenientes de Guatemala fueron negativas (Kidd, 1984; Uhnoo *et al.*, 1984b). Un estudio realizado entre niños en Tailandia, demostró una prevalencia relativamente baja de AdVH-F40 y F41 (2%), lo que sugiere que, entre el espectro de etiologías diarreicas, pueden ser proporcionalmente menos frecuentes en un clima tropical que en países con climas templados (Herrmann *et al.*, 1988). Las infecciones por AdV en Chile, se presentan todo el año a diferencia de otros virus. Es la segunda causa de infección respiratoria aguda grave (IRAG) que requiere hospitalización representando un 3 a 5% de los ingresos hospitalarios por IRAG. Los serotipos 3, 7 y 21 son los que principalmente se asocian con este tipo de infecciones, y, en niños hospitalizados chilenos, predominan los serotipos 7, 2 y 1 (Salgado, 2005).

Los diferentes serotipos a nivel mundial muestran los diferentes tropismos tisulares y manifestaciones clínicas de infección. Podemos mencionar algunos como:

Serotipo 1 y 2: de la especie C, causan infección respiratoria febril (FRI) aguda en todo el mundo, pero son menos virulentos que AdV-7 (Kajon *et al.*, 1996; Kajon y Wadell, 1992). Francia, en el 2012, presentó un brote nosocomial de neumonía grave en pacientes inmunocompetentes debido a AdV-1 (Cassir *et al.*, 2014). En el 2004-2006, en los EEUU, AdV-1 y -2 representaron entre 17.6 y 24.3% de los aislamientos respiratorios clínicos de AdV entre civiles (niños o adultos), respectivamente, pero solo el 0.4% entre los reclutas militares (Gray *et al.*, 2007).

Serotipo 3: produce infecciones en niños y adultos, representó el 13% de los aislamientos respiratorios de AdV notificados a la OMS entre 1967 y 1976 (Schmitz *et al.*, 1983) y sigue siendo causa de infecciones endémicas y epidémicas (Cooper *et al.*, 2000). La prevalencia de AdV-3 en otros sitios es variable: es decir, Toronto, Canadá (2007-2008) es de 46.0% (Yeung *et al.*, 2009); Corea (1991-2007) es de 37.0% (Lee *et al.*, 2010). En Taiwán, AdV-3 fue el serotipo predominante entre 1981–1989 con 68.0% y entre 1990–1998 con 44.0%, pero disminuyó al 2% de los aislamientos respiratorios en 2001 (reemplazado en gran parte por AdV-4 y -7) (Lin *et al.*, 2004). Durante un brote de infecciones respiratorias por AdV en niños entre noviembre de 2004 y febrero de 2005 en Taiwán, el AdV-3 estuvo implicado en el 87.5% de los casos (Chang *et al.*, 2008). El AdV-3 puede causar neumonías fatales en niños inmunocompetentes y adultos (Rebelo-de-Andrade *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003).

Serotipo 4: ha sido disminuido drásticamente desde el 2011 por la reintroducción de la vacuna entre los reclutas en entrenamiento (Kajon *et al.*, 2010), donde se reportó un brote de 1999 a 2004 con una prevalencia del 95.0% entre los reclutas militares de los EEUU (Russell *et al.*, 2006). En Taiwán, el AdV-4 representó el 29.0% de los aislamientos respiratorios

pediátricos entre 1981 y 2001, y se convirtió en el serotipo predominante (52.0%) en 2001 (Lee *et al.*, 2010). Para el 2007–2008 representó el 1.0% de las infección del tracto respiratorio en Toronto, Canadá (Yeung *et al.*, 2009).

Serotipo 7: es el principal serotipo detectado en asociación con enfermedades a nivel mundial (Lee *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2005; Erdman *et al.*, 2002). Las infecciones por el AdV-7 se manifiestan como FRI, fiebre faringoconjuntival, bronquitis, bronquiolitis necrosante o neumonía (Erdman *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2002; Kajon *et al.*, 1996). El AdV-7 parece ser más virulento que otros serotipos (Yamamoto *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2001; Yamadera *et al.*, 1998; Kajon *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1973). Pueden ocurrir neumonías fatales en niños inmunocompetentes (Mitchell *et al.*, 2000; Kajon *et al.*, 1996) y adultos (Cui *et al.*, 2015). La prevalencia de AdV-7 varía según las regiones geográficas y el tiempo, y depende del tipo de genoma de la cepa, la inmunidad colectiva en la región y los entornos epidemiológicos (Gray *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2000). En los EEUU, entre 2004 y 2006, el AdV-7 representó solo 5/581 (0.9%) de los aislamientos respiratorios clínicos de AdV en instalaciones militares y 48/1653 (2.9%) aislamientos en entornos civiles (Gray *et al.*, 2007). En un estudio de 165 ITR por AdV en niños de Argentina y Uruguay, el AdV-7 representó el 62.2% de los aislamientos y fue responsable de 17 de 18 muertes (Kajon *et al.*, 1996).

Serotipo 21: En 1984 y 1985, se publicaron brotes de infecciones por AdV-21 en niños en los Países Bajos y Alemania (Van der Avoort *et al.*, 1986). El AdV-21 se ha asociado con faringitis y conjuntivitis (Larsen *et al.*, 1986) y en FRI, pero es poco común. El AdV-21 puede ser menos transmisible que otros serotipos de AdV (Shult *et al.*, 1991). Sin embargo, una cepa altamente virulenta de AdV-21 se asoció con casos de neumonía grave en Alemania (Hage *et al.*, 2014), y manifestaciones neurológicas (Ooi *et al.*, 2003) y cardíacas en Malasia (Cardosa *et al.*, 1999). Se encontró que cepas

similares circulaban en los EEUU durante las últimas 3 décadas sin asociación aparente con enfermedad grave entre los adultos jóvenes infectados (Kajon *et al.*, 2015).

Serotipo 31: puede causar gastroenteritis en niños sanos y se ha asociado con infecciones graves (Leruez-Ville *et al.*, 2006; Kampmann *et al.*, 2005; Bordigoni *et al.*, 2001). Se describió la transmisión nosocomial (siete casos) en una unidad pediátrica de trasplante de células madres (Leruez-Ville *et al.*, 2006).

Serotipo 40 y 41 (Grupo F): suele causar gastroenteritis y enfermedades diarreicas en los niños (Gonalves *et al.*, 2011; Cunliffe *et al.*, 2010; Filho *et al.*, 2007; Madisch *et al.*, 2006). Pueden causar las muertes en bebés como resultado de la deshidratación (Filho *et al.*, 2007; Madisch *et al.*, 2006). En huéspedes inmunocomprometidos, puede ocurrir una diseminación fatal (Mattner *et al.*, 2008; Slatter *et al.*, 2005). Se han citado epidemias en escuelas (Gonalves *et al.*, 2011) y hospitales (Mattner *et al.*, 2008). La transmisión nosocomial puede ocurrir debido a los altos niveles de AdV en las heces (Lynch y Kajon, 2016a).

En Paraguay, del 2010–2013, se detectó infección por AdV en niños menores de 5 años, hospitalizados por infección aguda baja. Se demostró la circulación de tres especies B, C y D, al menos con tres genotipos distintos (D49, D9 y D15) (Barrios *et al.*, 2016). En el 2021, en el Hospital Infantil de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zhejiang, se identificó que B3 y B7 fueron los tipos detectados más predominantes y ocurrieron comúnmente en diferentes grupos de gravedad mientras que, AdVH-B55 se detectó solo en el grupo grave (Wang *et al.*, 2021).

Desde octubre del 2021 e inicio del 2022, se inició una alarma en los EEUU, Europa, Asia y Centroamérica (incluyendo Panamá), donde se reportaron casos de hepatitis aguda atípica con manifestaciones de dolor abdominal, vomito, diarrea, ictericia y niveles muy altos de enzimas hepáticas que afectaron a niños con una edad media entre 3 y 4 años. Se realizaron

diferentes pruebas de laboratorio, dando como resultado la presencia de AdV-F41, donde los agentes ambientales y tóxicos, y las toxinas transmitidas por los alimentos, jugaron un papel importante, como posible ruta de transmisión (Baker *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022).

Mecanismo de transmisión

Los AdV en su mayoría, se transmiten de una persona infectada a otra a través de la reactivación del virus proveniente de fomites y por la exposición a personas infectadas a través de inhalación de gotitas de aerosol, inoculación conjuntival o propagación fecal-oral.

Prevención

Para protegerse a sí mismo y a otros de infecciones por AdV, la CDC (2020), recomienda seguir los siguientes pasos:

- Lavarse las manos con frecuencia con agua y jabón durante al menos 20 segundos.
- Evitar tocarse los ojos, la nariz o la boca con las manos sin lavar.
- Evitar el contacto cercano con personas que están enfermas.

Si presenta la infección por algún tipo de AdV, el CDC, recomienda:

- Quédese en casa cuando esté enfermo.
- Tosa y estornude en pañuelos desechables o en la parte superior de la manga de su camisa, no en las manos.
- Evitar en su totalidad compartir los utensilios para comer con otras personas.
- Abstenerse de besar a otros.
- Lavarse las manos con frecuencia con agua y jabón al menos 20s, especialmente después de ir al baño y en los entornos de cuidados infantiles y centros de atención médica.
- Mantener los niveles adecuados de cloro en las piscinas para la prevención de brotes de conjuntivitis por AdV.

Actualmente, la vacuna contra el AdV es solo para personal militar de los EEUU. Por lo tanto, para el público general no existe una vacuna contra este grupo de virus. La vacuna es de virus vivos y sirve para los tipos de AdV 4 y 7. Es una vacuna disponible de dos tabletas, que se toman por vía oral al mismo tiempo. Los comprimidos deben administrarse enteros, no masticados ni triturados. Esta vacuna se puede administrar al mismo tiempo que otras vacunas (CDC, 2020; McNeil *et al.*, 2019).

ENTEROVIRUS

Generalidades

Los EV pertenecen a la familia Picornaviridae, presentan una cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura, que rodea un núcleo de ARN de cadena simple (ARNss), de polaridad positiva, por lo que se replica utilizando su propio ARN mensajero (Sánchez y Martí, 2019). Los virus que pertenecen a esta familia pueden causar un amplio espectro de enfermedades en humanos, animales y plantas, tales como el resfriado común causada por Rinovirus, la enfermedad de mano-pie-boca y enfermedades muy graves como la poliomielitis (Stock, 2014a; Stock, 2014b; Teng *et al.*, 2013). Esta familia está conformada por 68 géneros y 158 especies (Zell *et al.*, 2017). Para interés de esta tesis nos enfocaremos en el género Enterovirus.

Estructura del EV

La familia Picornaviridae presenta estructuras cristalinas disponibles que tienen un diámetro entre 30 a 32 nm. La composición de la cápside está basada en 60 unidades idénticas conocidas como protómeros, que el total es 80-97 KDa, dos regiones no codificantes reguladoras, cuatro proteínas estructurales llamadas 1A, 1B, 1C y 1D (denominadas comúnmente como VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente), las cuales se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una

pequeña proteína VPg. Las proteínas 1B, 1C y 1D, de 24 a 41 kDa, son de superficie, mientras que 1A es interna, con un peso aproximado de 5.5 a 13.5 kDa. Sin embargo, muchos picornavirus tienen tres proteínas de la cápside ya que 1AB (VP0) permanece sin escindir (Sánchez y Martí, 2019; Zell *et al.*, 2017).

Las proteínas 1B, 1C, 1D y la 1AB no escindida poseen cada una, una estructura central que comprende un emparedado β -sandwich de ocho hebras. Estos barriles se agrupan en la cápside con simetría icosaédrica T=1 (pseudo T=3). Estas características estructurales son compartidas por todos los miembros del orden *Picornavirales* con estructuras atómicas resueltas. Los miembros de diferentes géneros difieren en los bucles externos que interconectan las hebras β . Estos bucles dan cuenta de las diferencias en el relieve de la superficie de los miembros de cada género y en el grosor de la pared de la cápside. El ensamblaje se produce a través de intermediarios pentaméricos (pentámero = cinco protómeros). Las proteínas dentro de cada pentámero se mantienen unidas por una red interna formada a partir de los extremos N de los tres CP principales, y los extremos C se encuentran en la superficie exterior de la cápside. En los miembros de géneros en los que 1AB se escinde en el virión completo, las cápsides vacías, que son producidas por algunos picornavirus, son muy similares a los viriones, excepto que 1A y 1B normalmente se reemplazan por el precursor no escindido, 1AB (Zell *et al.*, 2017) (Figura 6).

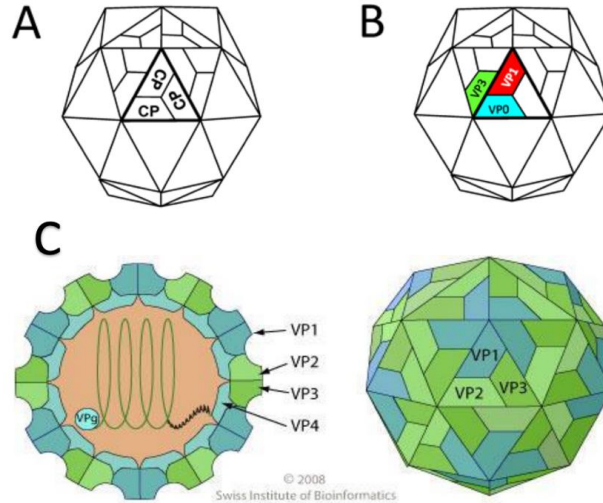


Figura 6. A) Esquema de la cápside icosaédrica $T=3$ (pequeño dodecaedro estrellado). Cada una de las 60 facetas comprende tres protómeros (protómero = una copia de la proteína CP de la cápside) y coincide con la unidad asimétrica cristalográfica (líneas gruesas). **B)** Esquema de la cápside icosaédrica $T=1$ pseudo $T=3$. El protómero de picornavirus (que comprende una copia de cada una de las proteínas de la cápside VP1, VP0, VP3) y las facetas de la cápside $T=3$ son distintas. De hecho, tres protómeros constituyen cada una de las 20 facetas del icosaedro (así $T=1$). Donde se escinde VP0, la cuarta proteína de la cápside (VP4) se ubica sobre la superficie interna del vértice pentamérico del icosaedro (Zell *et al.*, 2017). **C)** Estructura de la cápside de EV. Las proteínas estructurales VP1-3 se encuentran en la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en la cara interna. En el interior se encuentra un ARN+ monocatenario unido a una proteína viral (VPg) (Hernández y García, 2014).

El genoma de EV se compone de una sola cadena de ARN de polaridad positiva (RNAss+) con 7100–7450 nucleótidos, de manera que son virus infecciosos, ya que actúan directamente como ARNm, replicándose en el citoplasma de la célula infectada de forma lítica (Sánchez y Martí, 2019). Muchos genomas de EV albergan un marco de lectura abierto hacia arriba (uORF) que codifica un polipéptido adicional de 67 aa llamado UP para EV-7 y otros EV (Lulla *et al.*, 2019), con un ORF presente en todos los genomas del género EV que codifica una sola proteína. La traducción de este ORF está dirigida por un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) ubicado en

el extremo 5'UTR (Schmid y Wimmer, 1994). El extremo 5' carece de un CAP (7-metil guanosina), sin embargo, posee una proteína de unos 20 aminoácidos, la proteína VPg, unida al genoma viral, que enlaza covalentemente al extremo 5' del ARN y la cola poli-A ubicada en el extremo 3' codificada genéticamente (Voevodin y Marx, 2010).

Actividades co- y postraduccionales realizadas por las proteasas virales, convierten la poliproteína en el conjunto de proteínas maduras necesarias para mantener el ciclo replicativo y la estabilización del virión (Rueckert y Wimmer, 1984). La región codificante se divide en tres partes, P1, P2 y P3. P1 codifica para los cuatro componentes estructurales de la partícula viral VP1, VP2, VP3 y VP4 encontrándose continuos al extremo 5' o a VPg. P2 y P3 codifican las siete proteínas no estructurales relacionadas con la replicación (Neubauer *et al.*, 2009). En P2, se encuentran los genes 2A, 2B y 2C; 2A que codifican para las proteasas P1 y P2, y el resto de los genes codifican para proteínas reguladoras de la replicación viral. P3, contiene cuatro genes, donde varias proteólisis dan como productos las proteínas finales: la ARN polimerasa – ARN dependiente, codificada por el gen 3D, la proteína VPg codificada por el gen 3B y la proteasa 3C^{pro} originada a partir de 3C, que corta P2 y P3 (Voevodin y Marx, 2009) (Figura 7).

viriones maduros. Finalmente, los viriones maduros salen de la célula huésped mediante la liberación no lítica de vesículas extracelulares o mediante la lisis celular en una etapa tardía de la infección (Baggen *et al.*, 2018) (Figura 8).

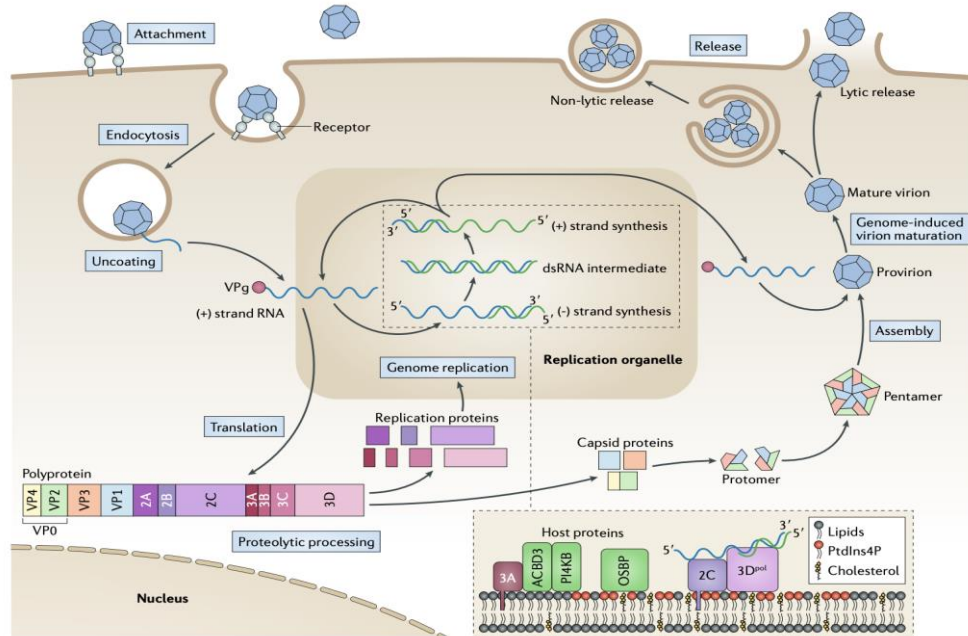


Figura 8. Ciclo de vida del EV (Baggen *et al.*, 2018).

Los EV representan la heterogeneidad de la familia a la cual pertenecen, tanto genéticamente como a nivel de fenotipo. Los virus que conforman este género se dividen en 15 especies desde Enterovirus A-L y Rinovirus A-C y aproximadamente, 330 serotipos (ICTV, 2020a) (Tabla 2). Siete son las especies que infectan a humanos como los Enterovirus A-D, los otros tres están conformados por los Rinovirus A-C, y las especies restantes afectan a simios, porcinos y bovinos (Tapparel *et al.*, 2013).

Tabla 2. Tipos de Virus y rango de huéspedes a los que infectan (Hernández y García, 2014).

Especies	Serotipos	Huéspedes
Enterovirus A	25 serotipos: 11 CV, 10 EV, SV19, SV43, SV46, BA13	Humanos, monos
Enterovirus B	61 serotipos: 7 CV, 28 E, 25 EV, SA5	Humanos, monos, cerdos
Enterovirus C	23 serotipos: 3 PV, 9 CV, 11 EV	Humanos
Enterovirus D	5 serotipos: todos EV	Humanos, monos
Enterovirus E	4 serotipos: todos EV	Cerdos
Enterovirus F	6 serotipos: todos EV	Bovinos
Enterovirus G	11 serotipos: todos EV	Cerdos
Enterovirus H	1 serotipo: EV	Monos
Enterovirus J	6 serotipos: 5 EV, SV6	Monos
Rinovirus A	80 serotipos: todos HRV-A	Humanos
Rinovirus B	32 serotipos: todos HRV-B	Humanos
Rinovirus C	54 serotipos: todos HRV-C	Humanos

CV: Cocksackievirus; EV: Enterovirus numerados; E: Echovirus; PV: Poliovirus; SV/SA Simian Enterovirus; BA: Baboon Enterovirus; HRV: Rinovirus humanos.

Los EV humanos están compuestos por: Poliovirus, Cocksackievirus A, Cocksackievirus B, Echovirus y los nuevos Enterovirus o virus numerados como los tipos 68-71 (Sánchez y Martí, 2019) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los enterovirus humanos (Sánchez y Martí, 2019).

Poliovirus	Tipo 1 - 3
Coxsackievirus A	23 tipos, A1 – A24 (el Coxsackie 23 es conocidos como Echovirus 9)
Coxsackievirus B	Tipo B1 – B6
Echovirus (Enteric Cytopathogenic Human Orphan)	31 tipos
Enterovirus tipo 68 – 71	Previamente clasificados como Echovirus o Coxsackievirus

Los Poliovirus (PV) son el agente causante de la poliomielitis, enfermedad infecto-contagiosa (principalmente en niños menores de cinco años), es asintomática en la mayoría de los casos y limitada al tracto gastrointestinal, pero en caso de diseminarse al sistema nervioso central, puede afectar las motoneuronas provocando parálisis y eventualmente la muerte (Fernández y Rodríguez, 2013).

Los Coxsackievirus (CV) son agentes causantes de síntomas leves similares a la gripe. Se eliminan sin tratamiento, aunque pueden provocar infecciones más graves. Coxsackievirus A (CV-A), ocasionan herpangina, enfermedad de mano-pie-boca y conjuntivitis hemorrágica aguda. Coxsackievirus B (CV-B), ocasionan pleurodinia, miocarditis/pericarditis y meningoencefalitis. Algunos serotipos de CV A y B causan meningitis, hepatitis y enfermedades respiratorias (Romero, 2007).

Los Echovirus (E) pertenecen a la especie EV-B. Son muy infecciosos y su principal hospedador son los niños en los que provoca un amplio rango de afecciones clínicas y además, una alta frecuencia de meningitis aséptica (Romero 2007; Trallero y Avellón, 2003).

Los nuevos EV o virus numerados: EV-D68, agente causante de neumonía ocasionando epidemias en otros países (Piralla *et al.*, 2014), EV-70 produce conjuntivitis hemorrágica aguda, EV-71 es el agente responsable de causar

enfermedades graves similares a las provocadas por poliovirus, como meningitis asépticas, disfunción cardiopulmonar aguda y parálisis flácida aguda (Pérez *et al.*, 2007), la enfermedad de mano-pie-boca y puede provocar varias enfermedades neurológicas (Nishimura y Shimizu, 2012).

Sintomatología clínica

Los síntomas pueden ir de leves a graves e incluyen dolores corporales, musculares y fiebre inespecífica parecida a una sepsis bacteriana. Otras manifestaciones clínicas más frecuentes son (Vyas, 2019; Rodríguez, 2008):

- Tracto respiratorio: goteo nasal, estornudos, tos, resfrío común, faringitis, herpangina, estomatitis, neumonía y pleurodinia.
- Tracto gastrointestinal: vómitos y diarrea, dolor abdominal y hepatitis.
- Ojo: conjuntivitis aguda hemorrágica.
- Corazón: miocardio-pericarditis.
- Piel: exantema.
- Neurológicas: meningitis aséptica, encefalitis y parálisis.

Estos cuadros clínicos pueden ser causados por diferentes EV no polio y se han visto fuertemente asociaciones entre determinados serotipos y ciertos cuadros clínicos, incluyendo los siguientes: CV-A24 y EV-71 en el síndrome mano-pie-boca; CV-A24 y EV-70 en la conjuntivitis hemorrágica aguda; EV-71 en la encefalitis y parálisis flácida semejantes a poliomiелitis; E-9 en exantema petequial y meningitis; E-30 en meningitis; CV-B1-B5 en miocardio-pericarditis y en encefalomiocarditis neonatal fulminante (Rodríguez, 2008):

Diagnóstico

Para el diagnóstico de las infecciones por EV la técnica de referencia utilizada es el cultivo en líneas celulares susceptibles y el tipo de muestra son heces o exudado faríngeo. Si se sospecha de una meningitis aséptica debe remitirse al líquido cefalorraquídeo (LCR) o plasma, cuando la infección

es aguda. También, pueden ser muestras de fluidos vesiculares, orina, exudado conjuntival y secreciones nasales. La excreción es con frecuencia intermitente y por tanto, debe recogerse más de una muestra en un intervalo de 24-48 h. Dicha excreción comienza a los pocos días de la infección y puede mantenerse semanas o incluso meses, excepto en el caso de los Echovirus, donde rara vez excede de un mes. El aislamiento a partir del exudado faríngeo es posible durante la fase aguda de la infección, especialmente en los casos con síntomas respiratorios. El periodo con el índice de aislamientos más alto se establece en los cinco días previos a la aparición de los síntomas, y continúa hasta cinco días después. Las muestras se transportan refrigeradas a 4°C y es recomendable que sean almacenadas a temperaturas inferiores a -20°C, si no se procede a la inoculación inmediata de los cultivos (CDC, 2021; Sánchez y Martí, 2019; Hernández y García, 2014).

1. Aislamiento por cultivo

Se utilizan las siguientes líneas continuas para el diagnóstico de EV como (Sánchez y Martí, 2019; Savón *et al.*, 2003):

- Células NCI-H292 (ATCC CRL-1848) aisladas en 1980 a partir de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón, permisible para EV humanos.
- Células HeLa ATCC (CC1-2) aisladas en 1951 de un carcinoma de cérvix humano, sensible para PV-1.
- Células Hep-2 ATCC (CCL-23) aisladas en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano, sensible para PV-1.
- Células Vero (ATCC-CCL-81) aisladas en 1952 a partir de un riñón de mono verde africano adulto normal, permisible para PV-3.
- Células MDCK-L (ATCC-CCL-34), cepa de la línea celular MDCK, aisladas en 1958 de un riñón de Cocker Spaniel adulto aparentemente normal, sensible para CV-B5.

- Célula MRC-5, línea celular MRC-5, aisladas de pulmón normal de un feto masculino de 14 semanas en 1966, sensible para PV-1.
- Otras líneas celulares utilizadas son WI-38 de pulmón embrionario humano, HEK riñón embrionario humano y RD de rabdomiosarcoma humano.

Para efecto de tratamiento la identificación del serotipo no tiene una utilidad clínica inmediata; la mayoría de las veces, lo importante es determinar con rapidez si se trata de un EV o no, aunque sí tiene un claro interés epidemiológico.

2. Pruebas serológicas

Las técnicas serológicas deben considerarse como un arma diagnóstica adicional. La detección de anticuerpos específicos de tipos sólo deberían realizarse si se dispone del aislamiento de un EV y es necesaria la confirmación del serotipo infectante, cuando en un cuadro clínico puedan estar implicados varios EV de un mismo grupo (ej., pleurodinia por CV-B), ante un brote epidémico causado por un serotipo determinado, y en estudios seroepidemiológicos. Se puede mencionar algunas de estas técnicas: seroneutralización, fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación pasiva (Sánchez y Martí, 2019; Harvala *et al.*, 2018).

3. Detección y amplificación genómica

La detección de genoma mediante RT-PCR aporta rapidez, aumento de sensibilidad y posibilidad de detección de todos los EV, por lo que, aunque está actualmente en evaluación, resulta muy recomendable en los laboratorios de virología (Harvala *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2017).

Epidemiología de los brotes causados por EV

La epidemiología de todos los EV humanos es muy similar. Tienen una distribución mundial. En los climas templados predominan en otoño y verano, y en los climas tropicales todo el año. La seroepidemiología de las infecciones por EV demuestra una transmisión de la infección aumentada en edades tempranas de poblaciones con bajo nivel socioeconómico. El hacinamiento y la pobre higiene aumenta la transmisión fecal oral de estos agentes. La transmisión a través del agua contaminada puede presentarse como una extensión de la vía fecal oral, en la cual, el vector es el agua en lugar de las manos o los fomites. La epidemiología clínica de estas infecciones sugiere que la transmisión respiratoria de estos virus no es tan importante como la transmisión fecal oral (Rodríguez, 2008).

Los EV presentan diversos cuadros clínicos según el tipo de EV que infecte al individuo. Como la meningitis aséptica, en los Países Bajos no se conoce con exactitud la incidencia producto de la infección por EV y para el 2002, se reporta una incidencia no exacta de 26% en recién nacidos (Verboon *et al.*, 2002), en Noruega, el 40% de los niños menores de 12 meses y el 90% de los niños menores de 2 años tenían alguna infección por EV (Witso *et al.*, 2006), en EEUU la incidencia en niños menores de 90 días varía del 3.2% en enero y de 50% en agosto y octubre (Byington *et al.*, 1999). Claramente, las infecciones por EV forman un patrón estacional y la incidencia es más alta en verano y otoño, en países de clima templado (Lee *et al.*, 2006; Byington *et al.*, 1999).

Los EV-A, compuestos por los serotipos CV-A6, CV-A10, CV-A16 y EV-A71, muchos pacientes desarrollan complicaciones del SNC causadas por EV-A71, han ocurrido esporádicamente en la región de Asia-Pacífico, incluidos Malasia, Taiwán, China continental, Vietnam y Camboya, desde fines de la década de 1990. Es una enfermedad infecciosa con graves implicaciones para la salud pública porque un brote a gran escala puede provocar muchas muertes (Kobayashi y Koike, 2021).

El EV-D68, se describe por primera vez en 1962 relacionado con un pequeño número de casos de neumonía (Messacar *et al.*, 2016). Entre 1970 y 2005, solo se detectó en 26 casos individuales en los EEUU, incluyendo un caso de parálisis en 2005 (Khetsuriani *et al.*, 2006). A fines del verano hasta principios del otoño de 2009, el EV-D68 fue el EV circulante más común, pero no se detectaron enfermedades respiratorias asociadas ni epidemias de Mielitis Flácida Aguda (por sus siglas en inglés, AFM) documentada (Abedi *et al.*, 2015). EL EV-D68, siguió circulando a bajos niveles de 2010 a 2013 y no fue hasta el otoño de 2014, cuando aumentaron las hospitalizaciones pediátricas por enfermedades del tracto respiratorio. Tal como se describe arriba, los picos en los casos de AFM continuaron en 2016 y 2018, y esto se reflejó en una mayor prevalencia del EV-D68 durante los mismos períodos de tiempo (Uprety y Graf, 2020; Uprety *et al.*, 2019; Kaye, 2018; McKay *et al.*, 2018; Messacar *et al.*, 2017).

En la población de Chipre en la última década, la especie predominante fue EV-B (209/295, 71%), seguida de la especie EV-A (77/295, 26.1%). Solo un virus pertenecía a la especie EV-D, mientras que los EV-C no se identificaron en absoluto. Los genotipos más frecuentes identificados fueron E-30 (26.1%), E-6 (14.2%) y CV-A6 (10.9%). Mientras que la frecuencia de E-30 y E-6 fue significativamente mayor en pacientes mayores de 3 años, pero se observó lo contrario para CV-A16 y EV-A71, que predominaron en niños menores de 3 años. Es importante destacar que, para el período del estudio actual, se observó un aumento significativo de los tipos de EV-A que anteriormente, que solo se observaban esporádicamente, como EV-A71 y CV-A16 (Richter *et al.*, 2019).

Los EV presenta una prevalencia en los diferentes continentes los cuales oscilan para América del Sur en 2.4%, Europa de 6.2%, presentando picos de incidencia en verano y otoño (junio-noviembre). En Brasil se reportó una prevalencia mayoritaria en verano (diciembre-marzo) (Brouwer *et al.*, 2021), donde se realizó un análisis en la distribución de los tipos de EV y se detectó

un total de 82 tipos de EV, entre los cuales 17 tipos de la especie EV-A, 47 tipos de la especie EV-B, 17 tipos de la especie EV-C y 1 tipo en la especie EV-D. De las cuatro especies detectadas, el EV-B fue el más prevalente tanto en Asia como en Europa y el EV-C fue la especie predominante en África. La proporción de EV-A fue especialmente alta en Asia, mientras que EV-D fue la segunda especie en Europa, en pacientes con los síntomas neurológicos predominan EV-B, con síntomas respiratorios a menudo informaron tipos de CV-A en EV-A, y EV-D tipo EV-D68 y CV-B1-5 en EV-B, además de presentarse con mayor prevalencia en niños (pequeños) que en adultos (Chansaenroj *et al.*, 2017; Fall *et al.*, 2016).

La poliomielitis grave ocurría en los países industrializados antes de la introducción de los programas de vacunación. El objetivo 5 de la estrategia de "Salud para todos en el año 2000" de la OMS, planteó la erradicación mundial de la poliomielitis, para lo que dicho organismo elaboró un "Plan de actuaciones para la consecución del Certificado de Erradicación de la Poliomielitis". Las actuaciones que dicho grupo considera necesarias para la consecución de dicho certificado son: a) implantar un sistema de vigilancia eficaz de la parálisis flácida aguda, b) alcanzar y mantener altas coberturas de vacunación, c) organizar un sistema de vigilancia ambiental, d) realizar un estudio seroepidemiológico que valore el estado inmunitario de la población frente al virus de la poliomielitis (Lerma Sánchez y Martí, 2019).

Mecanismo de transmisión del EV

Los EV se diseminan y se eliminan por las secreciones respiratorias y las heces, y además, se pueden presentar en la sangre y LCR de los pacientes infectados. Los EV se transmiten por contacto directo con secreciones respiratorias o heces, y fuentes ambientales contaminadas (Kaye, 2018). Los brotes ocasionados por los EV pueden aparecer de forma endémica o como epidemias enterovirales en clima templados en verano y otoño, mientras que en países tropicales, todo el año y principalmente, en niveles

socioeconómicos bajos, y en lactantes y niños (más frecuente en varones) (Kaye, 2018).

Se propaga a través de fluidos en las vías respiratorias (saliva, fluidos nasales y flema), cuando alguien estornuda o tose, al tocar un objeto que una persona enferma ha tocado previamente y luego tocar ojos, nariz o boca, o por contacto cercano como besos, abrazos o apretones de manos con una persona que tiene el virus (Vyas, 2019) y por la vía fecal-oral, aunque se da casos de transmisión por fómites o moscas, aunque la más frecuente es la vía directa, de persona a persona, existiendo gran número de portadores asintomáticos (Lerma Sánchez y Martí, 2019).

La infección transmitida por la madre durante el parto, puede causar infección neonatal generalizada grave, que puede manifestarse con hepatitis o necrosis hepática, meningoencefalitis, miocarditis o una combinación de ellas y puede ocasionar sepsis o la muerte del neonato o abortos espontáneos (Kaye, 2018).

Prevención

La infección por EV se puede prevenir siguiendo las recomendaciones otorgadas por CDC, los cuales son los siguientes (CDC, 2020):

- Lávese las manos con frecuencia con agua y jabón durante al menos 20 segundos.
- Evite tocarse los ojos, la nariz y la boca con las manos sin lavar.
- Evite el contacto cercano, como besar, abrazar y compartir tazas o utensilios para comer, con personas enfermas.
- Cúbrase al toser y estornudar con un pañuelo desechable o con la manga de la camisa, no con las manos.
- Limpie y desinfecte las superficies que se tocan con frecuencia, como juguetes, picaportes y teléfonos celulares, especialmente si alguien está enfermo.

- Quédese en casa cuando esté enfermo y mantenga a los niños enfermos fuera de la escuela.

Estas medidas previamente mencionadas, están basada por la nula aprobación de medicamentos antivirales para el tratamiento de las infecciones producidas por los picornavirus, limitándose a la atención de apoyo o al tratamiento que es la administración de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), pero la tasa de éxito de esta modalidad de tratamiento es variable y posiblemente, depende de la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos en la preparación (Piralla *et al.*, 2015; Rhoden *et al.*, 2015). Estudios realizados por Abzug *et al.* (2016), evalúan el uso de Pleconaril en un ensayo controlado aleatorizado en recién nacidos con sepsis por EV, demostrando un tiempo más corto para el cultivo y la negatividad de la PCR, y una mayor supervivencia entre los receptores de Pleconaril. Todavía se necesita un mayor desarrollo y evaluación del Pleconaril en niños con infección por EV (Messacar *et al.*, 2016a).

En cuanto a las vacunas para los EV, se debe resaltar el desarrollo de la vacuna para PV, siendo parte fundamental para la historia de la microbiología y la génesis de las vacunas. En la actualidad, se utilizan dos tipos de vacunas antipoliomielítica: la vacuna de virus vivos atenuados (vacuna oral), que combina los tres tipos de PV-1, 2 y 3, desarrollada por Sabin en 1954; y de virus inactivados en formalina, en una suspensión acuosa de las cepas de PV-1, 2 y 3, desarrollada por Salk en 1954 (vacuna de virus muertos intramuscular) (Rodríguez, 2008).

ROTAVIRUS

Generalidades

El RoV fue reportado por primera vez en brotes entre 1941-1943 como en epidemias, produciendo gastroenteritis en niños, siendo un patógeno no identificado hasta ese momento y fue relacionado con aquellos que producía

diarreas en terneros y lo denominaron Agente de Baltimore (Light y Hodes, 1943). Las muestras se conservaron liofilizadas hasta 1977, momento en que se pusieron a analizarlas con la técnica de tinción negativa en microscopía electrónica, donde se reveló la morfología típica de RoV, sin éxito para determinar el origen del virus entre humano o ternero. En 1973, un virus similar se reportó en Australia, aislado de biopsias intestinales de niños que presentaron gastroenteritis analizados por microscopía electrónica (Bishop *et al.*, 1973). Simultáneamente, en Inglaterra detectaron el virus en extractos fecales con la utilización de la microscopía electrónica y quien denomina al agente como RoV por la forma de rueda (en latín Rota, significa rueda), que se apreció claramente en la microfotografía electrónica (Flewett *et al.*, 1973) (Figura 9A).

En 1978, el Comité Internacional de Taxonomía Viral estableció el género Rotavirus. El RoV es miembro de la familia Reoviridae, los cuales presentan un genoma de ARN de doble cadena (ARNds) lineal. Esta familia se divide en dos subfamilias: Spinareovirinae y Sedoreovirinae, que incluyen, respectivamente, nueve y seis géneros. El género Rotavirus está incluido en la subfamilia Sedoreovirinae, conformado por nueve especies RoV A-J, los cuales solo infectan a vertebrados y se transmiten por vía fecal-oral, donde los RoV A-C, han sido encontrados en humanos y animales, y los RoV D-G solo infectan a los animales (Matthijnssens *et al.*, 2021; Clark *et al.*, 1996).

Estructura del RoV

Los RoV son virus no envueltos de estructura icosaédrica, miden aproximadamente 100 nm de diámetro y no presentan envoltura lipídica. Está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, compuesto por 11 segmentos de ARN bicatenario que no es infeccioso en ausencia de las proteínas virales, y que codifica seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6) (Estes y Cohen, 1989). Las proteínas no estructurales están

involucradas en la replicación del genoma viral y en antagonizar la respuesta inmune innata, mientras que las proteínas estructurales determinan la especificidad del huésped y la entrada a la célula (López y Arias, 2020). La partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para la producción de sus ARN mensajero (ARNm) y la replicación viral se lleva exclusivamente en el citoplasma de las células (enterocitos). Este virus presenta tres tipos de partículas de distintos tamaños: partícula de triple, doble y simple cubierta proteica en cuyo interior se halla el genoma viral (Tamayo *et al.*, 2007).

En su estructura se describen tres capas (López y Arias, 2020; Tamayo *et al.*, 2007; Estes y Cohen, 1989) (Figura 9B):

- **La capa interna:** En su estructura presenta 60 dímeros, dentro de las cuales se encuentra la VP2 (102 KDa), que encierra 11 segmentos de ARN de doble cadena y dos proteínas minoritarias, VP1 (ARN polimerasa del virus) y VP3 (la guanilil-metil transferasa). En conjunto forman el núcleo viral.
- **La capa intermedia:** constituida por 260 trímeros de VP6 (41 KDa) ordenado como un enrejado, hace contacto con VP2 por su lado interno y con las proteínas externas VP4 y VP7.
- **La capa externa:** conformada por la VP7 (37 kDa) conformada por 780 copias de glicoproteína y 60 picos o ganchos formados por dímeros de proteínas virales de adherencia VP4 (87 kDa). Esta proteína se corta con tripsina, lo que da como resultado dos polipéptidos de menor peso molecular, VP5 y VP8, que forman parte de la partícula infecciosa.

Las proteínas VP4 y VP7 contienen determinantes antigénicos que inducen la producción de experimentos neutralizantes, los cuales han sido mapeados a través de la caracterización de virus mutantes resistentes a la neutralización y la obtención de la estructura cristalográfica de estas proteínas. Esta información, aunada a la secuenciación del genoma del virus

y en particular de los genes que codifican por VP4 y VP7, permite monitorear cambios antigénicos en los virus circulantes que pueden influir en la efectividad de las vacunas empleadas. En su superficie se hallan 132 canales acuosos que unen el medio externo viral con el core para la transcripción de partículas, realizada por la ARN polimerasa, que puede ser expulsada por estos canales (López y Arias, 2020).

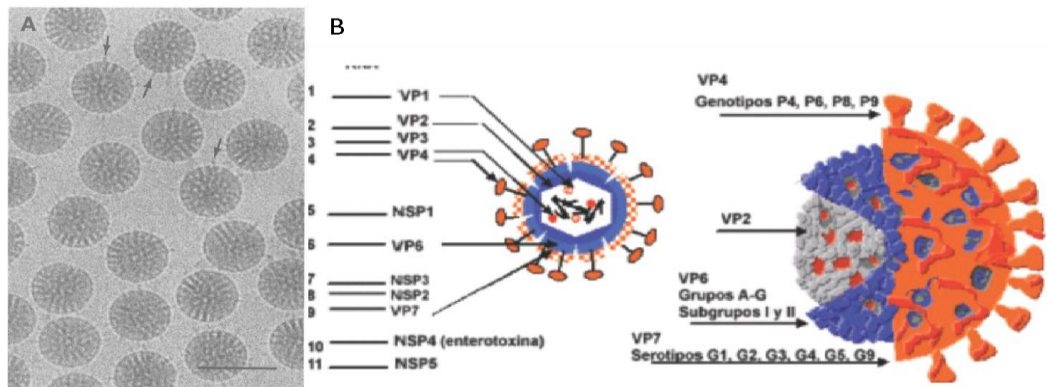


Figura 9. A). Microfotografía electrónica. B) Estructura del RoV (Tamayo *et al.*, 2007; Estes y Cohen, 1989).

Los RoV se clasifican en las especificidades antigénicas de la proteína VP6, los cuales los podemos agrupar en tres importantes secciones: el grupo, subgrupo y serotipo.

- **Grupo:** está determinado por la proteína ubicada en la capa intermedia (VP6), que permiten la clasificación del RoV en 7 grupos (de A hasta G) que son indistinguibles al microscopio electrónico, pero se diferencian antigénicamente por la técnica de ELISA. Los grupos de RoV A, B y C han sido encontrados en humanos y animales; los grupos D, E, F y G infectan solamente a los animales. El grupo A es el más común y el de mayor importancia epidemiológica (Clark *et al.*, 1996).
- **Subgrupo:** se establece a partir de dos tipos de patrones de migración electroforética de sus genes (patrón corto y largo) confirmado por estudios de hibridación molecular de ARN. De acuerdo

a su homología genética, se clasifican en: sub-grupo I (estándar DS-1) y sub-grupo II (Instituto de Vacunas Albert B. Sabin, 2005).

- **Serogrupo:** se determina mediante la tipificación serológica de la glicoproteína de la cápside externa VP7 que se conoce como serotipo "G" (glicoproteína), y el serotipo "P" que es una proteína de la cápside externa, VP4. No obstante, la diversidad del RoV en seis continentes, reconoce más de 40 cepas según la combinación de las proteínas de superficie (Tamayo *et al.*, 2007; Instituto de Vacunas Albert B. Sabin, 2005; Clark *et al.*, 1996).

En la capa más externa se encuentran las proteínas VP4 y VP7 que tienen actividad neutralizante y definen la clasificación binaria de los RoV del grupo A en serotipos y genotipos. Se han determinado 14 serotipos G y 21 genotipos P, de los cuales 10 serotipos G y 7 genotipos P infectan a humanos (Both *et al.*, 1983).

La replicación viral ocurre en las células epiteliales maduras del intestino delgado (enterocitos). Las partículas de triple capa (TLP, es decir, los viriones infectivos) se unen a la célula hospedadora e ingresan por endocitosis mediada por receptor o por penetración directa. Se ha establecido que el ingreso viral se da por una secuencia de interacciones con receptores primarios y secundarios (que actúan como correceptores) (Mandile, 2016) (Figura 10).

La replicación tiene lugar en el citoplasma. Luego de la remoción de la cápside externa de las TLP mediada por enzimas celulares y por bajos niveles de calcio, emergen las partículas de doble capa (DLP). Las mismas, se vuelven transcripcionalmente activas y un gran número de moléculas de ARN de polaridad positiva (con cap pero no poliadeniladas) se transcriben a partir de los 11 segmentos de ARN. Éstos salen de las DLP a través de los 12 canales acuosos de clase I localizados en los extremos de los ejes de simetría quíntuple. Las nuevas moléculas de ARN actúan como ARNm, y sus

productos de traducción se acumulan en el citoplasma o son replicadas en los viroplasmatas. Las dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, son los principales componentes de los viroplasmatas, esenciales para la replicación del ARN y la morfogénesis temprana. Los viroplasmatas también contienen VP1, VP2, VP3, VP6, NSP4 e inicialmente, los ARNm transcritos a partir de todos los segmentos genómicos. NSP5 interactúa tanto con VP2 como con VP1 (Trask *et al.*, 2012).

Se desconoce el orden exacto de los eventos durante la morfogénesis temprana, las interacciones moleculares y los mecanismos de control de la brotación hacia el interior del retículo endoplasmático rugoso, por medio de la interacción entre NSP4 (como receptor intracelular) y VP6. Una envoltura derivada del retículo rodea transitoriamente a las DLP, permitiendo la incorporación de VP7 y VP4. Los viriones infecciosos compuestos por las tres capas proteicas se liberan por lisis de células no polarizadas (como células MA-104) o por salida de células polarizadas (como células Caco-2) antes de observarse efecto citopático. En muestras de materia fecal, pueden observarse tanto TLP como DLP e incluso partículas que no contienen ARN genómico (Trask *et al.*, 2012).

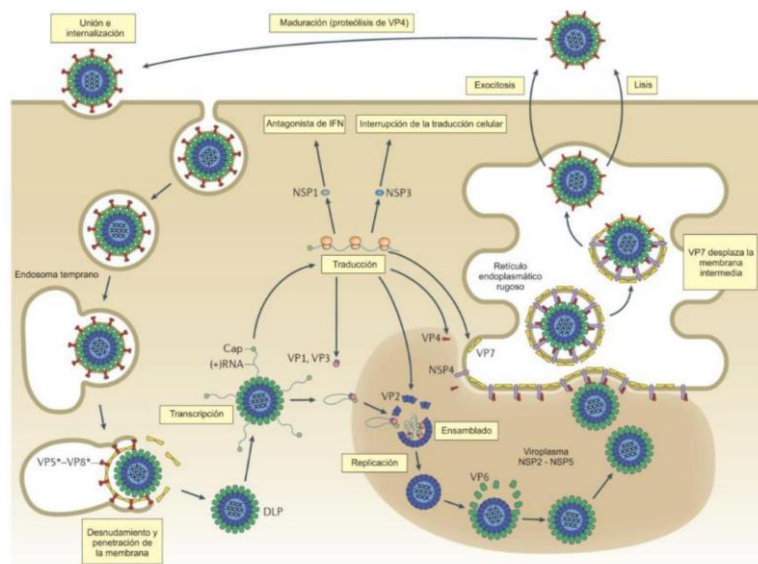


Figura 10. Ciclo de Replicación Viral de Rotavirus (Trask *et al.*, 2012).

Sintomatología Clínica del RoV

La infección por RoV es más frecuente y de mayor gravedad en los niños de 3 a 36 meses de vida (Anderson y Weber, 2004). Las manifestaciones clínicas varían dependiendo de si es la primera infección o si se trata de una reinfección. El período de incubación es de 1 a 3 días y los síntomas se resuelven habitualmente entre 3 y 7 días, salvo cuando surgen complicaciones debidas a la deshidratación (Gonzáles, 2003). El espectro clínico de presentación de la infección por RoV varía desde asintomática, síntomas leves, en los que predomina la diarrea aguda, líquida, con vómitos y fiebre, hasta cuadros más graves, en los que se asocia a distintos grados de deshidratación, con trastornos hidroelectrolíticos y shock, que en ocasiones requiere la hospitalización en unidades de cuidados intensivos pediátricos (Tamayo *et al.*, 2007; Gonzáles, 2003; Sulbarán *et al.*, 2002). En países con bajo índice de desarrollo humano, es causa frecuente de mortalidad. Se agrupó el espectro clínico en tres grupos principales:

- **Vómito:** se han reportado como síntoma importante en la infección con una duración aproximada de 2 a 4 días. Con frecuencia los vómitos aparecen primero que la diarrea, pero esta última se mantiene por más tiempo. Se ha reportado su presencia hasta en el 75% de casos (López y Arias, 2020; Instituto de Vacunas Albert B. Sabin, 2005; Newton *et al.*, 1997)
- **Diarrea:** tiene una duración aproximada de 3 a 6 días, con una frecuencia evacuatoria de 2 a 8 veces por día, de carácter acuoso, sin flema ni sangre, excepto en prematuros en los que puede tener carácter disintérico, y en casos severos, se presenta una deshidratación generalmente isotónica (Bukhari *et al.*, 2022; Anderson y Weber, 2004).
- **Fiebre:** usualmente es de corta duración (no más de dos días), puede presentarse fiebre de más 39°C (Tamayo *et al.*, 2007; Anderson y Weber, 2004).

- **Otros síntomas:** se encontró al dolor abdominal leve, además, algunos niños presentan manifestaciones respiratorias superiores y con menos frecuencia, manifestaciones sistémicas como cefalea y mialgias (Sulbarán *et al.*, 2002).

Se plantean que las enfermedades respiratorias aparecen en el 66% como efectos secundarios después de la infección por RoV y se expresan como rinitis, faringitis y otitis media (Gonzáles, 2003).

Supervivencia

Los cambios estacionales son cíclicos, mayormente predecibles, y representan las variaciones externas que afectan a los sistemas naturales y humanos. La mayoría de los casos de infección con RoV en países con climas templados, ocurre en el invierno (Van der Donck *et al.*, 2003). En contraste, se pueden aislar RoV durante todo el año en países en desarrollo con climas tropicales o subtropicales (Parashar *et al.*, 2006), aunque algunos estudios reportaron picos durante la época lluviosa (Mandile, 2016).

Los RoV son resistentes a la mayoría de los productos desinfectantes, incluyendo concentraciones de cloro libre durante 120 min, excediendo a los presentes en la red de distribución (Abad Morejón de Girón, 1994). Puede sobrevivir durante unas horas en las manos humanas y días en superficies duras, siendo capaces de retener la infectividad a los 30 o 60 días de ser desecados sobre diferentes superficies ambientales (Villena Portella, 2003). Se ha descubierto que el RoV puede seguir siendo infeccioso sobre superficies metálicas durante al menos dos meses a distintas temperaturas y niveles de humedad (Narváez y Ordoñez, 2014; Abad Morejón de Girón, 1994). Tienen resistencia a la inactivación física frente a temperatura ambiente, durante 7 meses en heces de humanos, animales, pero frente a una humedad relativa alta (superior de 80%), favorece a la pérdida de la infectividad en RoV humanos (Villena Portella, 2003).

Diagnóstico

En el diagnóstico de RoV los antecedentes epidemiológicos como la estación del año, contacto con pacientes infectados, las manifestaciones clínicas y los exámenes complementarios, son útiles para hacer un diagnóstico presuntivo (Tamayo *et al.*, 2007). Realizar un diagnóstico diferencial o confirmativo tiene como objetivo la detección de los antígenos de grupos localizados en la cápside interna, esto se realiza mediante pruebas de laboratorio desarrolladas en la actualidad como se puede mencionar (CDC, 2020; Balsalobre-Arenas y Alarcón-Cavero, 2017; Bucher *et al.*, 2017; Gonzáles, 2003; Simhon *et al.*, 1979):

- **Microscopía electrónica:** una técnica clásica, bastante exacta al visualizar los viriones, pero el alto costo en la adquisición del equipo y la tecnología que se emplea es una limitante para el uso general.
- **Fijación del complemento, la contrainmunolectroosmoforesis y la inmunofluorescencia:** son técnicas menos sensibles y complejas en el desarrollo de las técnicas.
- **Radioinmunoensayo en fase sólida:** tiene una alta sensibilidad, pero su ejecución requiere de reactivos costosos de una vida media-corta y un equipo (contador de centelleo) de alto costo, que muy pocos laboratorios de diagnóstico lo tienen.
- **La aglutinación por látex (LA) y los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA):** son comparables a la técnica de ME en cuanto a su alta sensibilidad y especificidad, y además de ser extremadamente útil cuando se tiene un gran número de casos, pues se obtienen los resultados en un tiempo corto.
- **RT-PCR:** tienen una elevada sensibilidad y especificidad, y también permiten la detección de factores de virulencia o mecanismos de resistencia, a pesar de su alto costo; la rapidez y los beneficios que se obtienen es una alternativa que los centros de diagnósticos están implementando.

Epidemiología de los brotes producidos por RoV

La infección por RoV es más frecuente en los meses de invierno en climas templados. Es típico que varios serotipos distintos predominen en una determinada comunidad durante 1 ó 2 estaciones, mientras que en localidades cercanas se identifican cepas no relacionadas con aquellas, esto puede deberse a diversas razones, una puede ser la diferencia entre las dietas y otra razón puede estar dada por el régimen de vida en las distintas comunidades (Gonzáles, 2003). El RoV es la causa principal de gastroenteritis grave en la infancia en el mundo. A pesar de este escenario, no se tiene un panorama completo del alcance real. La vigilancia hospitalaria ha sido irregular y los cálculos de la prevalencia mundial dependen de informes que suelen tener más de 15 años de antigüedad (Hernández *et. al.*, 2019).

Actualmente, los investigadores en muchas partes del mundo están intensificando sus esfuerzos para obtener un panorama actualizado de la prevalencia (CDC, 2020). Algunos de los investigadores que dirigen estas actividades en América Latina, Asia, África y los EEUU, presentaron informes sobre sus hallazgos en el sexto simposio Internacional sobre RoV (Instituto de vacunas Albert B. Sabin, 2005). La incidencia de la enfermedad es mayor en niños entre 6 y 24 meses. Los niños de este rango etario corren mayor riesgo de padecer enfermedad severa por RoV y requerir hospitalización. En total, los RoV son responsables de entre 25 y 50% de las hospitalizaciones de niños por diarrea en todo el mundo (Parashar *et al.*, 2006). Las infecciones de RoV en adultos, por lo general, no causan manifestaciones clínicas o son mínimas, pero ocasionalmente pueden causar alguna enfermedad o complicación (Mandile, 2016).

Se ha estimado qué a nivel global, anualmente los RoV causan la muerte de 453,000 niños menores de 5 años (correspondiente al 37% de las muertes totales por diarrea y al 5% de las muertes totales en este grupo etario) (Mandile, 2016). En Latinoamérica, se estima que RoV A, causa

aproximadamente 6,300 muertes y 230,000 hospitalizaciones anualmente (Desai *et al.*, 2012). En tanto, que un estudio calcula que en Argentina 150,000 consultas ambulatorias por diarrea, 15,000 hospitalizaciones y 30 muertes anuales en menores de 5 años se deben a este enteropatógeno (Glass *et al.*, 2006). A pesar de que la proporción de RoV detectado en niños hospitalizados con diarrea fue mayor en países desarrollados, la mayoría de las muertes asociadas se detectaron en países en vías de desarrollo de África y Asia. En solo cinco países (India, Nigeria, Pakistán, República Democrática del Congo y Etiopía) se contabilizaron la mitad de las muertes (Tate *et al.*, 2012; Parashar *et al.*, 2006).

Para el 2003-2004, en Colombia, 1000 niños menores de 5 años hospitalizados por gastroenteritis aguda en los cuales se identificó RoV en el 49% de los casos. De ellos, aproximadamente el 70% tenía entre 6 a 24 meses de edad. Los niños con RoV confirmado tuvieron mayor severidad de la enfermedad (Torres-Martínez, 2013)

Por estos motivos, desde la década de los 70, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de vacunas contra RoV. Desde el año 2006 se obtuvieron licencias para dos vacunas de RoV en numerosos países y en algunos de ellos ya han sido incluidos en los planes nacionales de vacunación (OMS, 2013), como es el caso de Argentina que incorporó la vacuna monovalente en el año 2015 (Ministerio de Salud de Argentina, 2015).

Los reportes desde el 2006 cuando se da la introducción de las vacunas en el esquema de vacunación en el mundo, indica una notable y significativa efectividad de las vacunas. Un estudio a nivel mundial desde el 2006 hasta el 2019 que incluye 32 países con mortalidad baja, media y alta, indican que la eficacia de la vacuna es variable entre 45 al 85%. Se ha relacionado a otros factores como el estado nutricional y la composición del microbioma de la población infantil, entre otras. Este estudio enfatiza la importancia de la

aplicación vacunal a tiempo, particularmente de la primera dosis (Burnett *et al.*, 2020).

Los nuevos estudios indican que las vacunas contra el RoV previenen más del 90% de los casos de diarrea y muerte en niños menores de 2 años en países con baja tasa de mortalidad infantil, más del 75% en países con tasas intermedias y en los países con alta tasa de mortalidad infantil, la prevención es de 35% en niños menores de 2 años y el 58% en niños menores de 1 año (Bergman *et al.*, 2021; Cates *et al.*, 2021). La importancia en la aplicación de las dosis pertinentes para la eficacia e inmunogenicidad inducida, según sea el tipo de vacuna administrada, es significativa ya que se ha reducido la hospitalización y mortalidad a un 68% para RoV1 y 65% para RoV5. También, la protección de administrar el esquema completo de vacunación es de 66% en comparación de si solo se aplica una sola dosis 44%, donde indica que los países que han presentado el informe anual hasta el 2020, reportan IgA anti-RoV de 69 a 89.6% (Sun *et al.*, 2021).

Mecanismos de Transmisión

Los RoV son altamente contagiosos y su modo de transmisión es por vía fecal-oral. Debido a que el virus es muy estable en el ambiente, la transmisión puede ocurrir por contacto persona-persona, a través de comida, agua o por contacto con superficies contaminadas. Así también, las infecciones intrahospitalarias son muy comunes (Dennhey, 2000). Anteriormente, se consideraba que la infección por RoV se limitaba al tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha detectado RoV en secreciones nasofaríngeas de niños con o sin síntomas gastrointestinales (Mandile, 2016; Desai *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 1991), por lo que, también, podría transmitirse por la vía respiratoria (Dennhey, 2000). Las infecciones por RoV se asocian comúnmente con antigenemia (presencia de antígenos virales en la sangre) en niños con diarrea y también, aunque menos frecuentemente, presencia de ARN viral en la sangre (Blutt *et al.*, 2007). Además, se ha detectado RoV

en suero y en múltiples órganos de animales infectados experimentalmente, así como en el LCR y en tejidos de niños y adultos (Fenaux *et al.*, 2006).

Prevención

Prevenir las infecciones contra cualquier agente patógeno es de importancia para la sociedad y el estado, de esta manera, se disminuyen los costos económicos producidos por los brotes. Una buena higiene reduce el riesgo de infección por esta patología. Un estudio sobre la sobrevivencia de este virus en las manos del personal de salud señala que puede mantenerse por más de 4 h con mejor sobrevivencia que algunos virus respiratorios (Ansari *et al.*, 1989). Como es un virus con alta incidencia en niños menores de 5 años, se promueve la lactancia materna, aunque no impide la infección, parece atenuar la enfermedad, por lo que estimular su empleo en la alimentación de los niños, podría disminuir la incidencia de deshidratación y la consecuente hospitalización de menores de dos años como consecuencia de gastroenteritis aguda por RoV (Tamayo *et al.*, 2007).

Pese a muchos esfuerzos en la mejora de las medidas sanitarias, la incidencia de la infección por RoV prevalece en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, por lo tanto, la única medida que puede tener un impacto sobre la morbilidad y mortalidad de esta infección, parece ser la vacunación específica. El tema de vacunación contra RoV no es nuevo. Al día de hoy, se puede decir que han existido tres etapas en el desarrollo de vacunas contra este virus. La primera se inició en los años 70, cuando investigadores que utilizaban el abordaje "Jeneriano", es decir, inducir protección en humanos con cepas atenuadas de RoV de origen animal, probaron la cepa RIT 4237 de origen bovino, serotipo G6, en Finlandia y demostraron que la administración oral de una dosis de esta vacuna a niños sanos confería un 80% de protección. El problema se presentó cuando se probó esta vacuna candidata en sujetos de países menos desarrollados y no

demostró niveles de protección similares, por lo que se optó por no continuar con el desarrollo de ésta (Vesikari *et al.*, 1984).

El segundo abordaje es diferente. Después de demostrarse la capacidad "natural" de diferentes cepas de RoV de origen animal y humano, y de recombinarse *in vitro*, y con la idea de ampliar la protección induciendo inmunidad homotípica y heterotípica, se desarrolló una vacuna que contenía una mezcla de cuatro cepas virales de origen humano con los serotipos G1 a G4, y el cuarto gen codificado para la proteína VP7 del serotipo G3 de origen rhesus. Esta vacuna demostró ser eficaz, tanto en países desarrollados como menos desarrollados, pero posterior a su comercialización (1998), se le relacionó con invaginación intestinal, razón por la cual se retiró del mercado (Murphy *et al.*, 2001).

Actualmente, existen 2 vacunas de virus vivos atenuados contra RoV aprobadas y aplicadas a nivel global. La vacuna monovalente (RV1, Rotarix, GSK) y la vacuna pentavalente (RV5, Rotateq, MSD). La RV1 es de origen humano a partir de una cepa G1P[8]. Esta vacuna se aplica en 2 dosis recomendadas a los 2 y 4 meses de vida. La primera dosis debe ser aplicada preferiblemente antes de la semana 16 y el esquema debe estar completo máximo a las 24 semanas. El intervalo mínimo entre dosis debe ser de 4 semanas (Ruíz-Palacios *et al.*, 2006).

La RoV5, está constituida por 5 componentes con reordenación genética de origen humano-bovino y que expresan una de las proteínas de cápside externa (G1, G2, G3 y G4 y P[8]). El esquema vacunal con RV5 incluye 3 dosis. La primera dosis se puede aplicar desde la 6 semana de vida con una edad máxima de aplicación de 14 semanas y 6 días, y la tercera se puede aplicar a los 8 meses y 0 días máximo. El intervalo recomendado es de 8-10 semanas siendo el mínimo de 4 semanas (Vesikari *et al.*, 2006).

Los Moluscos Bivalvos como Agentes Transmisores de Enfermedades Infecciosas

Los moluscos-bivalvos son parte importante de los recursos alimentarios a escala mundial que son extraídos de las zonas marino-costeras. La actividad económica relacionada con la explotación de los criaderos naturales de moluscos bivalvos y el cultivo artificial tiene una gran importancia en la Comunidad Europea (Córdoba *et al.*, 2010).

En América Latina, la acuicultura se ha extendido de manera continua en los últimos 20 años, con una aceptación principal en el cultivo de camarones y salmones, seguidamente con el creciente mercado de bivalvos, posicionándose Chile en el primer lugar de producción (FAO, 2005). La tendencia de crecimiento en la acuicultura de bivalvo también se está observando en Perú y Brasil, quienes se han posicionado entre los tres mayores productores de bivalvos cultivados a nivel comercial de América Latina (Rupp *et al.*, 2008).

En Panamá, la acuicultura de bivalvo no ha tenido gran auge, se considera que es una de las más bajas de América Latina y la adquisición de este producto marino procede exclusivamente de la pesca artesanal (ARAP, 2012). El comportamiento de la población de los bivalvos es estable al no presentar un patrón de variación poblacional (CATHALAC, 2007). Este producto para la población costeña, es comercializado como un medio de subsistencia, hecho que se registra desde los años 1986 hasta la actualidad (Guerra Lima *et al.*, 2012). Algunos moluscos bivalvos de importancia comercial en Panamá que se pueden mencionar son:

- *Argopecten ventricosus*, conocida como Conchuela. Se encuentra distribuida a lo largo del Océano Pacífico desde México hasta Perú. Vive en una variedad de sustratos, incluyendo areno-fangoso, arena gruesa e incluso en rocas asociadas a corales y algas, desde la zona intermareal hasta 180 m de profundidad, y a veces siendo muy común encontrarla en aguas someras de fondo arenoso. El contorno de sus

conchas tiene forma de abanico y casi iguales, pero la concha derecha es más inflada. Son de color muy variable, a menudo brillante, desde blanco casi puro hasta naranja, rosado, café, púrpura. La superficie externa está formada por 21 costillas radiales que parten del umbo y numerosas líneas concéntricas en los espacios intercostales. Estas particularidades son propias de esta especie.

- *Crassotrea* sp., su nombre común son ostiones u ostras. Son las más importantes desde el punto de vista pesquero y acuícola. Estos organismos presentan un par de conchas sólidas de diferentes formas, que brinda protección a su cuerpo blando. La mayoría son habitantes de la zona intermareal de influencia estuarina y viven adheridos a las raíces, rocas o conchas.
- *Anadara* sp., comercialmente conocida como Concha Negra. Es una especie propia de los manglares del pacifico panameño. Se encuentra ampliamente distribuida desde el Golfo de California, México, hasta Tumbes-Perú. Presenta valvas iguales relativamente grandes, gruesas y ovaladas, y presentan entre 33 y 37 costillas o estrías. Los nódulos de las costillas son la razón de su nombre. Tienen una coloración blanca en la parte externa y café oscuro con tendencia a negro por debajo del peiostraco, dotadas de finas cerdas las cuales se aprecian mejor cuando se encuentran en los estadios juveniles. La concha negra vive en el ecosistema de manglar casi enterrada en el fango, zonas donde predominan areno-limosas.
- *Leukoma* sp., también es conocida como almeja blanca, representa un producto marino muy apetecido por la población panameña. Para muchas poblaciones humanas costeras, este bivalvo es una fuente importante de proteína en su dieta y además, de ser una fuente de ingreso económico en muchos hogares, por ser un producto muy cotizado en los restaurantes (López *et al.*, 2003). Por esta razón, la explotación es extraída en grandes cantidades en Panamá. Tiene

como preferencia playas de sustrato arenoso fangoso con mucha materia orgánica (López *et al.*, 2005). Varias son las playas en nuestro país con las condiciones adecuadas para su desarrollo, tenemos: Puerto Caimito, Bique, Punta Chame, en la provincia de Panamá; Garachiné y Taimití en Darién, y Farallón en Coclé. Sin embargo, es en Playa Bique, Arraiján, donde la extracción de esta especie es mayor, supliendo los requerimientos de este bivalvo para la ciudad de Panamá (López *et al.*, 2005; López *et al.*, 2003).

- *Donax* sp., los miembros del género *Donax* comúnmente se encuentran en playas arenosas de las costas tropicales y templadas (Laudien *et al.*, 2003). Se han reportado 14 especies distribuidas en las provincias de Panamá y en Perú, y dos especies localizadas en California, EEUU (Paredes y Cardoso, 2001).

Los moluscos bivalvos son organismos sedentarios y de régimen alimentario exclusivamente filtradores, y por esta característica en particular, son propensos a transmitir bacterias, protozoarios y virus entéricos patógenos, si las aguas en las cuales crecen están expuestas a contaminación con materia fecal, transportados por aguas residuales o durante manipulación de los comerciantes. Actualmente, la calidad sanitaria de los ecosistemas marino-costeros, han sido comprometidos por los grandes aportes de aguas residuales que reciben, debido a la sobrepoblación y actividades industriales, provocando cambios significativos en los parámetros físicos, químicos y biológicos del ecosistema marino, y además, se han convertido en un riesgo potencial para la salud pública derivado del consumo directo de organismos marinos y aquellas actividades recreativas realizadas en las zonas impactadas (Figura 11).

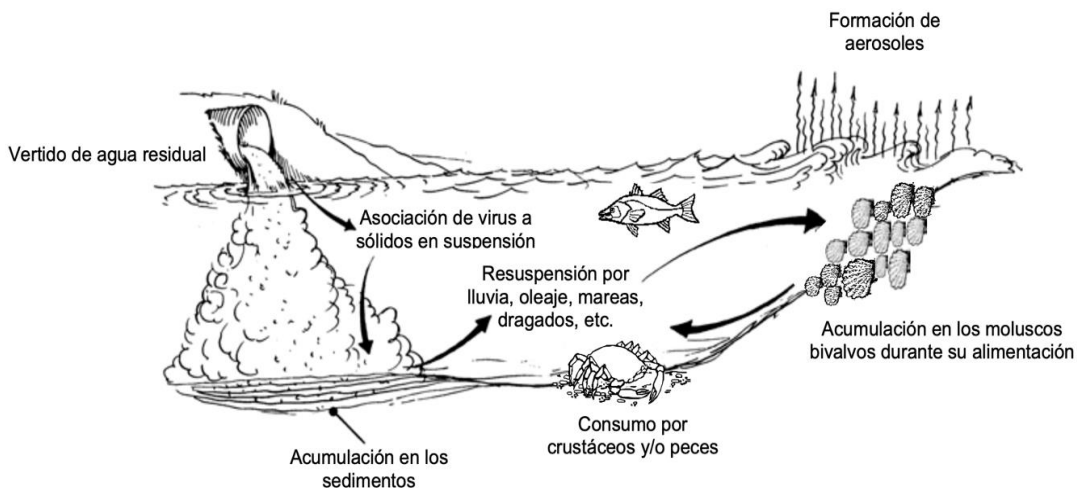


Figura 11. Destino de los virus en los ecosistemas marítimos (Melnick y Gerba, 1980).

El consumo directo de organismos marinos provenientes de zonas contaminadas con nula o poca cocción, en su mayoría no cuentan con el almacenamiento apropiado y una manipulación inadecuada causan brotes de enfermedades que conllevan a un problema de salud pública. Se ha demostrado que estos organismos marinos contaminados pueden ser ruta de transmisión de enfermedades en el hombre como se puede mencionar la fiebre tifoidea y paratifoidea, salmonelosis, infección por *Vibrio parahaemolyticus*, hepatitis vírica de tipo A, intoxicación paralizante por cólera (Pina Pedrero, 2001).

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar molecularmente Adenovirus, Enterovirus y Rotavirus presentes en *Anadara tuberculosa*, *Leukoma* sp. y *Donax* sp., provenientes de tres áreas del golfo de Panamá.

Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de colífagos en *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp., *Donax* sp., mediante la técnica doble capa de agar.
2. Estandarizar las metodologías de ICC-PCR, ICC-RT-PCR y RT-PCR anidadas para la detección temprana de virus entéricos en muestras de bivalvos de importancia comercial.
3. Determinar la presencia de Adenovirus, Enterovirus y Rotavirus en *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp., *Donax* sp., por medio de la técnicas de ICC-PCR, ICC-RT-PCR y RT-PCR anidadas.
4. Estandarizar métodos de PCR y RT-PCR anidadas para la secuenciación de Adenovirus y Enterovirus.

Hipótesis de trabajo

Ha: Existe la presencia de virus entéricos en *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp. y *Donax* sp. colectas en el Golfo de Panamá.

Ho: No existe la presencia de virus entéricos en *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp. y *Donax* sp. colectas en el Golfo de Panamá.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y

MÉTODOS

METODOLOGÍA

Procedencia de las muestras

El área de estudio se localiza en el golfo de Panamá donde se adquirieron los bivalvos de interés para este estudio. Se seleccionaron tres zonas de referencia para la obtención de las muestras. Cada sitio fue seleccionado por presentar poblaciones diferentes y específicas de bivalvos, donde se colectaron especímenes de *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp. y *Donax* sp. ubicados de la siguiente manera (Figura 12):

- a. Bahía de Chame, corregimiento de Bejuco, distrito de Chame, provincia de Panamá Oeste, ubicado entre los 8°36'00" N y 79°53'00" O, con una extensión territorial de 59.6 km² (Empresa de Transmisión Eléctrica-ETESA, 2019; Instituto Geográfico Nacional "Tommy Guardia"-IGNTG, 2011), donde se obtuvo las muestras de *A. tuberculosa*.
- b. Bahía de Bique, Arraiján, Provincia de Panamá Oeste, ubicado entre 8°53'37.14" N y 79°39'23.33" O, con una extensión territorial de 53.4 km² (IGNTG, 2011), donde se obtuvo las muestras de *Leukoma* sp.
- c. Playa Chinina, distrito de Chepo, provincia de Panamá, ubicada entre las coordenadas 9°07'30.80" N y 79°03'50.86" O, con una extensión territorial de 4,937.0 km² (IGNTG, 2011; Instituto Nacional de Estadística y Censo-INEC, 2016), se adquirieron las muestras de *Donax* sp.

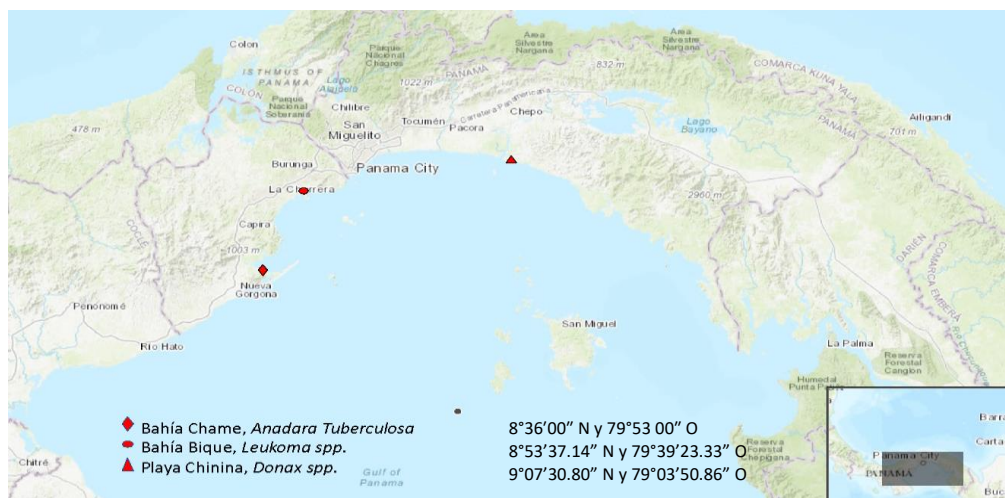


Figura 12. Área de estudio y recolección de los bivalvos en el Golfo de Panamá. Elaborado por Asquena Aguilar, en la página IGNTG.

Los ejemplares se adquirieron de los recolectores artesanales de cada sitio. Una vez adquiridos, fueron trasladados en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), y al Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA), Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado (VIP), Universidad de Panamá, donde se procesaron para los análisis de virus entéricos y colífagos.

Diseño experimental

Las muestras de bivalvos se obtuvieron de los sitios ya mencionados, en las dos temporadas, seca y lluviosa. Las primeras colectas se llevaron a cabo en la época de mayor precipitación pluvial, correspondiente a los meses de septiembre a noviembre de 2020 y las segundas colectas se realizaron en el periodo seco, en los meses de febrero a abril de 2021. En cada periodo estacional se colectaron quince (15) muestras de cada una de las especies de bivalvos; es decir, cinco muestras por mes. Cada muestra está constituida aproximadamente por 25, 40 y 60 individuos para *A. tuberculosa*, *Leukoma* sp. y *Donax* sp., respectivamente. El peso promedio de cada individuo de *A. tuberculosa* es de 4 g, y para *Leukoma* sp. y *Donax* sp., es aproximadamente

de 2 g.

Procesamiento de las muestras

Las muestras, una vez en los laboratorios, se lavaron las superficies externas de las valvas de los Bivalvos con agua destilada, y toda materia orgánica y fauna asociada fueron retiradas con cepillos de cerdas fuertes. Se continuó con la abertura de los ejemplares dentro de una cámara de flujo laminar, conservando la asepsia y esterilidad en cada paso del procesamiento de las muestras. Se utilizó un cuchillo estéril para la separación de las valvas, la extracción del líquido intravalvar y tejido blando interno de los ejemplares de estudio. El contenido fue ubicado en envases de vidrio estériles, previamente rotulados.

Se prosiguió a la implementación del manual de procedimiento del Programa Canadiense de Saneamiento de Mariscos (2011), donde se homogeneizaron 100 g del líquido intravalvar y tejido blando interno de los ejemplares de estudio con 100 mL de tampón fosfato (estéril) (1.25 mL de KH_2PO_4 + 5.0 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2). La homogeneización fue a alta velocidad en un mezclador a intervalos de 5 s, durante 5 min, obteniendo la dilución madre. Utilizando la metodología establecida por Lees *et. al.* (1994) con pequeñas modificaciones, se tomaron 30 g del licuado madre y se diluyó en una relación 1:1 con tampón glicina 1 M (pH 9.5). El homogenizado pasó por vórtex por 10 min a temperatura ambiente (TA) y se centrifugó a 3500 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se combinó con dos volúmenes de polietilenglicol (PEG) 8000 al 8% (p/v). La mezcla se agitó en un rodillo a 4°C por 24 h y se centrifugó a 11000 rpm a 4°C por 15 min. El precipitado (pellet) se resuspendió en 1.5 mL de solución tamponada salina fosfato (PBS) pH 7.5. La mitad de la muestra se utilizó para extracción de ácidos nucleicos totales y para la detección de colífagos (se realizaron alícuota de 150 μL), y la otra mitad, para aislamiento viral. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Para los colífagos se conservaron a 4°C para un

análisis inmediato.

Detección de colífagos

Para la detección de colífagos en las muestras de bivalvos se siguió la metodología establecida por Jamalludeen *et al.* (2007), con ligeras modificaciones. En resumen, se utilizó la bacteria *E. coli* ATCC 15597, en un cultivo de 50 mL de caldo LB estéril contenido en un erlenmeyer de 125 mL y pasadas las 24 h, se sembró nuevamente la bacteria huésped en 50 mL de caldo LB estéril contenido en un erlenmeyer de 125 mL, hasta que alcanzó su fase logarítmica de crecimiento con una densidad óptica de al menos 5 McFarland.

Se agregó a un tubo de cristal de 10 mL que contiene 2.5 mL de caldo nutritivo al doble de su concentración, 200 μ L de cultivo de la cepa ATCC 15597 en su estado logarítmico y 200 μ L del concentrado de las muestras filtradas utilizando filtro de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.22 μ m, en presencia de 50 μ L de cloruro de calcio (10 mM). Seguidamente, se incubó a 37° C durante 24 h. Después, el volumen enriquecido se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min en tubos cónicos de 15 mL, se recuperó el sobrenadante y se filtró utilizando filtro de jeringuilla de acetato de celulosa con poros de 0.22 μ m. Posteriormente, se realizó un segundo enriquecimiento de la misma manera que el primer enriquecimiento utilizando como muestra el sobrenadante del primer enriquecimiento.

Se procedió a realizar el enfrentamiento de los fagos de las muestras con la cepa ATCC 15597 de *E. coli*, donde se realizó una dilución seriada de 10^{-8} a 10^{-1} por cada muestra en tubos de 2 mL que contenían 900 μ L buffer SM-gelatina, se tomaron 100 μ L del filtrado de la muestra, 300 μ L de la cepa ATCC 15597 *E. coli* con un tiempo de crecimiento aproximado de 18-24 h y 4 μ L de CaCl_2 (10 mM). Se esperó 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Después del enfrentamiento se mezcló 600 μ L de cada dilución en 3 mL de top agar (caldo nutritivo + agar agar al 7.5 % precalentado en baño María a

50 °C) y 30 µL de CaCl₂ (10 mM), se mezcló evitando formar burbujas. Cada suspensión de esta mezcla se vertió sobre platos petri de agar nutritivo (12 mL) de manera suspendida que cubra de forma uniforme la superficie total del plato, realizando movimientos ligeros circulares. Se mantuvo a TA hasta que se solidifique por completo, para luego incubar a 37°C durante 24 h. Pasadas las 24 h, se contaron los puntos claros donde no hubo crecimiento tomando a cada uno de ellos como una Unidad Formadora de Placa (UFP), tomando en cuenta solo los platos con 30 a 300 UFP. El título viral se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \text{Número de placas/d} \times \text{v}$$

Dónde: d= dilución, v= volumen de virus diluido añadido a la caja

La concentración de bacteriófagos se expresó como Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL).

Aislamiento viral

Los experimentos de cultivo celular para el aislamiento viral fueron realizados con la línea de células Vero (Riñón de Mono Verde Africano) ATCC CCL-81, la cual es permisible para AdV y EV, donadas por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). Se utilizaron como controles positivos las muestras de heces positivas por AdV humano y la vacuna de virus vivo atenuado de Poliovirus (PolioSabinTM, A0P4A653A0), donadas por el Hospital del Niño.

Cultivo celular

Los ensayos de cultivo celular conllevan una serie de procesos de manera aséptica y controlable. Se implementó los protocolos descritos en el Manual de Virología Médica de la Universidad de Costa Rica (UCR) (2004), en los procesos de preparación de medios de cultivo de crecimiento al 10% de suero fetal bovino (SFB) y de mantenimiento al 2% de SFB, utilizados para el crecimiento y mantenimiento de la línea celular, tripsinización o

subpasajes, así como la infección viral (Herrero *et al.*, 2004) (tabla 4).

Tabla 4. Preparación de medio de cultivo de crecimiento al 10 % y mantenimiento al 2 %, para un volumen final de 500 mL.

Solución	Medio de crecimiento 10%	Medio de mantenimiento 2%
EMEM + Rojo fenol 1%	423.5 mL	463.5 mL
Suero fetal bovino (SFB) inactivado	50 mL	10 mL
L-glutamina 100x	5 mL	5 mL
Penicilina 100x	5 mL	5 mL
NaHCO ₃ al 7.5%	1.5 mL	1.5 mL
HEPES	15 mL	15 mL

Crecimiento de cultivo celular

Las líneas celulares para su crecimiento se trabajaron en una botella de 25 cm², previamente rotulado con la fecha y número de pasaje que corresponde. Se agregó 5 mL de medio de cultivo de crecimiento al 10% de SFB, incubándose a 37°C durante 24 h. Luego, se procedió a cambiar el medio de crecimiento al 10% de SFB por medio nuevo y de esta manera, eliminar efectos tóxicos en las células procedentes de los crioprotectores.

El cultivo celular permaneció en incubación hasta conseguir la adhesión de la monocapa celular al recipiente con forma de fibroblasto o fusiforme alargadas. Cada plato debía tener un alto porcentaje de confluencia celular (entre 70 y 75%) y luego, se realizó el cambio de medio, se cambió el medio de crecimiento al 10% de SFB por medio de mantenimiento al 2% de SFB.

Tripsinización y pasaje o sub-cultivo

La tripsina es una enzima que se utiliza para la separación de las células de la superficie de crecimiento y de esta manera tener las células en

suspensión, facilitando realizar el pasaje a nuevos recipientes y de esta manera, aumentar el volumen de células en el laboratorio, para los siguientes experimentos. Se eliminó el medio de mantenimiento al 2% de SFB de la botella en uso, seguidamente se lavó con 3 mL de PBS estéril y se descartó en un envase con hipoclorito al 0.5%. Luego, se agregó 1.5 mL de tripsina atemperada a 35°C, para cubrir la monocapa y posteriormente, se incubó a 37°C por 15 min, observándose las células al microscopio a intervalos de 5 min, buscando cambios en el aspecto físico de las células (forma redonda) o la separación de la superficie adherida. Se eliminó 0.75 mL de tripsina y se incubó nuevamente a 37°C por 5 min. Para acelerar el proceso, se dieron fuertes y cuidadosos golpes a los costados de la botella de cultivo para que las células se desprendieran en su totalidad de la superficie. Finalmente, se agregó 4 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, homogeneizando suavemente la botella de cultivo. Se pasó 3 mL del producto del homogenizado a una botella de 75 cm² y se agregó 5 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, y 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 de la botella de 75 cm² que se estaban cultivando, y para esto, se realizó el proceso de tripsinización y pasaje descrito previamente, con breves modificaciones en la cantidad de PBS a 5 mL, de tripsina a 3 mL y 10 mL del medio de crecimiento al 10% SFB que se le añadió después de tripsinizar. Se tomó 9 mL de las células con medio de cultivo y se pasó a un tubo cónico de 50 mL, se agregó 41 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, y se homogeneizó cuidadosamente. Es el cultivo celular que se utilizó para la preparación de los platos de 24 pocillos para la infección viral.

Para la infección viral, se utilizaron cuatro platos de 24 pocillos. Cada plato que se utilizó debe estar rotulado con fecha, número de pasaje y ubicación

de los controles positivos, negativos y las muestras. A cada pocillo se le agregó 500 μ L de la homogenización de células Vero contenidas en el tubo de 50 mL.

En cada plato, se observaron de manera aleatoria 4 pocillos al microscopio invertido, buscando que las células estuvieran distribuidas por todo el pocillo, evitando aglomeración en un sitio específico. Los platos se incubaron a 37°C por tres días donde se obtuvo confluencia entre un 70 a 75%, y luego, se cambió el medio de crecimiento al 10% de SFB por medio de mantenimiento al 2% de SFB.

Infección viral

Se sacaron los microtubos de muestras del congelador a -80°C, la descongelación se hizo progresivamente hasta alcanzar la TA. Los platos que se utilizaron tenían una confluencia de entre 70 a 75%, se eliminó el medio de mantenimiento al 2% de SFB y seguidamente, se lavó cada pocillo con 250 μ L de PBS estéril, y se descartó en un envase con hipoclorito 0.5%. Luego, se le añadió 150 μ L de medio sin SFB al control negativo (C-) y 100 μ L al resto de los pocillos de cada plato. Al control positivo (C+), se le agregó 50 μ L de la muestra de AdV humano donado por el Hospital del Niño, previamente cultivada en células Vero. A los pocillos rotulados con la codificación de las 90 muestras, se le agregó 50 μ L de cada muestra correspondiente y se incubaron a 37°C por 1 h, realizando movimientos circulares a los platos cada 15 min. Después, se eliminó el medio en el envase de hipoclorito al 0.5 % y se le agregó a cada pocillo 500 μ L de medio de mantenimiento al 2% de SFB. Finalmente, los platos se incubaron a 37°C con revisión cada 24 h, hasta observar efectos citopáticos (ECP) o durante una semana (Martínez-Torres *et al.*, 2009 y 2016).

Clarificación de las muestras

Las muestras que presentaban ECP se raspaba el pocillo con una punta de 1000 µL estéril y se pasaba a un tubo de 2 mL estéril. Se congeló durante 15 min a -80°C y pasado el tiempo, se descongeló a 37°C, y seguidamente, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se conservó en tubos rotulados de 2 mL y se almacenó a -80°C hasta realizar un segundo pasaje o la extracción de los ácidos nucleicos para posterior detección molecular de partículas de AdV o EV.

Detección molecular

Extracción de ácidos nucleicos y cuantificación de los ácidos nucleicos

Para la extracción de ADN y ARN viral, se utilizaron 450 µL del sobrenadante del primer y segundo pasaje del cultivo celular para la posterior detección de AdV y EV, y 450 µL del resuspendido del precipitado con PEG de cada muestra cruda conservada previamente a -80°C, para la detección molecular de RoV, estos volúmenes se mezclaron con el búfer de lisis del kit comercial, PureLink™ Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen, EEUU), siguiendo las indicaciones del Fabricante. El ácido nucleico extraído fue cuantificado utilizando un BioSpec-Nano (Corporación Shimadzu, Japón). Por último, las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -80°C, hasta su posterior análisis molecular.

Estandarización de técnicas moleculares para la detección viral de AdV, EV y RoV en bivalvos

Para la detección molecular de AdV por Cultivo Celular Integrado-Reacción en Cadena de la Polimerasa (ICC-PCR), de EV por Cultivo Celular Integrado-Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (ICC-RT-PCR), y RoV por Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) anidadas, se utilizaron diversos protocolos

estandarizados en investigaciones previas (Ngaosuwankul *et al.*, 2013; Avellón *et al.*, 2001; Pina *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 1997), con pequeñas modificaciones. Las modificaciones fueron: las temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación, y además, se realizaron curvas de concentración de MgCl₂. Se realizaron experimentos para la amplificación de secuencias específicas dirigidas a una región conservada del genoma individual de cada virus de interés y posterior a esto, se realizó la unificación de los protocolos estandarizados para obtener un solo método de detección molecular anidada.

Detección molecular de AdV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-PCR anidada

La estandarización inició con AdV según protocolo de Avellon *et al.* (2001), utilizando muestras positivas provenientes de aislamientos en cultivo celular donados por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud (ICGES, a través de la MSc. Ilka Guerra), y de heces de niños con gastroenteritis donados por el Hospital del Niño (HDN, a través del Dr. Julio Nieto), utilizando condiciones de 5.0 µL Buffer PCR 5X, 1.5 µL dNTPs 10 mM, 0.2 µL GoTaq® DNA Polymerase 5 U/µL (1 u), 0.5 µL de los cebadores (25 µM), 4.0 µL de MgCl₂ 25 mM, los 13.3 µL faltantes en la mezcla maestra, fueron completados con el volumen de muestra (ácido nucleico) necesario para alcanzar los 50 ng/µL en el volumen final de la reacción, según lo indica la cuantificación de los extractos y se completo el volumen final de 25 µL con agua libre de nucleasas.

Para la amplificación 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 inicial del ADN, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para la 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 terminar, se mantendrá a una temperatura de 4°C por un día o -20°C para

almacenamiento continuo. Se utilizó las secuencias de los cebadores descrita en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia (5´ - 3´) específica para 60 serotipos de AdV humanos.

Cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)
ADHEX1F	5-AACACCTAYGASTACATGAAC-3	ORF2/3	473
ADHEX1R	5-KATGGGGTARAGCATGTT-3		
ADHEX2F	5-CCCMTTYAACCACCACCG-3		
ADHEX2R	5-ACATCCTTBCKGAAGTTCCA-3		168

Detección molecular de EV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-RT-PCR anidada

Se prosiguió con la estandarización de EV según protocolo de Casas *et al.*, (1997) y Nix *et al.*, (2006), el control positivo fue la vacuna de virus vivo atenuado de Poliovirus (PolioSabinTM) donado por el HDN. La RT-PCR se realizó utilizando el kit de RT-PCR 100 RXN (Promega, EEUU). Se compararon dos juegos de cebadores donde el grupo 1 fue el seleccionado para este estudio, porque fue el juego de cebadores que amplificó el control positivo que se utilizó, visualizando la banda en el peso molecular esperado de 323 pb (Tabla 6), y se realizó una variación en la concentración de MgCl₂, donde se implementó una curva de Mg utilizando diferentes concentraciones desde 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM, con la que se buscaba identificar si existe alguna dependencia de MgSO₄.

La reacción de ICC-RT-PCR anidada tendrá un volumen final de 25 µL, de los cuales: 5 µL es de AMV/tfl 5X Buffer, 4 µL de MgSO₄ (25 mM), 0.5 µL de dNTP's mix (10 mM), 0.5 mM de cada cebador (25 mM), 1 µL de RT-AMV (2.5 u), 1 µL de tfl/DNA (2.5 u). A los 12.5 µL restantes se le añadió el volumen de muestra (ácido nucleico) necesario para alcanzar los 50 ng/µL en el volumen final de la reacción, según lo indica la cuantificación de los extractos y se completo el volumen final con agua libre de nucleasas.

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, 1 ciclo de 3 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para la 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 terminar, se mantendrá a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

Tabla 6. Secuencia (5´ - 3´) específica para la detección de EV humanos.

Grupo	Cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)
1	EV1+	5'-CGGTACCTTTGTRCGCCTGTTTAA-3'	ORF1/ ORF2	995
	EV1-	5'-GAAACACGGACACCCAAAGTAGTCG-3'		
	EV2+	5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCG-3'		323
	EV2-	5'-GGATTAGCCGCATTTCAGGG-3'		
2	224	5'-GCIATGYTIGGIACICAYRT-3'		350
	222	5'-CICCIIGGIGGIAYRWACAT-3'		
	An89	5'- CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG-3'		400
	An88	5'- TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT- 3'		

Detección molecular de RoV en muestras directas de tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de RT-PCR anidada

La estandarización de RoV se realizó según protocolo de Ngaosuwanikul *et al.*, (2013), utilizando los controles positivos de muestras de heces de niños con gastroenteritis provenientes del HDN. El protocolo implementado utiliza un par de cebadores con secuencia de (5´ - 3´) para la RT-PCR, y para la PCR anidada utiliza dos pares diferentes de secuencias, siendo la secuencia 2.1 la que amplificó los controles positivos (Tabla 7). Se logró la amplificación de los controles positivos obteniendo la banda esperada de 348 pb, implementando una RT-PCR con las siguientes condiciones: 5 µL es de

AMV/tfl 5x Buffer, 2.5 µL de MgSO₄ (25 mM), 0.5 µL de dNTP's mix (10 mM), 0.5 mM de cada cebador (25 mM), 1 µL de RT-AMV (2.5 u), 1 µL de tfl/DNA (2.5 u). A los 14 µL restantes se le añadió el volumen de muestra (ácido nucleico) necesario para alcanzar los 50 ng/µL en el volumen final de la reacción, según lo indica la cuantificación de los extractos y se completo el volumen final con agua libre de nucleasa.

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, 1 ciclo de 5 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 5 min a 72°C de elongación final y al terminar, se mantendrá a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

Tabla 7. Secuencia (5' - 3') específica para la detección de RoV humanos.

Cebador	Secuencia (5'–3')	Amplicón (pb)
RoV 1F	GGTTTAAAACGAAGTCTTC	1128
RoV 1R	CAGTCCAATCATGCCTGGTGGGA	
RoV 2F	GGATCAGAAATTCAGGTCGCTGGAT	381
RoV 2.1R	CGCATTTGGAAATAATGCTGC	
RoV 2.2R	ACATTGCGCAATAGAGTCTCAT	485

PCR anidadas

Para realizar las PCR anidadas se utilizó GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EEUU), se hará una mezcla maestra de un volumen final de 25 µL compuesta de la siguiente manera: 5.0 µL Buffer PCR 5X, 1.5 µL dNTPs 10 mM, 0.2 µL GoTaq® DNA Polymerase 5u/µL (1 u), 0.5 µL de los cebadores (25 µM), 4.0 µL de MgCl₂ 25 mM, 1.2 µL del producto final de la ICC-PCR (para AdV), ICC-RT-PCR (para EV), y RT-PCR (para RoV), los 12.6 µL restantes fueron completados con agua libre de nucleasas.

Para la amplificación 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 inicial del ADN, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 5 min a 72°C de elongación final.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% para AdV y 1.5% para EV y RoV, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), y luego, se visualizaron en un fotodocumentador BioDoc-It® 220 Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido) bajo luz ultravioleta (UV).

Estandarización para la secuenciación de AdV por PCR anidada y de EV por RT-PCR anidada

Se realizó la estandarización de la secuenciación, debido a que los tamaños de los productos finales de amplificación obtenidos en la segunda PCR para AdV y EV, 168 pb y 323 pb, respectivamente, son fragmentos pequeños de ADN, para utilizarlos directamente para la secuenciación. Por esta razón, fue necesario realizar la estandarización de ambos virus con cebadores distintos a los utilizados en las técnicas previamente descritas (Tabla 8 y Tabla 9), con tamaños de 688-821 pb (AdV) y 454, 457 y 758 pb (EV).

La estandarización para la secuenciación inició con AdV según protocolo establecido por Lu y Erdman (2006), utilizando muestras positivas provenientes de aislamientos en cultivo de células donado por (ICGES, a través de la MSc. Ilka Guerra) y de heces de niños con gastroenteritis donado por (HDN, a través del Dr. Julio Nieto), utilizando condiciones de 5.0 µL Buffer PCR 5X, 1.5 µL dNTPs 10 mM, 0.2 µL GoTaq® DNA Polymerase 5 U/µL (1 u), 0.5 µL de los cebadores (25 µM), 4.0 µL de MgCl₂ 25 mM, los 13.3 µL faltantes en la mezcla maestra, fueron completados con el volumen de ácido nucleico necesario para alcanzar los 50 ng/µL en el volumen final de la reacción, según lo indica la cuantificación de los extractos y agua libre de nucleasas.

Para la amplificación se utilizó el termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial de ADN, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 45°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 5 min a 72°C de elongación final y al culminar, se mantendrá a una temperatura de 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo. Se utilizó las secuencias de cebadores descrita en la Tabla 8. Para la segunda PCR, las condiciones de los reactivos, temperaturas y ciclajes de anidación fueron iguales a los de la primera PCR, solo se cambiaron los cebadores y se agregó a la mezcla 1.2 µL del producto final de la primera PCR para que sirviera de molde.

Tabla 8. Secuencia (5´- 3´) específica para la secuenciación de AdV humanos.

Grupo	Cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)
1	Adhex F1 (+)	TICTTTGACATICGIGGIGTICTIGA	Ad hexon 1-6 (HVR1-6)	764–896
	Adhex R1(-)	CTGTCTACIGCCTGRTTCCACA		
2	Adhex F2 (+)	GGYCCYAGYTTYAARCCCTAYTC		688–821
	Adhex R2 (-)	GGTCTGTCTICCCAGAGARTCIAGCA		

Se prosiguió con la estandarización de EV basándose en lo establecido por Oberste *et al.*, (2006), donde el control positivo fue la vacuna de virus vivo atenuado de virus de la Polio (PolioSabinTM) donados por el HDN. La RT-PCR se realizó utilizando el Kit de RT-PCR AccessQuick™ (Promega, EEUU). Se utilizaron tres juegos de cebadores (Tabla 9), y se realizó una variación en la concentración de MgCl₂, donde se implementó una curva de Mg utilizando diferentes concentraciones desde 2.5, 3.0, y 4.0 mM, con lo que se buscaba identificar si existe alguna dependencia de MgSO₄.

La reacción de RT-PCR tendrá un volumen final de 25 µL, de los cuales: 12.5 µL es de master mix (AccessQuick) 1X Buffer, 1.5 µL de MgSO₄ (25 mM), 0.5 mM de cada cebador (25 mM), 0.5 µL de RT (2.5 u). A los 10 µL restantes se

añadió el volumen de muestra (ácido nucleico) necesario para alcanzar los 50 ng/μL en el volumen final de la reacción, según lo indica la cuantificación de los extractos y se completo el volumen final de 25 μL con agua libre de nucleasas.

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, 1 ciclo de 2 min a 94°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94°C para la desnaturalización, 2 min a 48°C de hibridación, 1 min 30 seg a 68°C de elongación, 1 ciclo de 5 min a 68°C de elongación final y al completar, se mantendrá a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

Para el caso de la segunda PCR, se añadió 1.2 μL de la primera PCR y se utilizó condiciones de 5.0 μL Buffer PCR 5X, 1.2 μL dNTPs 0.5 mM, 0.2 μL GoTaq® DNA Polymerase 0.2 U/μL (1 u), 0.5 μL de los cebadores (25 μM), 3.0 μL de MgCl₂ 25 mM, 0.5 μL del producto final de la RT-PCR, los 14.1 μL faltantes en la mezcla maestra, fueron completados con agua libre de nucleasas. Para la amplificación se utilizó el termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 2 min a 94°C para la desnaturalización del ADN, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94°C para la desnaturalización, 2 min a 42°C de hibridación, 2 min a 68°C de elongación, 1 ciclo de 5 min a 68°C de elongación final y al terminar, se mantendrá a una temperatura de 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo. Se utilizó las secuencias de cebadores descritas en la Tabla 9.

Tabla 9. Secuencia (5´- 3´) específica para la secuenciación de EV humanos.

Grupo	Cebador	Secuencia (5´- 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)
1	PE1+	5'-TAYWYRMGGTTYGAYITIGARITAC	3´ VP1	
	PE1-	5'-TGKGAYTGRTAYCTIKYKGGRTARTA		
2	A+	5'-ATGTWYGYICCCICGGIGCNCC		454
	A-	5'-AYIGCICCISWITGYTGNCC		
	B+	5'-ATGTAYRTICCCICGGNGG		758
	B-	5'-TCNACIANICCGGICCYTC		
	C+	5'-ATGTAYRTICCCICGGIGCNCC		457
	C-	5'-GCITTITTITGRTGICCRAANCC		

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

DETECCION DE COLIFAGOS

El primer parámetro a evaluar en las muestras de bivalvos es la presencia de colífagos mediante la técnica de doble capa de agar donde se observó, los platos con unidades formadoras de placas (UFP) de lisis de manera total, parcial o nula, según la muestra analizada (Figura 13). Se determinó en un 87.8% (fi=79) de las muestras durante el periodo de estudio (Figura 14). Según la temporada de estudio, se detectó un 91.1% (fi=41), representando mayor presencia de colífagos para la temporada lluviosa en comparación con la temporada seca, en la cual se registró un 84.4% (fi=38) de presencia de colífagos de las muestras analizadas, N=45 por temporada (Figura 15). Durante los meses de inicio y cierre de muestreo de cada temporada (febrero y noviembre), se registraron los porcentajes más bajos de colífagos con 8.9% y 12.2%, respectivamente, en comparación del resto de los cuatro meses de estudio donde prevaleció la presencia de colífagos con un 16.7% (Figura 16). Los análisis de frecuencia absoluta en la detección de los colífagos según el género de bivalvo en estudio, indicaron la constante presencia de 100% de colífagos (fi= 30) para *A. tuberculosa*, seguido por el género de *Leukoma* sp. con un 90% (fi= 27) y un 73.3% para *Donax* sp. (fi=22) (Figura 17). El análisis de χ^2 ($\chi^2 = 29.965$) con un g.l = 1 ($p_{\text{value}} = 0.000000043982$), lo que indica es que la probabilidad de encontrar bivalvos en la naturaleza con presencia de colífagos es alta y a su vez, encontrar los bivalvos en su ambiente natural sin colífagos, es muy baja, por lo cual, es despreciable, confirmado por el análisis de Odd (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis estadístico de colífagos (χ^2 y Odd).

Colífago	n	Odd	χ^2	p
Presencia	79	1.000	29.965	4.40E-08
Ausencia	11	0.139		

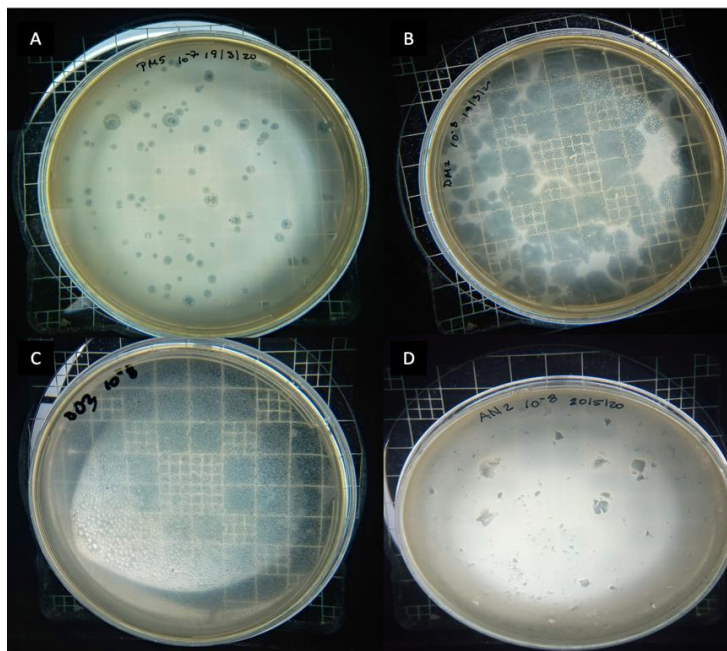


Figura 13. Platos de agar con UFP. A) UFP de colífagos de la muestra 5 de *Leukoma* sp. del mes de marzo, dilución 10^{-7} , temporada seca. B) UFP de colífagos de la muestra 2 de *Donax* sp. del mes de marzo, dilución 10^{-8} , temporada seca. C) UFP de colífagos de la muestra 3 de *Donax* sp. del mes de octubre, dilución 10^{-8} , temporada lluviosa. D) UFP de colífagos de la muestra 2 de *A. tuberculosa* del mes de noviembre, dilución 10^{-8} , de la temporada lluviosa.

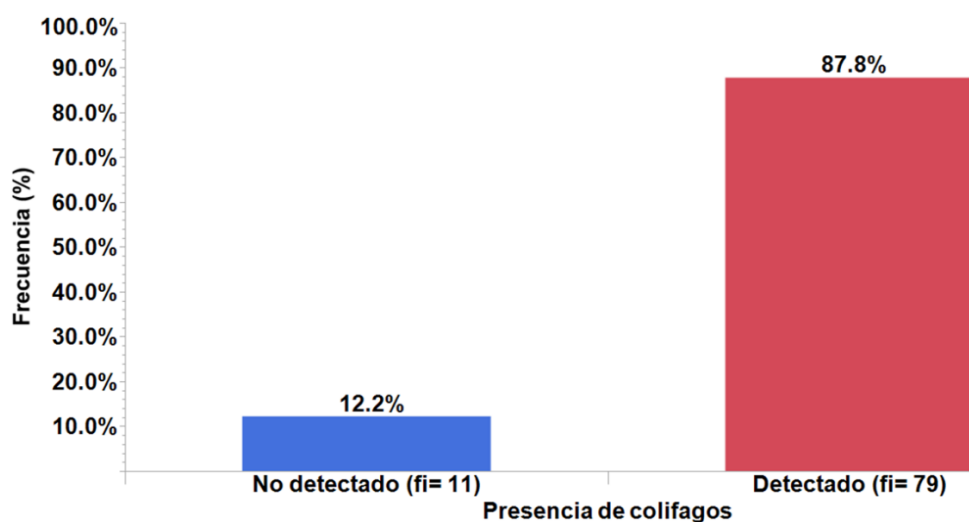


Figura 14. Porcentaje de presencia de Colífagos durante todo el periodo de estudio según frecuencia absoluta.

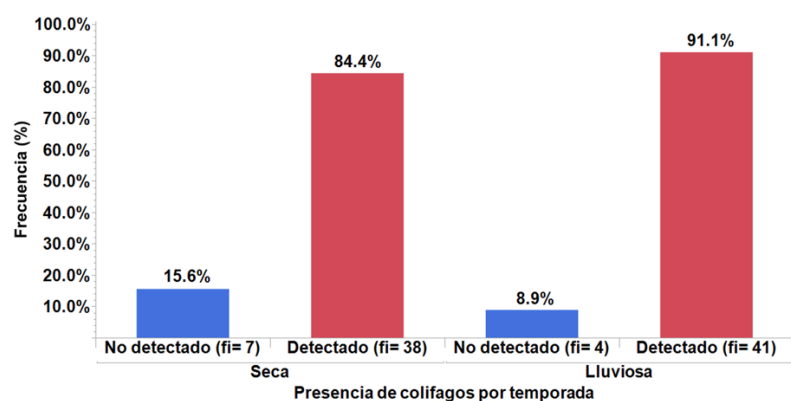


Figura 15. Porcentaje de presencia de Colifagos en las temporadas de estudio según frecuencia absoluta.

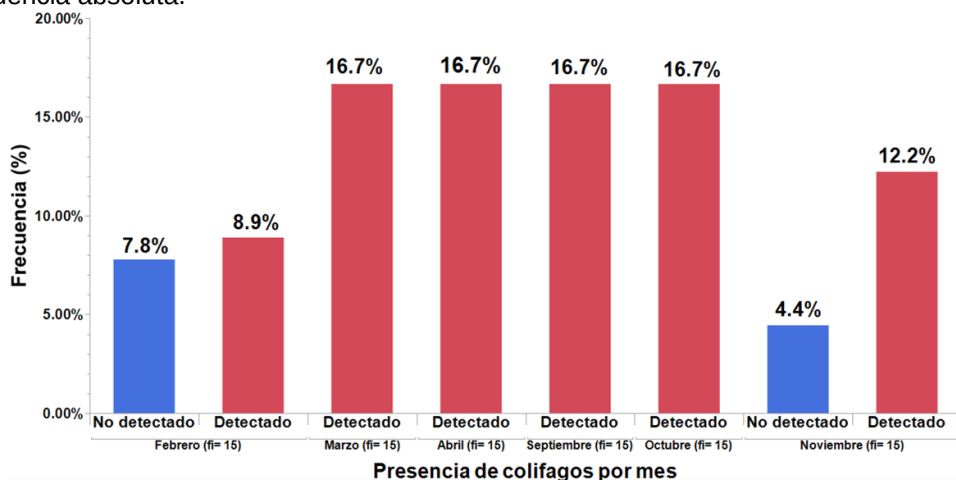


Figura 16. Porcentaje de presencia de Colifagos en los meses de estudio según frecuencia absoluta.

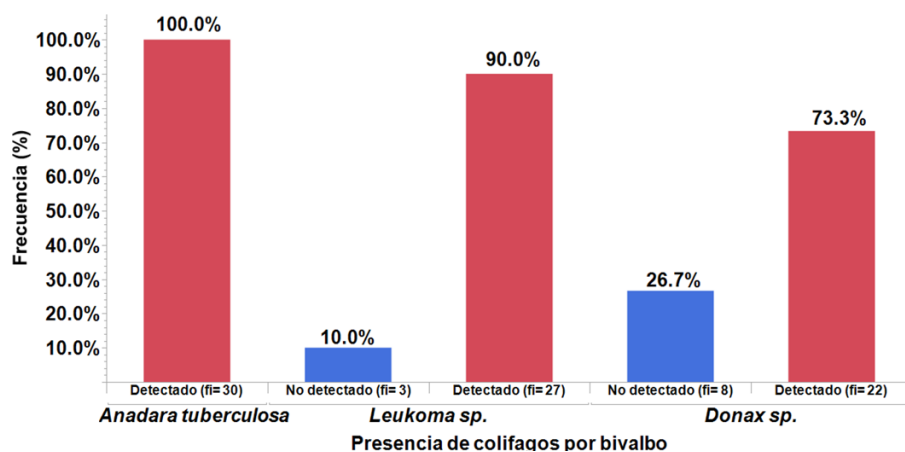


Figura 17. Porcentaje de presencia de Colifagos en los tres géneros de bivalvos en estudio según frecuencia absoluta.

AISLAMIENTO VIRAL

Otro aspecto evaluado fue el efecto citopático (ECP) en células Vero para determinar el aislamiento viral. Las células Vero, son células con alta permisibilidad para la infección de diversos virus de interés en salud pública. En este estudio, se utilizaron para la infección *in vitro* de las células Vero las muestras de los diferentes géneros de bivalvos a evaluar. De esta manera, se aumenta la sensibilidad en la detección de AdV y EV presentes en los diferentes géneros de bivalvos analizados y a su vez, se conoció la viabilidad de estos virus entéricos en las muestras. El comportamiento de la infección viral de las muestras de bivalvos fue agresivo hacia las células, se pudo observar que durante las primeras 24 h de infección, las 90 muestras presentaron ECP (Figura 18). Además, se detectaron 14 muestras pertenecientes a la temporada seca con 100% de ECP, observándose en estas muestras, que las células se levantaron en su totalidad. De estas 14 muestras, seis fueron colectadas en el mes de marzo, las cuales presentaron 100% de ECP y están relacionadas a *Donax* sp. y *Leukoma* sp., correspondiendo a 5 muestras y 1 muestra, respectivamente. Seguido por el mes de abril, con cinco muestras de *Donax* sp. y febrero, que presentó tres muestras con 100% de ECP, perteneciente a *Leukoma* sp. (2 muestras) y *Donax* sp. (1 muestra).

También, a las 24 h de infección, las 75 muestras restantes (30 muestras de temporada seca y 45 de temporada lluviosa), presentaron ECP entre un 30 - 80%. Al transcurrir 48 h de infección, se observaron 14 muestras con 80% de ECP, 13 muestras de la temporada seca y 1 de temporada lluviosa. Además, en este periodo de tiempo, se observó que las 62 muestras restantes, presentaron 100% de ECP, levantando las células en su totalidad. Una vez se obtuvo estos resultados, se realizó un segundo pasaje adquiriendo como resultado ECP de un 30 - 50% en las 90 muestras durante las primeras 24 h de incubación y en una segunda evaluación (48 h de incubación), se observaron un avance en los ECP de hasta el 75%, y a las

72 h de incubación, se observó el 97.8% (88/90) de las muestras analizadas con ECP, entre un 90 y 100%, procediendo al final, a clarificar y conservar las muestras a -80°C. Solo dos muestras del mes de febrero, correspondientes a la temporada seca, del género *Leukoma* sp., muestras 3 y 5, no presentaron ECP al transcurrir cinco días de incubación (Figura 19).

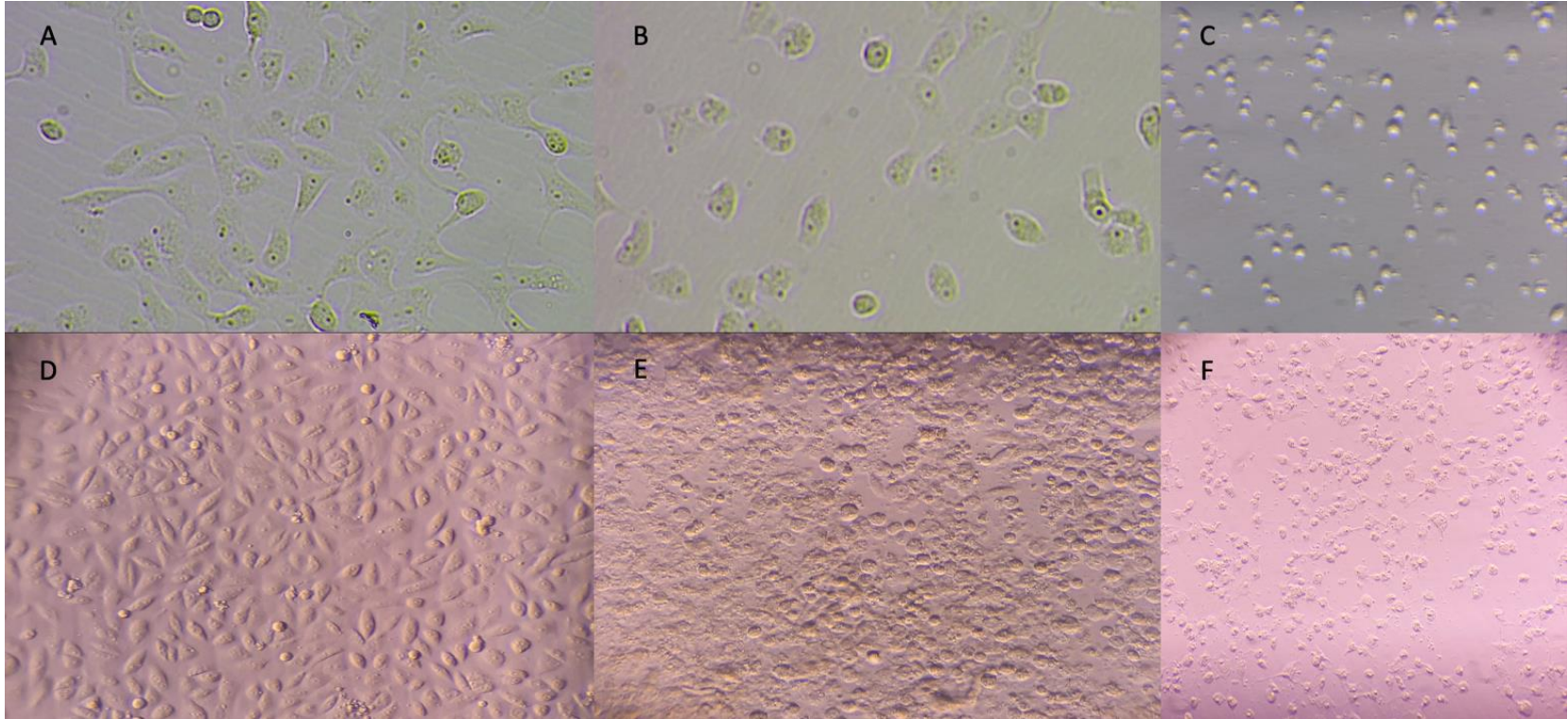


Figura 18. Aislamiento viral en células Vero de muestras de Bivalvos de importancia comercial. A) Control negativo. B) Primera infección, ECP con la muestra 2 de *Leukoma* sp. del mes de marzo, posterior a 1 h de la infección. C) Células Vero levantadas a las 24 h de la infección correspondientes a la muestra 2 del género *Leukoma* sp. D) Segundo pasaje, células infectadas con muestras después de 1 h de infección. E) ECP en las células Vero posterior a las 48 h de infección. F) Células Vero al transcurrir 72 h de infección.

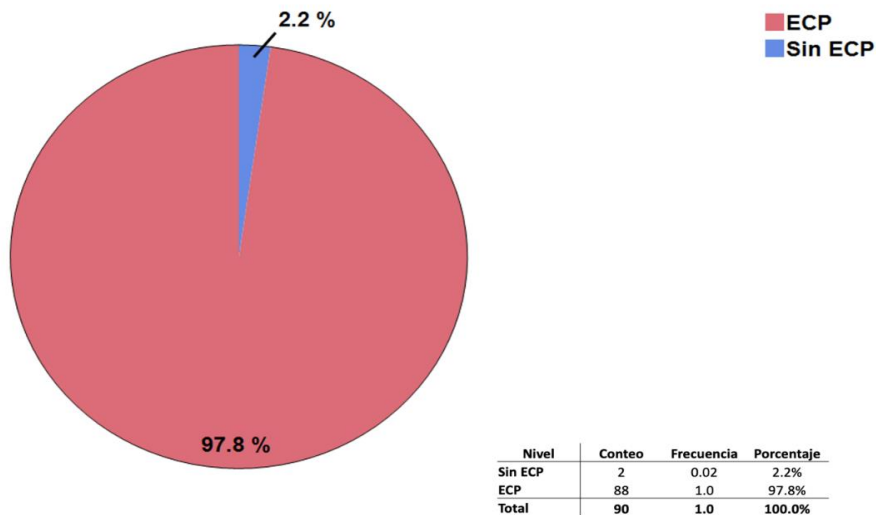


Figura 19. Porcentaje de ECP del segundo pasaje en las muestras de bivalvos según frecuencia absoluta.

DETECCION MOLECULAR

ESTANDARIZACION PARA LA DETECCION VIRAL DE AdV, EV Y RoV EN BIVALVOS

Se estandarizó la metodología para la detección de virus entéricos mediante las técnicas de PCR y RT-PCR anidadas. Primero, se estandarizó para la detección de AdV, dando como resultado la obtención de las bandas esperadas de aproximadamente 168 pb en dos muestras de los controles positivos para AdV y con los controles negativos de cada PCR (Figura 20).

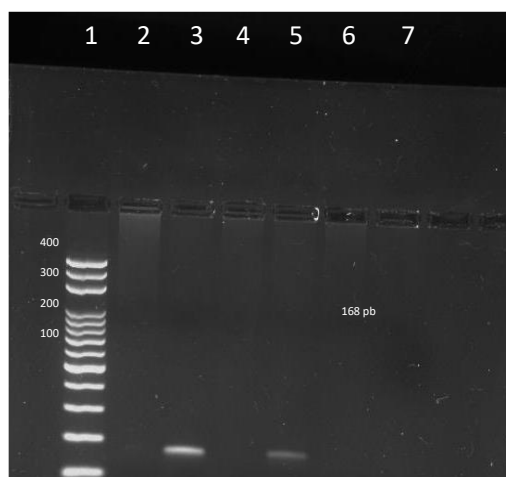


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la estandarización de AdV utilizando los controles positivos donados por el ICGES y el HDN. En la parte superior se indica el número de pocillo, ¹Marcador de peso molecular de 100 bp, ²AdV procedentes de células Vero pasaje 27 infectadas en LAMEXA, ³AdV procedente del ICGES producto del aislamiento viral de muestras respiratorias, ⁴AdV de procedencia desconocida, ⁵AdV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN, ⁶Control negativo de PCR, ⁷Control negativo PCR anidada.

Se prosiguió con la estandarización de EV, el control positivo fue la vacuna de virus vivo atenuado, virus de la Polio (PolioSabin™) donados por el HDN, obteniendo una banda de 323 pb tal como lo muestra la Figura 21A. Se volvió a repetir el ensayo con una variación en la concentración de MgCl₂, donde se implementó una curva de Mg utilizando diferentes concentraciones desde 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM, con lo que se buscaba identificar si existe alguna dependencia de la Taq ADN polimerasa por este compuesto para su debida amplificación. Finalmente, se obtuvo que para la amplificación de los controles positivos con los cebadores seleccionados, no afecta la variación de las concentraciones de Mg en la preparación de la mezcla maestra (Figura 21B).

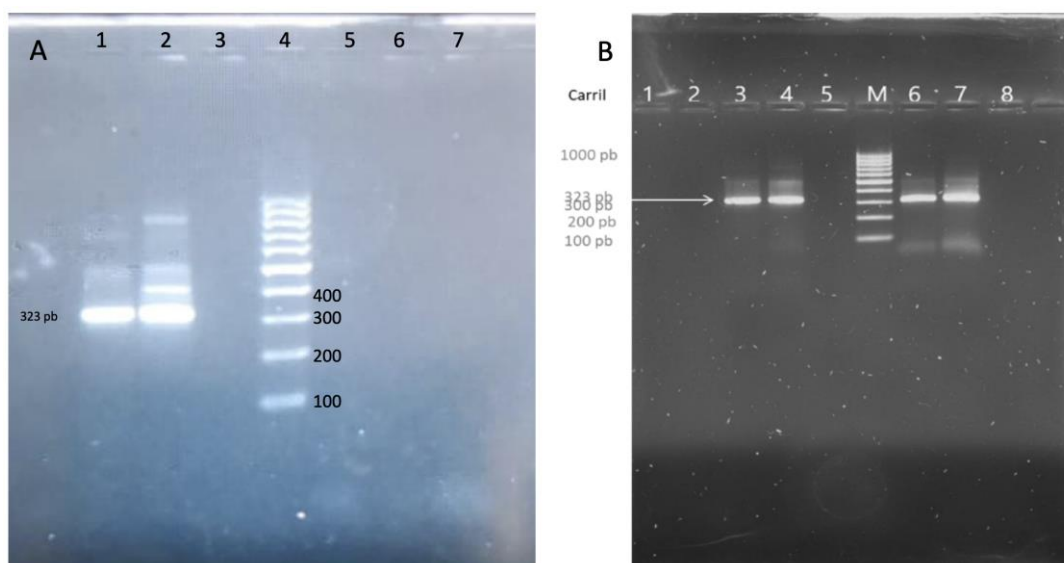


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la estandarización de EV humano utilizando los controles positivos donados por el HDN. A) ¹Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo A, ²Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo A, ³Control negativo del cebador del grupo A, ⁴Marcador de peso molecular 100 pb, ⁵Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo B, ⁶Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador del grupo B, ⁷Control negativo del cebador del grupo B. B) ³Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador seleccionado y una concentración de 2.5 MgCl₂, ⁴Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) con el cebador seleccionado y una concentración de 3.0 MgCl₂, ^mMarcador de peso molecular de 100 pb, ⁶Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) para el cebador seleccionado y una concentración de 3.5 MgCl₂, ⁷Control positivo de EV (vacuna PolioSabin) para el cebador seleccionado y una concentración de 4.0 MgCl₂.

La estandarización de RoV se realizó utilizando los controles positivos de muestras de heces de niños con gastroenteritis provenientes del HDN. Se logró la amplificación de los controles positivos obteniendo las bandas esperadas de 381 pb, en dos muestras positivas de RoV humanos (Figura 22).



Figura 22. ¹Marcador de peso molecular 100 pb, ³RoV procedente de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (vacuna Rotateg) con la secuencia 2.1, ⁴RoV procedente de la Universidad Nacional Autónoma de León, Nicaragua (vacuna Rotateg) con la secuencia 2.2. ⁵RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.10, secuencia 2.1, ⁶RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.10, secuencia 2.2, ⁷RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.2, secuencia 2.1, ⁸RoV procedente de heces de niños con gastroenteritis donadas por el HDN muestra 2.2, secuencia 2.2, ⁹Control negativo de RT-PCR secuencia 2.1 ¹⁰Control negativo de RT-PCR secuencia 2.2, ¹¹Control negativo de PCR secuencia 2.1, ¹²Control negativo de PCR secuencia 2.2.

Detección molecular de AdV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-PCR anidada

El primer grupo evaluado en este estudio fue el de AdV, cuya presencia se detectó en un 12% (11/90) de las muestras analizadas (Figura 23). En la temporada seca, se detectó en un 17.8% (8/45), mientras que, en la temporada lluviosa, se detectó solo en un 6.7% (3/45) (Figura 24). Los meses de estudios manifiestan un comportamiento constante en la detección de AdV, con excepción del mes de marzo, donde se detectó la frecuencia absoluta más alta, correspondiendo a un 5.6% (5/90) y el mes de octubre, donde no se registró presencia de AdV. Para los meses de febrero, abril, septiembre y noviembre, la detección de AdV fue de 1.1% (1/90), 2.2%

(2/90), 2.2% (2/90) y 1.1% (1/90), respectivamente (Figura 25). La detección de AdV en los diferentes géneros de bivalvos en estudio, registró su mayor porcentaje de 20.0% (6/30) en el género de *Donax* sp., seguido por el género *Leukoma* sp., con 13.3% (4/30) y *A. tuberculosa* con el menor porcentaje de infección de 3.3% (1/30) (Figuras 26 y 27).

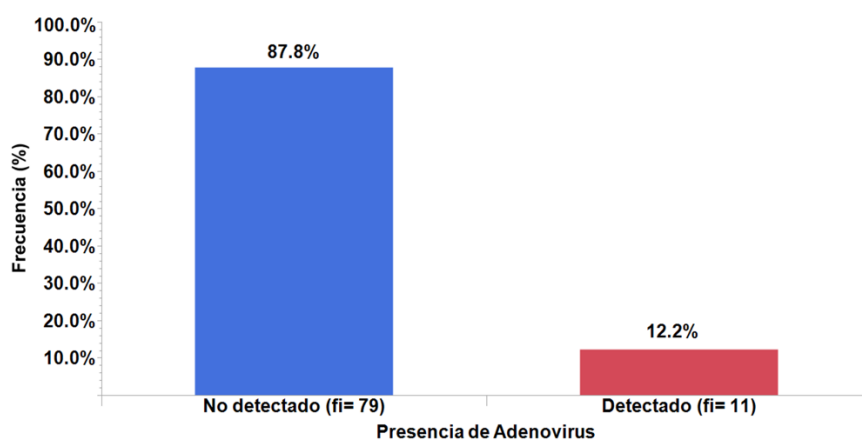


Figura 23. Presencia de AdV durante periodo de estudio según frecuencia absoluta.

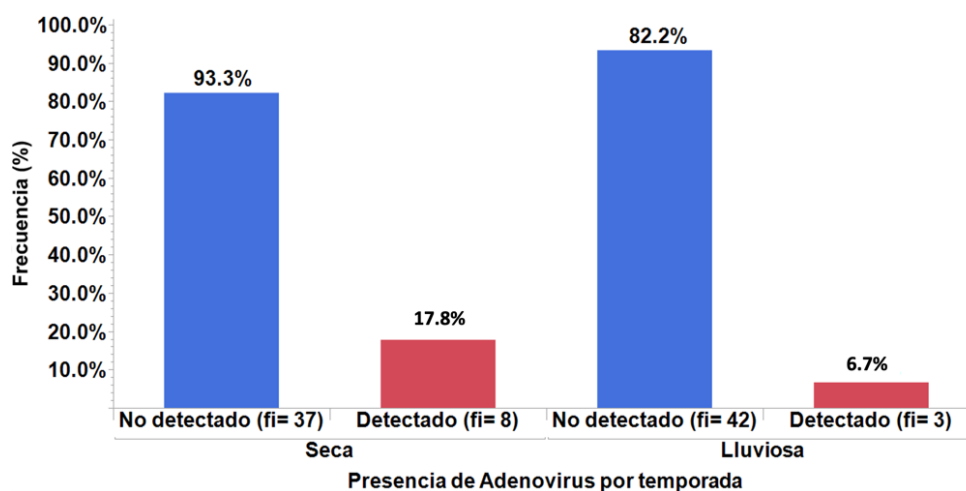


Figura 24. Presencia de AdV en las temporadas de estudios según frecuencia absoluta.

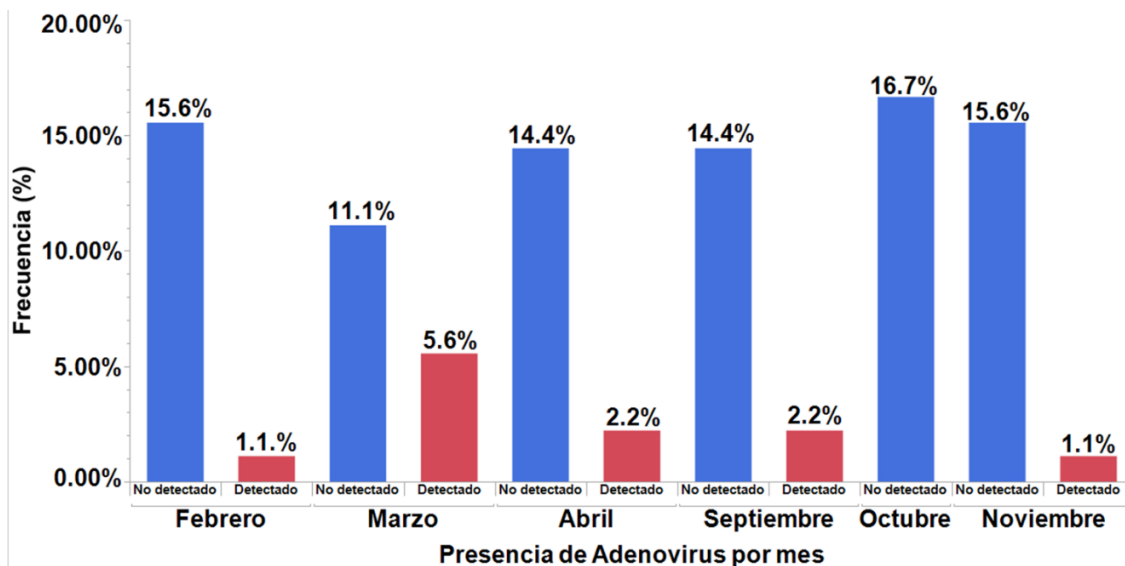


Figura 25. Presencia de AdV en los meses de estudios según frecuencia absoluta.

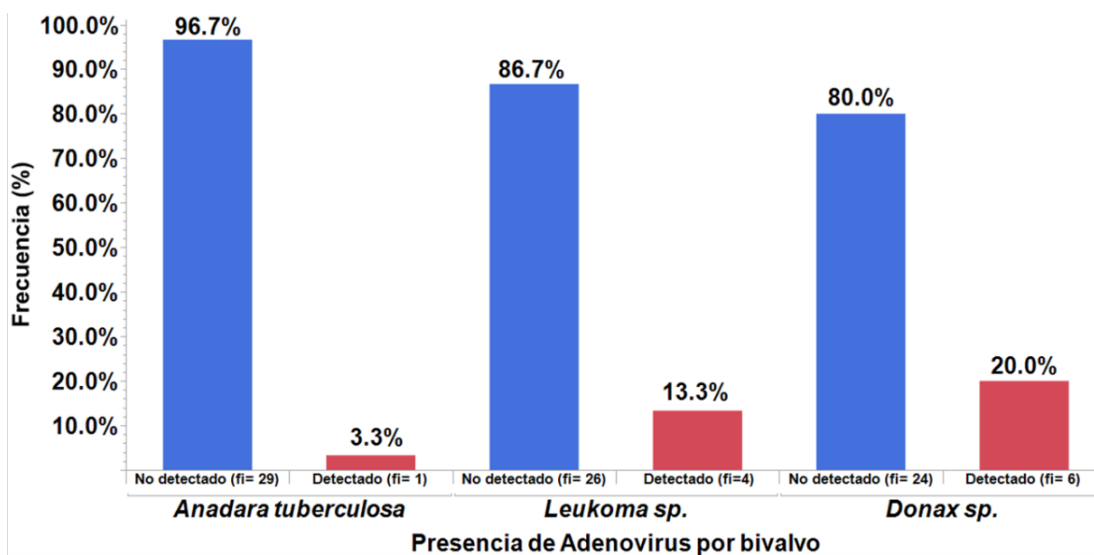


Figura 26. Presencia de AdV en los tres géneros de bivalvos en estudio según frecuencia absoluta

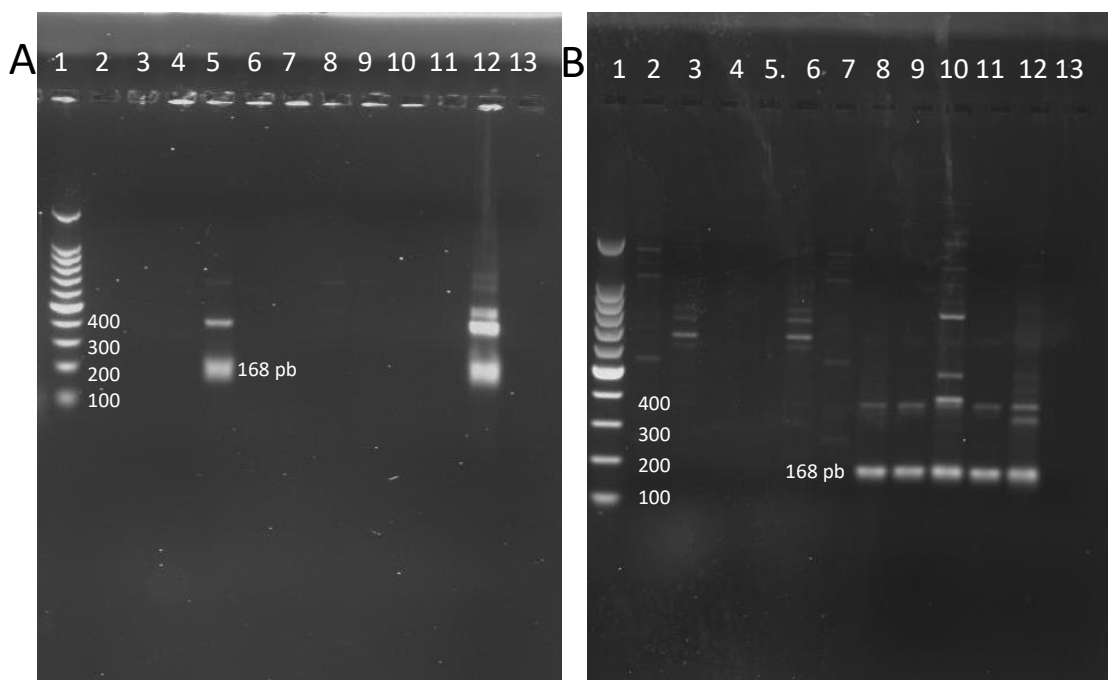


Figura 27. Detección de AdV en bivalvos visualizado en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 µg/mL de BrEt, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. A) ¹Marcador de peso molecular, ²DF1, ³DF2, ⁴DF3, ⁵DF4, ⁶DF5, ⁷AM1, ⁸AM2, ⁹AM3, ¹⁰AM4, ¹¹AM5, ¹²C+ AdV, ¹³C-. B) ¹Marcador de peso molecular, ²AA1, ³AA2, ⁴AA3, ⁵AA4, ⁶AA5, ⁷PA1, ⁸PA2, ⁹PA3, ¹⁰PA4, ¹¹PA5, ¹²C+ AdV, ¹³C-. ***DF (*Donax sp.* de febrero, seguido por el número de muestra), AM (*A. tuberculosa* de marzo, seguido por el número de muestra), AA (*A. tuberculosa* de abril, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma sp.* de abril, seguido por el número de muestra), C+ (control positivo AdV), C- (control negativo).

Detección molecular de EV en tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de ICC-RT-PCR anidada

El segundo grupo de virus estudiado en las muestras de bivalvos fue el de EV, cuya presencia se encontró en un 21.1% (19/90) para el periodo de estudio (Figura 28), representando un 28.8% (13/45) para la temporada seca, donde se obtuvo el porcentaje más alto en comparación con la temporada lluviosa que fue de un 13.3% (6/45) (Figura 29). En los meses de marzo y abril, se detectó la frecuencia absoluta más alta, correspondiendo a un 6.7% (6/90) y 5.6% (5/90), respectivamente. Además, el mes de noviembre, se

detectó el porcentaje más bajo con 1.1% (1/90), seguido por febrero y septiembre con 2.2% (2/90), y el mes de octubre con 3.3% (3/90) (Figura 30). Los géneros de bivalvos analizados presentaron diversos porcentajes de infección por EV. *Leukoma* sp., fue la que obtuvo la mayor tasa de infección, correspondiendo a un 30.0% (9/30), seguido por *Donax* sp., con un 20.0% (6/30) y *A. tuberculosa*, con el menor porcentaje de infección, con un 13.3% (4/30) (Figuras 31 y 32).

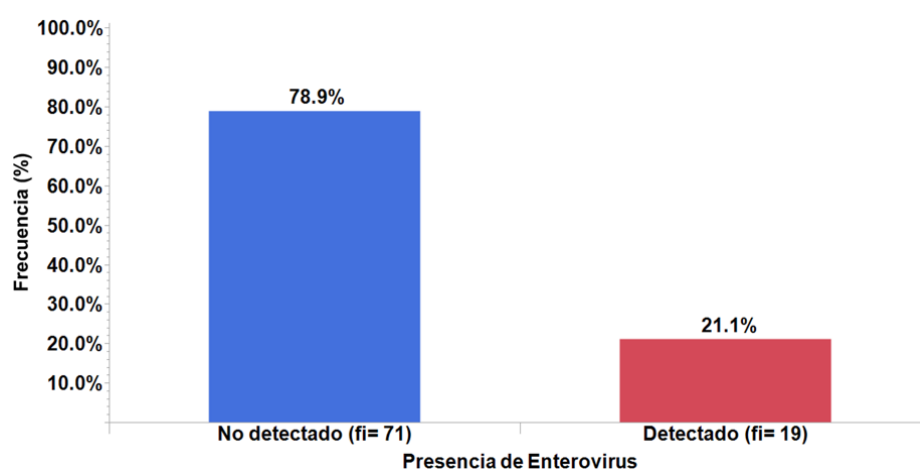


Figura 28. Porcentaje de presencia de EV en el periodo de estudio según frecuencia absoluta.

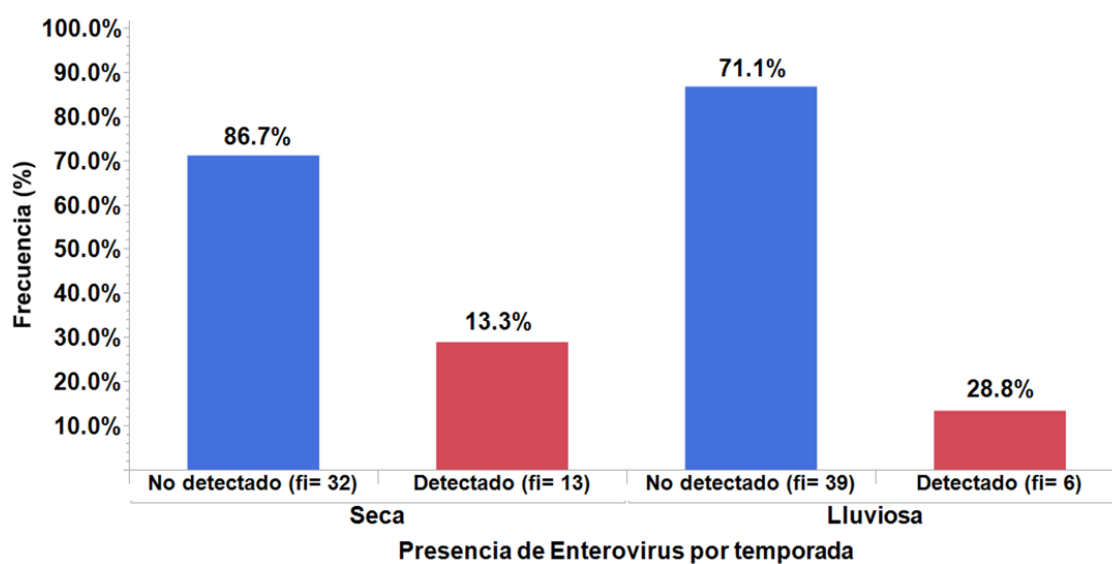


Figura 29. Porcentaje de presencia de EV en las temporadas de estudio según frecuencia absoluta.

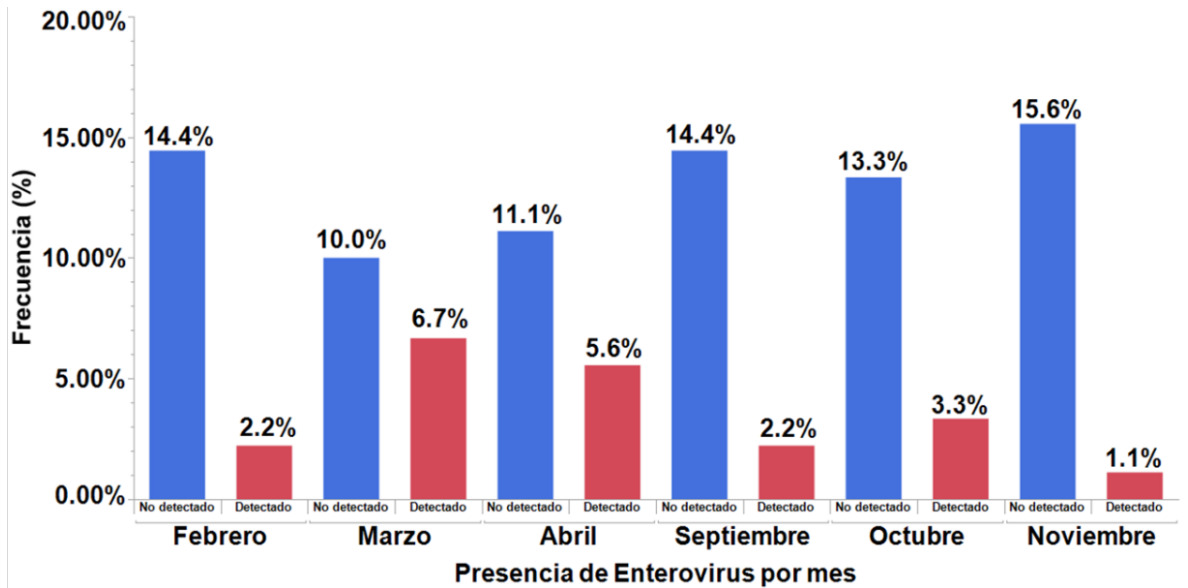


Figura 30. Porcentaje de presencia de EV en los meses de estudio según frecuencia absoluta.

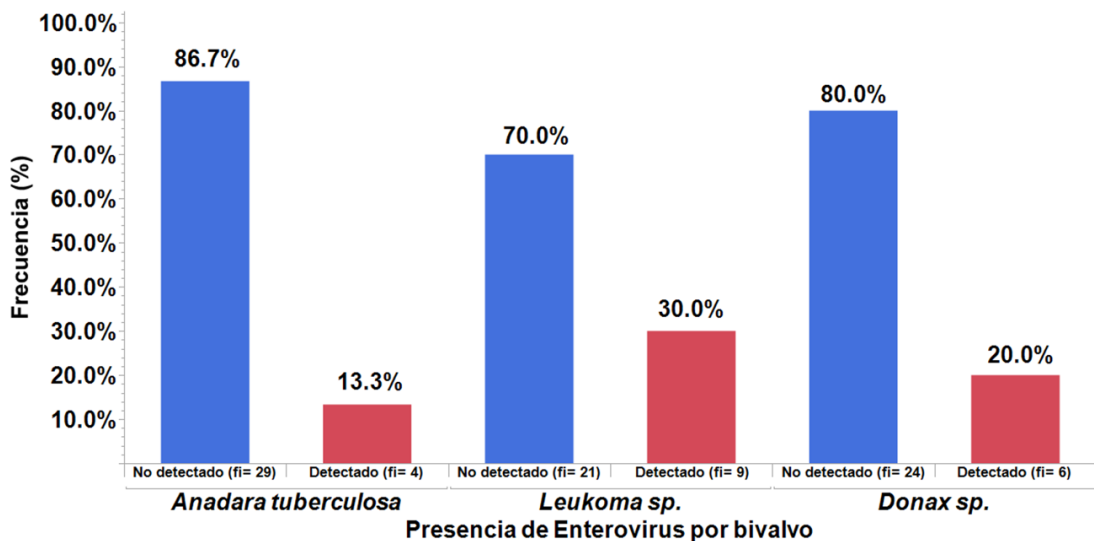


Figura 31. Porcentaje de presencia de EV en los géneros de bivalvos según frecuencia absoluta.

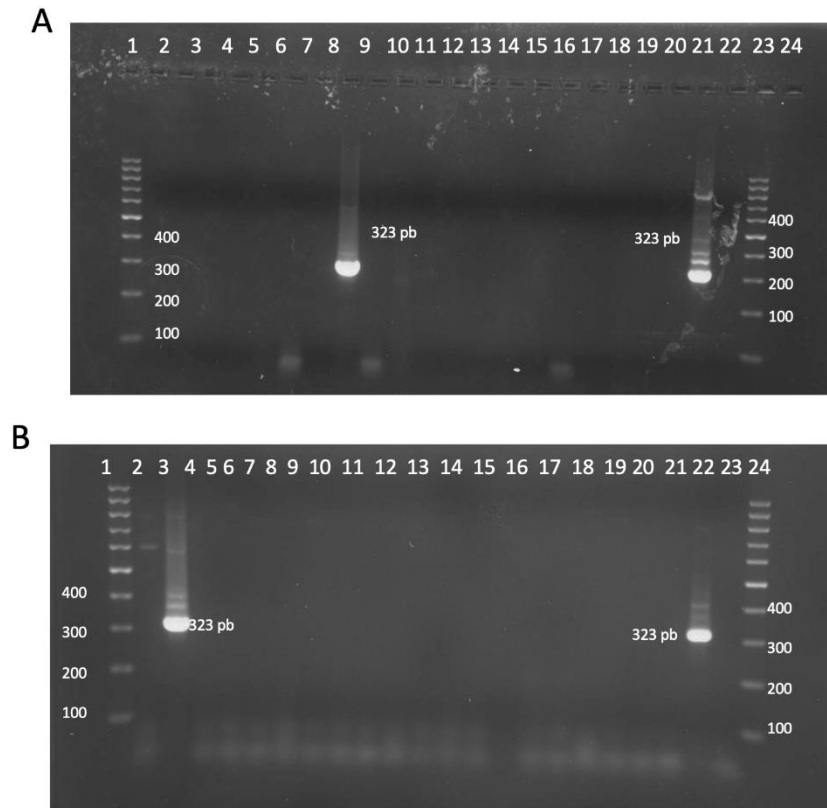


Figura 32. Detección de EV en bivalvos visualizado en gel de agarosa al 1.5% con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de BrEt, 8 μL de producto de la PCR y 2 μL de Loading buffer para la detección de EV en las muestras de bivalvos. **A.** ¹EM, ²AO1, ³AO2, ⁴AO3, ⁵AO4, ⁶AO5, ⁷PO1, ⁸PO2, ⁹PO3, ¹⁰PO4, ¹¹PO5, ¹²DO1, ¹³DO2, ¹⁴DO3, ¹⁵DO4, ¹⁶DO5, ¹⁷AN1, ¹⁸AN2, ¹⁹AN3, ²⁰AN4, ²¹AN5, ²²C+, ²³C-, ²⁴EM. **B.** ¹EM, ²DA1, ³DA2, ⁴DA3, ⁵DA4, ⁶DA5, ⁷AS1, ⁸AS2, ⁹AS3, ¹⁰AS4, ¹¹AS5, ¹²PS1, ¹³PS2, ¹⁴PS3, ¹⁵PS4, ¹⁶PS5, ¹⁷DS1, ¹⁸DS2, ¹⁹DS3, ²⁰DS4, ²¹DS5, ²²C+, ²³C-, ²⁴EM. ***EM (marcador de peso molecular, 100 bp), AO (*A. tuberculosa*. de octubre, seguido por el número de muestra), PO (*Leukoma* sp. de octubre, seguido por el número de muestra), DO (*Donax* sp. de octubre, seguido por el número de muestra), AN (*A. tuberculosa*. de noviembre, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. de abril, seguido por el número de muestra), AS (*A. tuberculosa*. de septiembre, seguido por el número de muestra), PS (*Leukoma* sp. de septiembre, seguido por el número de muestra), DS (*Donax* sp. de septiembre, seguido por el número de muestra), (C+ (control positivo EV), C- (control negativo)).

Detección molecular de RoV en muestras directas de tres géneros de bivalvos de importancia comercial con la técnica de RT-PCR anidada

El último grupo de virus evaluado fue RoV. Durante el tiempo de estudio, solo se detectó el 0.9% (1/90) de RoV en las muestras de bivalvos analizadas. La muestra detectada fue del género de *Leukoma* sp., en el mes de marzo durante la temporada seca (Figura 33).

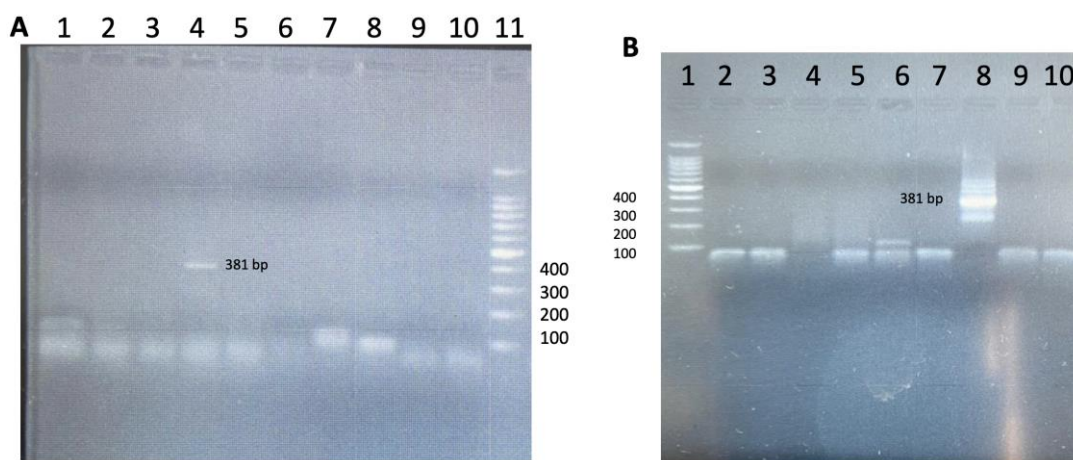


Figura 33. Detección de RoV en bivalvos visualizaados en gel de agarosa al 1.5%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer para la detección de RoV en las muestras de bivalvos. **A.** ¹PM1, ²PM2, ³PM3, ⁴PM4, ⁵PM5, ⁶DM1, ⁷DM2, ⁸DM3, ⁹DM4, ¹⁰DM5, ¹¹Marcador de peso molecular 100 bp. **B.** ¹Marcador de peso molecular 100 bp, ²PA5, ³DA1, ⁴DA2, ⁵DA3, ⁶DA4, ⁷DA5, ⁸C+, ⁹C- RT-PCR, ¹⁰C- PCR. ***PM (*Leukoma* sp. de marzo, seguido por el número de muestra), AM (*A. tuberculosa* de marzo, seguido por el número de muestra), DM (*Donax* sp. de marzo, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma* sp. de abril, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. de abril, seguido por el número de muestra), C+ (control positivo RoV), C- (control negativo).

DETECCIÓN DE COINFECCIÓN VIRAL EN BIVALVOS

La coinfección viral es la presencia simultánea de múltiples patógenos virales (más de uno) en una misma muestra. Con relevancia para este estudio, se pudo detectar la infección viral en un 18.9% (17/90) de las muestras analizadas, la coinfección viral en 6.7% (6/90) para AdV-EV y en 1.1% (1/90)

para EV-RoV. Es importante mencionar, que en el 73.3% (66/90) de las muestras analizadas, no se pudo detectar infección viral con los virus entéricos de interés (Figura 34).

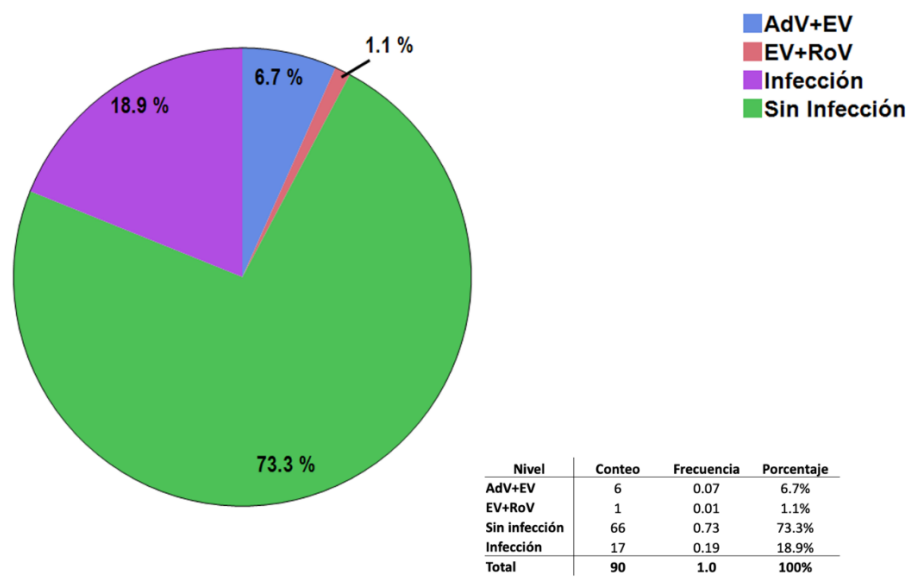


Figura 34. Porcentaje de infección y coinfección en los bivalvos analizados, según frecuencia absoluta.

El análisis de χ^2 ($\chi^2=10.3067$) con g.l. = 1 ($p_{\text{value}}=0.00133$), indica que existe el riesgo de encontrar bivalvos en la naturaleza con presencia de virus, pero con mayor probabilidad de encontrar bivalvos sin la infección de los patógenos virales de estudio, confirmado por el análisis de Odd (Tabla 8).

Tabla 11. Análisis estadístico de virus en bivalvos (χ^2 y Odd).

Virus en Bivalvos	n	Odd	χ^2	p
Presencia	24	1.000	10.3067	0.00133
Ausencia	66	2.750		

Estandarización para la secuenciación de AdV por PCR anidada y de EV por RT-PCR anidada

Se estandarizó la metodología para la secuenciación de AdV por PCR anidada y de EV por RT-PCR anidada. La estandarización se inicio con la secuenciación para AdV, dando como resultado la obtención de las bandas esperadas de 688-821 pb en los controles positivos para AdV utilizando diferentes concentraciones de $MgCl_2$, donde se observó que la intensidad de la banda amplificada es mejor utilizando la concentración de 4 mM de $MgCl_2$ (Figura 35).

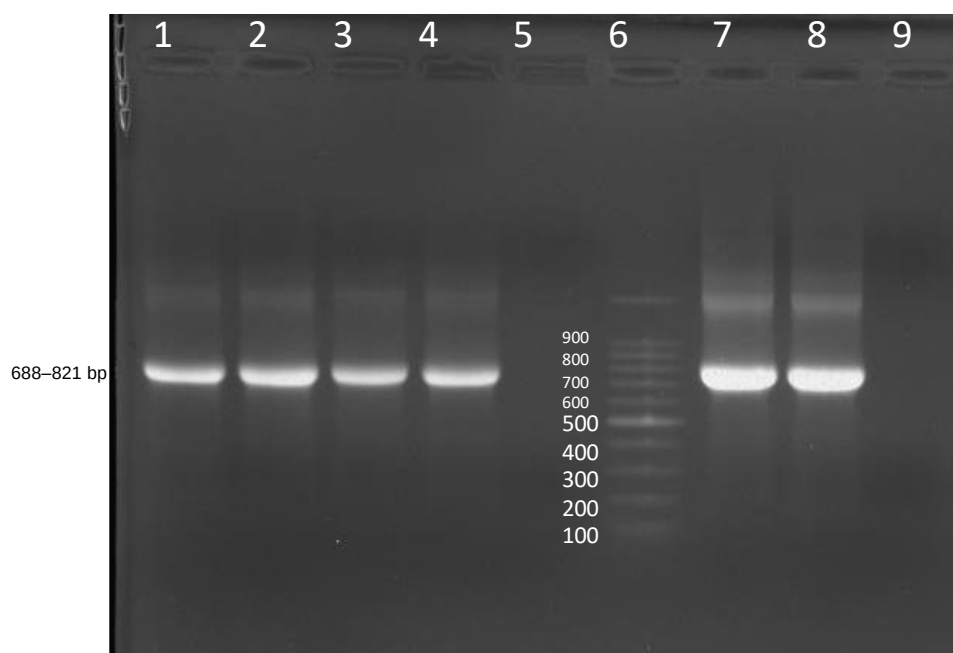


Figura 35. Estandarización para la secuenciación de AdV utilizando muestras de bivalvos previamente detectadas visualizadas en gel de agarosa al 2.0%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. ¹C+ para AdV concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ²C+ para AdV concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ³C+ para AdV concentración de 3.0 mM de MgCl₂, ⁴C+ para AdV concentración de 3.0 mM de MgCl₂, ⁵Carril vacío, ⁶Marcador de peso molecular 100 bp, ⁷C+ para AdV concentración de 4.0 mM de MgCl₂, ⁸C+ para AdV concentración de 4.0 mM de MgCl₂.

Se prosiguió con la estandarización de la secuenciación para EV, el control positivo fue la vacuna de virus vivo atenuado, Poliovirus (PolioSabin™) donados por el HDN, obteniendo una banda de 457 pb correspondiente al grupo de EV de la especie C. Se volvió a repetir el ensayo con una variación en la concentración de MgCl₂, donde se implementó una curva de Mg utilizando diferentes concentraciones desde 2.0, 3.0 y 4.0 mM, con la que se buscaba identificar si existe alguna dependencia de la Taq ADN polimerasa por este compuesto para su debida amplificación. Finalmente, se obtuvo que para la amplificación de los controles positivos con los cebadores seleccionados, la variación en las concentraciones de MgCl₂ afecta la preparación de la mezcla maestra, tal como se observa en la (Figura 36), donde solo se detecta amplificación con la concentración de 3.0 MgCl₂.

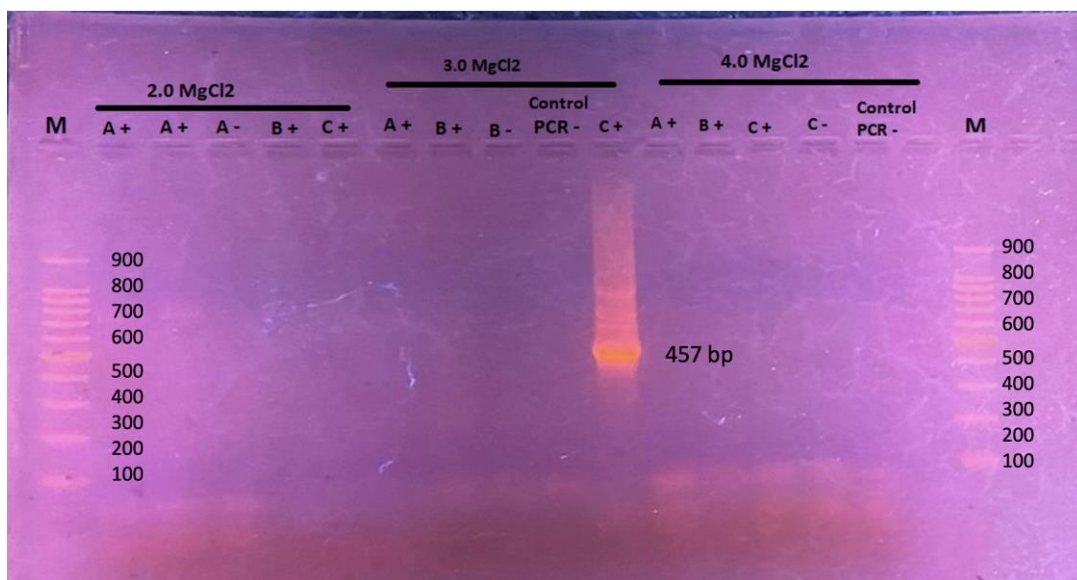


Figura 36. Estandarización para la secuenciación de EV utilizando muestras de bivalvos previamente detectadas visualizadas en gel de agarosa al 2.0%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt), 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de Loading buffer. ^M Marcador de peso molecular, ^{A+}C+ para EV con cebadores del grupo A concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{A-}C- para EV con cebadores del grupo A concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{B+}C+ para EV con cebadores del grupo B concentración de 2.0 mM de MgCl₂, ^{C+}C+ para EV con cebadores del grupo C concentración de 2.0 mM de MgCl₂. *** Cada sección se repite cambiando las concentraciones de MgCl₂.

Una vez estandarizados la metodología a implementar se procedió a la amplificación con las muestras que previamente fueron detectadas para la infección de AdV y EV. Las muestras detectadas con AdV no se observó bandas en los pesos estandarizados (688-821 pb). Las muestras detectadas con EV observamos bandas inespecíficas en algunas de las muestras detectadas con EV. Estas fueron enviadas para la secuenciación pero estas muestras no cumplían con la calidad y cantidad aceptadas. Por esta razón, no se logró obtener la secuenciación para los análisis filogenéticos.

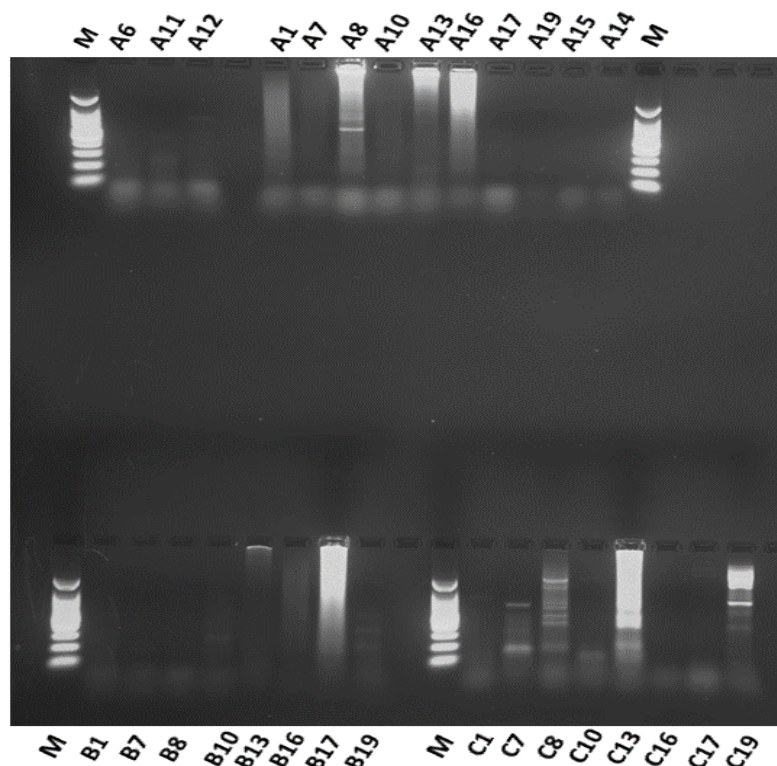


Figura 37. Amplificación para la secuenciación de EV en muestras de bivalvos previamente detectadas con la infección de EV. ^MMarcador de peso molecular, ^{A6}PM4, ^{A11}PA1, ^{A12}PA4 ^{A1}DF3, ^{A7}DM2, ^{A8}DM3, ^{A10}AA3, ^{A13}DA2, ^{A16}PO1, ^{A17} PO3, ^{A19}PN1, ^{A15}PS5, ^{A14}PS1, ^{B1}DF3, ^{B7}DM2, ^{B8}DM3, ^{B10}AA3, ^{B13}DA2, ^{B16}PO1, ^{B17} PO3, ^{B19}PN1, ^{C1}DF3, ^{C7}DM2, ^{C8}DM3, ^{C10}AA3, ^{C13}DA2, ^{C16}PO1, ^{C17} PO3, ^{C19}PN1. ***PM(*Leukoma* sp. mes de marzo, seguido por el número de muestra), PA (*Leukoma* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), DF (*Donax* sp. mes de febrero, seguido por el número de muestra), DM (*Donax* sp. mes de marzo, seguido por el número de muestra), AA (*A. tuberculosa* mes de abril, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), PO (*Leukoma* sp. mes de octubre, seguido por el número de muestra), PN (*Leukoma* sp. mes de noviembre, seguido por el número de muestra), DA (*Donax* sp. mes de abril, seguido por el número de muestra), las letras A, B, C, son los grupos de cebadores.

DISCUSIÓN

La demanda mundial ha sido el principal factor para el aumento en la producción de moluscos bivalvos. En 1950, la producción de este recurso marino fue aproximadamente de 1 millón de toneladas y para el 2015, alcanzó 16.1 millones. La comercialización de este recurso de formas diferentes como, por ejemplo, frescos, refrigerados, congelados o enlatados, donde el valor del comercio de bivalvos vivos, frescos y refrigerados se situó en 1200 millones de USD en 2015 (FAO y OMS, 2021). Esto se debe a que los bivalvos son uno de los recursos marinos más importantes en la dieta de los seres humanos, por su bajo contenido de grasas y alto contenido de proteínas de fácil digestión, y además, son fuentes de ingresos económicos para los pescadores artesanales de la zona de recolecta (Córdoba *et al.*, 2010).

Sin embargo, por la naturaleza de este recurso marino, los bivalvos, acumulan diversos agentes como virus, bacterias, protozoos, sustancias orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el agua que filtran, convirtiendo a los moluscos en vectores de enfermedades transmitidas por alimentos, contribuyendo a un problema significativo de salud pública a nivel mundial (Bosch *et al.*, 2016). Dado que en Panamá no existe estudio sobre la presencia de colífagos en bivalvos y solo existe un estudio previo sobre la detección de Enterovirus y Virus de Hepatitis A en bivalvos (Martínez-Torres *et al.*, Datos no Publicados), se analizó la presencia de colífagos en muestras de bivalvos como una alternativa adecuada de indicador de contaminación fecal. Además, se analizó la presencia de AdV, EV y RoV en tres bivalvos (*A. tuberculosa*, *Leukoma* sp., y *Donax* sp.) de importancia comercial en Panamá, para conocer la posible infección por estos virus patógenos, debido al consumo directo por la población de estos recursos marinos.

Para la detección de estos microorganismos patógenos transmitidos a través de la ruta fecal-oral, se ha utilizado indicadores de contaminación fecal bacterianos, como la metodología estándar. Pero la historia de los diferentes

brotes infecciosos de etiología vírica en ausencia de las bacterias indicadoras de contaminación fecal, han llevado a evaluar otros microorganismos más apropiados para predecir el riesgo a la exposición a virus entéricos (FAO y OMS, 2021; Barrios y Mbayed, 2019). Los fagos se han propuesto como indicadores potenciales de virus entéricos humanos en agua de consumo humano, en aguas regeneradas para el riego agrícola, entre otros usos del agua (Directiva de la Unión Europea 2020/2184, 2020; Reglamento de la Unión Europea 2020/741, 2020; Campos-Pinilla *et al.*, 2008; Paz-Y-Miñoz *et al.*, 2003) y los EEUU, es el único país de América que utiliza la detección y enumeración de fagos como herramienta reguladora en la producción de mariscos (Saucedo-Urriarte *et al.*, 2017), por su similitud en morfología y su dinámica de supervivencia con los virus entéricos (IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, 1991). Por esta razón, en este estudio, se ha implementado la detección de colifagos como línea base para futuros estudios y utilizarlos como indicadores de contaminación viral en las zonas de producción de los bivalvos en Panamá.

Se determinó una presencia incontable de UFP/mL a una dilución de 10^{-8} en las muestras analizadas, lo que indica la presencia elevada de bacteriófagos en las muestras de bivalvos, siendo estos resultados similares a investigaciones previas (Hartard *et al.*, 2018; Hartard *et al.*, 2016; Gomes, 2013; Doré *et al.*, 2000). Los resultados de Doré *et al.* (2000), son muy parecidos a los de este estudio, donde se detectaron bacteriófagos con niveles que superan las 1000 UFP/mL en 100 g de bivalvo, asociándose a una alta contaminación fecal de la zona de producción de estos recursos marinos. Hartard *et al.*, (2018), Hartad *et al.*, (2016), Gomes (2013) y Doré *et al.* (2000), indican que la contaminación por bacteriófagos presenta una marcada estacionalidad en invierno con alto índice de detección, pero estando ausente o no en gran medida durante los meses de verano, datos que difieren con los de este estudio, donde no se observó una estacionalidad marcada en los meses analizados. Hartard *et al.* (2018), Hartard *et al.* (2016)

y Doré *et al.* (2000), han relacionado la contaminación con bacteriófagos con los calicivirus, donde el 13.5%, 44.0%, 62.0%, de las muestras analizadas respectivamente, fueron positivas para alguno de estos virus, durante los meses de invierno, a pesar de cumplir con los parámetros de control de contaminación fecal, disponibles para la venta de estos recursos alimenticios.

Estos reportes son similares a los obtenidos en este estudio, donde se observa la presencia de colifagos de manera incontable, reportando la presencia de EV, AdV y RoV en las muestras de bivalvos analizadas. Además, estas muestras se analizaron en otro estudio, para evaluar la calidad sanitaria de las zonas de producción, midiendo los indicadores de contaminación fecal según el Codex Alimentario. Para la zona de Chame se categorizó como zona A en ambas temporadas de muestreo, el área de Bique se categorizó como zona A (temporada seca) y zona B (temporada lluviosa), y Chinina para la temporada seca pertenece a la categoría C y la temporada lluviosa categoría B. Se analizaron para *Vibrios spp.* y *E. coli* dando como resultados, que no existe una asociación entre los indicadores de contaminación fecal con la presencia de *Vibrios spp.*, y con *E. coli* (Palacios *et al.*, Datos no publicados). Estos datos indican que los indicadores de contaminación fecal no son un buen indicador de contaminación viral difiere a los reportados por Le Guyader *et al.* (2001) y Croci *et al.* (2000), donde indica que los fagos no parecen ser un buen indicador de contaminación viral, a diferencia de lo que se vio en este estudio. Le Guyader *et al.* (2001), reportaron la presencia de Enterovirus, Norovirus, Astrovirus y Rotavirus en los bivalvos para comercialización, tanto en las áreas aptas para el consumo sin proceso de depuración, como en áreas no aptas para la comercialización. Encontrándose adicional, al virus de la hepatitis A (HAV), donde la presencia de fagos eran mínimas al igual que las bacterias indicadoras de contaminación fecal. También, Croci *et al.* (2000), obtuvieron en los resultados de su investigación, donde había ausencia de

bacteriófagos en las muestras de bivalvos analizadas y además, presentaron parámetros bacteriológicos de indicadores de contaminación fecal aceptables, según las normativas establecidas para la comercialización del producto, la presencia de EV y HAV, sin importar la estacionalidad en el muestreo, también muy parecido a lo encontrado en la misma zona de este estudio por Martínez-Torres *et al.* (Datos no Publicados), donde en una de las especies de bivalvos analizadas (*A. tuberculosa*), se observó la presencia de HAV sin importar la estacionalidad y con los parámetros de contaminación fecal aptos para consumo humano.

Gomes (2013), obtuvo UFP/mL de bacteriófagos en muestras de bivalvos entre las diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} , siendo las diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} las medias aptas, para la cuantificación de bacteriófagos, donde en las diluciones entre 10^{-7} y 10^{-9} , no se observó UFP/mL, siendo estos resultados diferentes a los obtenidos en este estudio, donde se observó UFP/mL de bacteriófagos incontables a una dilución de 10^{-8} , siendo la dilución máxima de este estudio.

Los fagos cada vez demuestran su capacidad para ser considerados como un indicador de contaminación viral entérico, además, de demostrar su similitud en morfología, comportamiento bajo diversas condiciones ambientales como estacionalidad, temperatura, pH, supervivencia (Leduc *et al.*, 2020; Hartard *et al.*, 2018). Se ha demostrado que los colífagos somáticos y bacteriófagos específicos para humanos como *fragilis* GB124, que tienen un fuerte valor predictivo para la presencia de AdV (F y G) en ostras según análisis de coeficiente de correlación (Olalemi *et al.*, 2016). Reportes demuestran la capacidad de los fagos GB124 y bacteriófagos de ARN específicos de F (fago F-ARN) para predecir, también, la presencia de NoV en mejillones y ostras (Lowter *et al.*, 2019; Olalemi, 2015; Trajano, 2013). La eliminación de virus entéricos como la del AdV humanos, es similar a lo observado en los diferentes tipos de fagos, a diferencia de los coliformes termotolerantes o fecales, que en el proceso de eliminación es eficaz, en los

sistemas de purificación dentro de las plantas de tratamiento de aguas residuales, sugiriendo que los fagos son mejores indicadores del destino de los patógenos virales, porque desempeñan un papel útil como futuros indicadores de contaminación viral por su similitud con estos (Dias *et al.*, 2018).

A continuación, se analizó la posible presencia de virus entéricos en las muestras mediante ensayos de cultivo celular para el aislamiento viral, bajo la observación de actividad de ECP. Estos ensayos han demostrado ser eficientes tanto para detectar la presencia de estos virus como para su propagación (Ponce *et al.*, 2021; Dilnessa y Zeleke, 2017). Los resultados observados en este estudio, muestran que las células Vero infectadas con las muestras de bivalvos analizadas, presentaron una gran actividad de ECP durante las 24 h (100% de las muestras con positividad), datos que contrastan con los reportados por Soler *et al.* (2009), donde reportaron que no hubo ECP en ninguna de las células implementadas [células de rabdomiosarcoma (RD), Carcinoma laríngeo (Hep-2), Vero y L recombinante de ratón que expresan el receptor para poliovirus humano (L20B)], solo se observó ECP, en los controles positivos de EV humanos. Ponce *et al.* (2021), consideran que las células Vero es una línea con baja sensibilidad para el crecimiento de virus entéricos, lo que contrasta por lo observado en este estudio, donde se obtuvo un 100% de ECP a las 24 h de infección.

La técnica de cultivo celular es el “estándar de oro” para la virología, es costosa y en ocasiones, un número significativo de muestras dan falsos negativos (Saavedra *et al.*, 2012; Peláez *et al.*, 2010). La posibilidad de aislamiento de virus entéricos de bivalvos es baja, manteniendo una variación del 34 al 50%, pudiendo estar vinculado a la calidad del agua y la presencia de compuestos orgánicos que pueden inhibir a las partículas virales, los compuestos citotóxicos capaces de interferir con la absorción de los virus a las células (Herrero *et al.*, 1999).

Sin embargo, pueden existir otros virus patógenos en la muestra que causen este ECP, por lo que se procedió a realizar ensayos de detección mediante ICC-PCR e ICC-RT-PCR anidadas específicos para cada uno de los virus a analizar en este estudio, AdV y EV, respectivamente. Para AdV, se observó 12% de positividad a nivel absoluto (11/90), pero en la temporada seca, se detectó un 17.8% (8/45) y en la temporada lluviosa, un 6.7% (3/45). Estos resultados indican la presencia AdV en las muestras de bivalvos analizadas, resultados similares a los reportados por Fiorito *et al.* (2021), donde observaron una alta concentración de AdV en las muestras de bivalvos y también, por Keller *et al.* (2019), donde detectaron AdV en muestras de bivalvos en zonas de manglar en el sureste de Brasil. Además, Vos y Knox (2018), detectaron AdV humano D17 en mejillones colectados en el estuario del río Swartkops en Port Elizabeth, Sudáfrica. Pero difiriendo por lo reportado por Macaluso *et al.*, (2021), donde no detectaron presencia de AdV a lo largo de la cadena de producción y distribución de mariscos en Sicilia. En este estudio, se observó la presencia de AdV a lo largo del periodo de estudio, indicando que es un virus que se puede encontrar presente todo el año, con poca o nula influencia por la estacionalidad (seca-lluviosa), similar a lo reportado por Nour *et al.* (2021) y Keller *et al.* (2019), donde detectaron AdV en las cuatro estaciones (invierno, primavera, verano y otoño), evidenciando su prevalencia y sin ser afectado por las estaciones climáticas (Keller *et al.* 2019). Además, presentaron una alta estabilidad, detectándose la presencia de AdV post-depuración, en aquellos sistemas que aplican este mecanismo para la eliminación de las bacterias indicadoras de contaminación fecal (Rodriguez-Manzano *et al.*, 2014). También, se observó en este estudio, que en temporada lluviosa, la tasa de positividad en las muestras analizadas disminuyeron, similar a los encontrado en este estudio y difiriendo estos datos con los datos obtenidos en Italia y Taiwan, donde la presencia de AdV aumento significativamente, inmediatamente después de los eventos de lluvias; lo que puede estar influenciado por la precipitación de

la temporada, lo que trae consigo, la inestabilidad en el medio acuático, causando variaciones en la composición microbiana, incluidos los patógenos (Shih *et al.*, 2021; Fusco *et al.*, 2019).

Esta constante presencia de AdV en los bivalvos, pueden estar relacionada, a la descarga de aguas residuales no tratadas a la que están sometidos los recursos hídricos, donde en un estudio se reportó la presencia de AdV en 81% (17/21) de aguas residuales crudas y 33% (7/21) en efluente tratados, pero en agua de río 13 muestras, agua potable y agua ultrafiltrada (n=28), no se detectó AdV (Laconelli *et al.*, 2017). Por otro lado, La Rosa *et al.* (2017), reportaron una correlación con la presión antropogénica, donde las áreas urbanas e industriales fueron las más contaminadas, con un 75 a 100% de positividad para algún virus entérico, las áreas agrícolas menos contaminadas, con el 50% de las muestras positivas y en zonas prístinas, no se detectó presencia de virus entéricos. La presencia de AdV fue de 21.6% (7 muestras positivas), con mayor presencia en los meses de primavera (marzo/abril) (La Rosa *et al.*, 2017). Además, se puede demostrar el impacto de la contaminación antropogénica sobre los recursos marinos, tanto de uso para consumo (bivalvos) como en áreas recreativas, aportando carga viral al ambiente, siendo una fuente de infección para las personas que acceden a los diversos recursos (Gularte *et al.*, 2019; Ghosh *et al.*, 2019). Un estudio realizado en Brasil, reportó la presencia de dos grupos de AdV (C y F) en bivalvos (*Donax hanleyanus*), donde se identificó el grupo AdV-C con un 24% (10/42), agua de mar con un 31% (13/42) solo para AdV-C y en las muestras de sedimentos, con un 19% (8/42), mientras que en la microcapa de la superficie del agua de mar, se observó un 24% (10/42) de positividad para AdV-C, mientras que para AdV-F, fue de 1.25% de una N = 160 (Gularte *et al.*, 2019).

Los bivalvos representan un riesgo significativo a la salud pública con respecto a la inocuidad alimentaria, observándose en nuestros datos, la presencia de AdV en todos los meses de estudio y en todas las zonas de

producción, de los diferentes géneros de bivalvos analizados. Hernroth y Allard (2007), realizaron ensayos para estudiar la persistencia de AdV viable tipo 35 durante 70 días, con contaminación controlada en las diferentes especies de bivalvos, sometidas a temperaturas diferentes entre 4 a 18°C, demostrando que AdV 35 fue detectable hasta 10 semanas después de la infección, en ejemplares en ambas temperaturas, pero con disminución gradual, en las diferentes concentraciones del virus. Otro estudio, detectó la persistencia de AdV humano tipo 5, bajo un sistema de depuración con UV, indicando que bajo este modelo de sistema de depuración, el AdV humano tipo 5 deja de ser detectable a las 96 h de recirculación de agua de mar, ya que solo se detectó el genoma del virus, hasta el muestreo de las 72 h (Abreu *et al.*, 2012). También, en Brasil se realizó una evaluación de la contaminación controlada en muestras de bivalvos (*Anomalocardia brasiliensis*) de importancia comercial y con un alto valor en los platos típicos de Brasil, resultando que los índices de bacterias indicadoras de contaminación fecal estaban de acuerdo con las regulaciones brasileñas, sin embargo, se detectó presencia de virus entéricos como HAV, NoV (GI y GII), HAdV y RoV (A) (Souza *et al.*, 2018). Para conocer la bioacumulación de estos virus, se realizaron ensayos donde los bivalvos se comportaron diferente para la absorción de los diferentes virus, donde la concentración de VHA fue <1% a las 3 h, pero aumentó a <10% a las 8 h, permaneciendo sin cambios hasta las 12 h y disminuyendo a <3% a las 24 h; HAdV alcanzó su concentración más alta a las 12 h, siendo liberada por los animales y bajando a <3% a las 24 h. También, se evaluó la inactivación térmica de HAdV-2 en *A. brasiliensis*. Después del procedimiento habitual de cocción suave, en diferentes momentos (0, 1, 1.5, 3 y 5 min), se evaluó la infectividad viral utilizando Cultivo Celular Integrado-Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (ICC-RT-qPCR). La temperatura dentro del tejido digestivo se mantuvo <80°C con el tiempo y después de 5 min de cocción, el HAdV alcanzó una desintegración del 90% (1 log₁₀)

(Pilotto *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2018). Estos resultados deben ser considerados, como una advertencia real a las autoridades competentes de Panamá, para la implementación de regulaciones y evitar brotes en la población relacionados a la producción y consumo de estos bivalvos contaminados con virus infecciosos, al consumir almejas crudas o poco cocidas (Pilotto *et al.*, 2019; Guiguet *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018).

Importantes evidencias relacionadas, que después de la introducción de la vacuna contra el RoV-A, otros virus entéricos han asumido una importancia epidemiológica como el HAdV, a pesar que la detección por infecciones de las diferentes especies de AdV, presentan una variación significativa según el año (Souza *et al.*, 2021; Portal *et al.*, 2019; Primo *et al.*, 2018). En estudios realizados en Brasil (2012-2017), se analizaron 3003 muestras de heces procedentes de pacientes con gastroenteritis aguda, donde se detectó 3.9% (117/3003) de HAdV, donde 76 pertenecieron a las especies F (70 de HAdV-F41 y 6 de HAdV-F40), 31 a las especies C (15 HAdV-C1; 13 HAdV-C2; 3 HAdV-C5), 5 pertenecen a las especies D (3 HAdV-D56 y 2 sin genotificar) (Primo *et al.*, 2018). Desde octubre del 2021 e inicio del 2022, se inició una alarma en los Estados Unidos, Europa, Asia y Centroamérica, donde se reportaron casos de hepatitis aguda atípica con manifestaciones de dolor abdominal, vomito, diarrea, ictericia y niveles muy altos de enzimas hepáticas, que afectaron a niños con una edad media entre 3 y 4 años. Se realizaron diferentes pruebas de laboratorio, dando como resultado la presencia de AdV-F41, donde los agentes ambientales y tóxicos, y las toxinas transmitidas por los alimentos, jugaron un papel importante, como posible ruta de transmisión (Baker *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022).

Otro patógeno que fue evaluado en este estudio fue el EV y son pocos los estudios realizados para la detección de este patógeno en algún tipo de bivalvos de consumo. En este estudio, se detectó el porcentaje de positividad más alto de los patógenos analizado en las muestras absolutas, con un 21.1% (19/90), representando un 28.8% (13/45) para la temporada seca, con

un porcentaje más elevado en comparación con la temporada lluviosa, que fue de un 13.3% (6/45). Estos resultados difieren con un estudio realizado en Costa Rica por Herrero *et al.*, (1999), donde reportaron ausencia de EV en *A. tuberculosa*. Además, Herrero *et al.*, (1999), explicaron que el aislamiento viral en los bivalvos es bajo, por factores que inactivan la composición viral como materias orgánicas y compuestos químicos, ya sea por metodología de aislamiento celular o detección directa, lo que se puede atribuir, al aumento de la contaminación de las zonas marino-costeras, incidiendo en la detección de este patógeno. Diversos estudios en muestras de bivalvos reportaron la presencia de este patógeno y se asocian a brotes de gastroenteritis (Romalde *et al.*, 2002; Casas y Sun, 2001; Suñen y Sobsey, 1999).

Los resultados de este estudio, son similares a los reportados por La Rosa *et al.* (2017), donde uno de los virus con mayor presencia después de Bocavirus, fue el EV, con 9 muestras positivas y con mayor presencia, en los meses de primavera (marzo/abril). Crocci (2000), reportó que la presencia de virus fue alta de 41.7% (15/36), donde dos muestras eran contaminadas solo con EV y 3 coinfectadas con VHA, a diferencia de los observado en este estudio, que se obtuvo un 21.1% (19/90) de EV. Le Guyader (2001), también reportó la presencia de solo de 5 muestras infectadas con EV en el área A (aptas para consumo sin proceso de depuración), y 17 individuos en muestras para el área C, parecido a lo observado en este estudio.

Romalde *et al.* (2018), mencionaron en un estudio realizado en el 2009 por Vilariño, que la presencia de EV fue de 12.2% de las muestras analizadas y también, mencionaron en su estudio, que ellos detectaron un 43.9% EV, en diferentes tipos de muestras de molusco, incluyendo ejemplares silvestres y de cultivo en balsa. En la Unión Europea, Gabrieli *et al.*, (2007), realizaron un monitoreo ambiental y de mercado sobre 137 bivalvos, donde detectaron la presencia de RoV, Astrovirus, EV y NoV en 25.5, 18.2, 8.0 y 2.1%, respectivamente, observándose en este estudio que el virus con mayor

presencia es el RoV difiriendo con nuestros resultados, donde se observó que EV fue el de mayor tasa de positividad. En los Países Bajos, se intentó detectar EV en 64 muestras de bivalvos en el área de colecta comercial y no comercial, para la detección de NoV, RoV, AstV, HAV y EV. Solo se logró detectar el ARN de EV en 14/64 muestras (21.9%), de las cuales 4 eran de áreas de recolección no comerciales y 10 eran de áreas de colección comercial (Lodder-Verschoor *et al.*, 2005), similar a los obtenido en este estudio que fue de 21.1% (19/90). También, existen reportes de la presencia de EV en bivalvos de Francia, donde el 40% (21/52) de las muestras estaban contaminadas con EV (Dubois *et al.*, 2004), que difiere un poco con los datos obtenidos en este estudio.

La vigilancia molecular de las muestras de alimentos para bivalvos demuestra que los virus patógenos humanos como EV, se encuentran presentes en este recurso marino, lo cual confirma el papel de los bivalvos como los principales reservorios, demostrado en un estudio realizado en Sicilia, donde Purpari *et al.* (2019), determinaron la presencia de EV en un 7.4% (8/108) y otros virus entéricos, en muestras de bivalvos de importancia comercial, un poco más bajo de lo observado en este estudio. Un estudio realizado en Japón en el 2014, detectó la presencia de EV y otros virus entéricos en muestras de bivalvos asociados a brotes de gastroenteritis en pacientes mayores de 18 años, detectando 3 genotipos pocos comunes como los Coxsackievirus (CV) A1 y A19, y EV76, lo que sugiere que el consumo de bivalvos es un modo de transmisión de estos genotipos que están circulando en la población de manera discreta, debido a que solo se detectó EV en 3.3% de muestras de bivalvos analizadas y en el 2.2% de las muestras del brote viral que estaba asociado a los bivalvos (Iritani *et al.*, 2014).

Se ha demostrado una gran variabilidad en la absorción de virus entre bivalvos de manera individual. Un estudio realizado en ostras de Nueva Zelanda en el Pacífico, demuestra que la tasa de depuración para el PV en

comparación con otros virus como NoV y VHA, disminuyeron significativamente en el recuento del virus en las muestras analizadas después de las 48 h de infección. Ha pesar que los HAV, NoV y PV tienen propiedades físicas similares, por ejemplo, tamaño y forma, pero difieren en composición y estructura a nivel molecular y bioquímico (por ejemplo, diferentes conformaciones de la proteína de la cápside y los receptores de superficie celular), influenciado en el proceso de absorción y eliminación de los virus en los bivalvos (McLeod *et al.*, 2009). Estos datos difieren con un estudio realizado en la India en muestras de mariscos (alésters, almejas, mejillones y camarones), y peces de aleta (sardina, caballa, anchoa y otros), destinados para el consumo humano, donde se detectó EV, dando como resultado positivo, solo en las muestras de bivalvos. Donde se encontró que la prevalencia más alta era en almejas negras, con el 48.4% de las muestras positivas para EV, más alto de lo obtenido en este estudio. De las 16 muestras de ostras analizadas, se detectó EV en 9 muestras (56.25%), mientras que 6 de las 19 muestras de almejas duras asiáticas (31.6%), dieron positivo para el ARN viral. También, el ARN de EV fue detectado en una muestra de mejillón verde y almeja de pantano, lo que indica que son comercializadas sin un proceso de depuración adecuado para eliminar estos patógenos. Aunque los procesos de tratamiento de aguas residuales han mejorado, todavía grandes volúmenes de aguas residuales entran en las aguas costeras, lo que lleva a la contaminación de mariscos en la región de este estudio. Las personas que consumen estos mariscos contaminados están en riesgo de sufrir infecciones gastrointestinales. (Lekshmi *et al.*, 2018), similar a lo observado en este estudio, porque en las zonas de producción, estos bivalvos son comercializados sin ningún tipo de depuración y además, estas zonas de producción son las que abastecen el Mercado de Mariscos de la Ciudad de Panamá, representando un alto riesgo para la salud de los consumidores, si se comen crudos o ligeramente cocidos. Estos datos indican, la importancia del control sanitario de los

recursos hídricos, como lo que reporta Laconelli *et al.* (2017), donde reportaron la presencia de EV en 62% (13/21) de aguas residuales crudas, 14% (3/21) en efluentes tratados, 8% (1/12) para agua ultrafiltrada, agua de río 11 muestras (n=28) (39.3%) y en agua potable, no se observó EV. En Francia, tras un evento de inundación cerca de una laguna de producción de mariscos, se reportó 205 casos de gastroenteritis asociándose al consumo de bivalvos. El reporte indica que 11 muestras fueron positivas para al menos un virus. Nueve (75%) muestras fueron positivas para NoV, seis para AiV (50%), seis para EV (50%), tres para AdV (25%) y dos para RoV-A (17%). Ocho muestras fueron positivas para múltiples virus entéricos y una muestra de heces tenía siete virus diferentes (AiV, AV tipo 8, EV, NoV GI.1, NoV GII.17, RoV-G1P y RoV-G9P) (Le Guyader *et al.*, 2008).

Durante el tiempo de estudio, solo se detectó el 0.9 % (fi=1) de RoV en las muestras de bivalvos analizadas. La muestra detectada fue del género *Leukoma* sp., del mes de marzo durante la temporada seca. Estos datos son similares a los reportados por Le Guyader (2001), donde reporta la detección de RoV en área A en 11 individuos y en el área C en 19 individuos. Otro estudio menciona la investigación realizada por Vilariño donde reporta la prevalencia baja de RoV en un 4.9% de las muestras de bivalvos estudiadas, similares a los de este estudio (Romalde *et al.*, 2018). La Rosa *et al.* (2017), presentaron menos presencia de RoV, con solo 3 muestras positivas y con mayor presencia en los meses de primavera (marzo/abril), similar a este estudio, porque fue detectado en época seca. Fusco *et al.*, (2019), detectaron RoV en muestras de bivalvos en zonas de cosechas para su comercialización, durante el 2015, 2016 y 2017, donde la positividad fue de 12.3% (18/146), 0% (0/77), 12.5% (8/66), respectivamente, relativamente baja, similar a lo observado en este estudio, principalmente para las muestras del 2016.

Los datos de este estudio difieren con los de Mozgovej *et al.* (2022), Keller *et al.* (2019), Marinho *et al.* (2018). Mozgovej *et al.* (2022), reportaron la

presencia de un 21% de RoV-A en muestras de ostras de Cuboré del Pacífico de Buenos Aires. Keller *et al.* (2019), observaron la presencia de RoV en todas las estaciones climáticas, presentando la carga más alta y más frecuente en las muestras positivas y las matrices. Fiorito *et al.* (2021 y 2019), indicaron que RoV presentó una alta concentración de las ostras de estudio. Y difiriendo también este estudio con lo reportado por Macaluso *et al.* (2021), donde no hay presencia de RoV a lo largo de la cadena de producción y distribución de mariscos en Sicilia. También difiere con lo observado en Brasil, donde se detectó la presencia de RoV en muestras de bivalvos en un 26.3% (5/19) (Marinho *et al.*, 2018). Además, Hoque *et al.*, (2022), detectaron la presencia de RoV en todos los meses de muestreo (Julio, Septiembre, Noviembre y Enero). Hoque *et al.* (2022) e Ito *et al.* (2021), detectaron la cepa de la vacuna RotaTeq en ostras. Según los hallazgos de Ito *et al.* (2021), también detectaron la cepa de Rotarix, reportando las tasas de positivas de RoV-A silvestres, con Rotateq y Rotarix en las ostras que fueron de 54, 31 y 14%, respectivamente, que siguieron siendo comparables con las de RoV-A de tipo salvaje (57%), RotaTeq (35%) y Rotarix (0%) en aguas residuales. Hoque *et al.* (2022), detectaron RoV-A de tipo salvaje (64.6%), RotaTeq (1%) pero no Rotarix (0%) en almejas, estos datos sugieren que los pacientes infectados por RoV (sintomáticos o asintomáticos) excretan cargas virales al ambiente y son acumulados en bivalvos donde persisten durante mucho tiempo, convirtiéndose en el posible vector del próximo brote estacional. Además, de demostrar la presencia de las cepas de las vacunas, siendo de importancia en la posible transmisión de cepas de RoV de tipo salvaje y vacuna en el medio ambiente para evitar la aparición de nuevas variantes generadas por el reordenamiento del genoma con cepas de la vacuna (Hoque *et al.*, 2022 e Ito *et al.*, 2021).

La presencia de virus específicos del ser humano en el agua y los bivalvos refleja el fuerte impacto antropogénico en los manglares y sirve como una alerta temprana de los brotes de enfermedades transmitidas por el agua y

los alimentos, resultantes del consumo de mariscos y la práctica de actividades recreativas acuáticas en la región (Kaas *et al.*, 2016; Kittigul *et al.*, 2014). Tal como lo indica Kaas *et al.* (2016), donde detectaron presencia de RoV y otros virus entéricos en un 75% (9/12) en muestras de aguas residuales y un 17% (2/12) en agua de mar, reportando concentraciones baja de 1.9 (9/104) a 3.5 (9/ 105) copias del genoma/L, en comparación con otros virus entéricos para las aguas residuales, mientras, que en el agua de mar, la concentración fue de 6.2 (9/103) copias del genoma/L, siendo la más alta del periodo a pesar de haber sido detectada solo en dos meses (Noviembre y Diciembre) del año de estudio. La presencia está asociada, a que es un país en que el esquema de inmunización con la vacuna, no es bien implementada. Una vez introducida la vacuna contra RoV desde el 2006 para América Latina y el Caribe, se ha observado una disminución del 85% para el riesgo de hospitalización y visitas de emergencia para RoV-1 y un 90% para RoV-5 (Velázquez *et al.*, 2017).

Kaas *et. al.*, (2016), indica que no existe correlación entre la temperatura de los recursos muestreados y la concentración viral. El monitoreo de las muestras clínicas indica la presencia de RoV en un 17% (46/263), siendo más alta en temporada de verano, similar en temporalidad a lo detectado en este estudio, donde se observó solo presencia de RoV en temporada seca, relacionándose con lo reportado por Araud *et al.* (2015), donde exponen que la cepa de RoV determina la estabilidad del virus según la temperatura del agua y también, a la presión a que estos estén sometidos, siendo un valor importante al momento de inactivar el virus en los bivalvos para su posterior consumo. En Brasil, se realizó una evaluación de la contaminación biológica en muestras de bivalvos (*Anomalocardia brasiliensis*) de importancia comercial y con un alto valor en los platos típicos de Brasil, resultando que los índices de bacterias indicadoras de contaminación fecal estaban de acuerdo con las regulaciones brasileñas, sin embargo, se detectó presencia de virus entéricos como HAV, NoV (GI y GII), HAdV y RoV-A, y se propone

que la bioacumulación de RoV-A es inestable con el tiempo para alcanzar sus valores más altos después de 24 h (<5%) (Souza *et al.*, 2018).

Durante el presente estudio, se puede observar la coinfección viral en 6.7% (6/90) para AdV-EV y en 1.1% (1/90) para EV-RoV, un fenómeno que se ha observado en diversos estudios. En el 2008, se observó que muestras de bivalvos coinfectadas con EV y VHA, correspondieron a 3 muestras infectadas simultáneamente de 15 positivas (Crocci, 2008). Un estudio realizado en una región de manglares en Brasil donde realizaron la evaluación de la calidad microbiológica del agua y de bivalvos de consumo en gran medida por la población y restaurantes, demostró una asociación entre el consumo de bivalvos contaminados y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, debido a la descarga de aguas residuales domésticas, a pesar de detectar densidades bajas de indicadores de contaminación fecal, en las muestras de agua del estuario, los bivalvos estaban 400 veces más contaminados por AdV y RoV, detectándose en todas las muestras de bivalvos (Keller *et al.*, 2013). Laconelli *et al.* (2017), también reportaron muestras infectadas de manera simultánea por dos o hasta cinco virus en diferentes muestras hídricas, prevaleciendo la coinfección por los distintos genogrupos de NoV con un 58%, seguido por la incidencia de AdV y EV con un 46%, muy por encima de lo obtenido en este estudio de 6.7% (6/90) para AdV-EV. Romalde *et al.*, (2018), mencionan el estudio realizado en el 2009 por Vilariño, donde se observó la contaminación mixta con dos o tres virus de manera simultánea en una misma muestra. Además, de mencionar la coinfección de EV y HAV en muestras de moluscos silvestre y de cultivo en balsa, con un 14.1%. Sin embargo, los análisis estadísticos no demostraron una relación significativa entre la presencia de coinfección (Romalde *et al.*, 2018). Fusco *et al.*, (2019), reportaron un 62,2% muestras de bivalvos positivos para al menos dos virus entéricos (HAV, NoV GI y GII, RoV, AstV, SaV, AiV-1 y AdV) simultáneamente, a diferencia de lo observado en este estudio. Además, Keller *et al.* (2019), reportaron muestras positivas para más

de un virus a la vez en muestras de agua de mar en zonas de colecta y bivalvos, lo que representa un alto riesgo por la exposición de algún virus asociado a enfermedades gastrointestinales.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de virus entéricos en las muestras de bivalvos, aprobándose la hipótesis nula
2. EV es el virus con mayor prevalencia en las muestras estudiadas, seguido por AdV y con muy baja prevalencia la presencia de RoV.
3. La incidencia de virus entéricos en las especie de bivalvos esta asociado a la especie de bivalvos.
4. *Donax sp.* presenta mayor infección por AdV, la incidencia de EV con mayor significancia se observa en el género de *Leukoma sp.* La especie de *A. tuberculosa* presenta una baja infección de virus entéricos.
5. La temporada seca presenta mayor prevalencia de AdV, EV y RoV.
6. El ECP confirma la infectividad del 97.8% de las muestras analizadas. Indicando una alta presencia de virus entéricos en las muestras.
7. Existe una alta probabilidad de encontrar bivalvos con presencia de colifagos en la naturaleza. La detección de colifagos no presentan diferencia significativa entre las temporadas (seca y lluviosa).
8. Estos resultados plantean la necesidad de implementar programas de vigilancia y gestión de manejo para estos productos de mar, para qué de esta manera, se pueda prevenir posibles brotes virales transmitidos por los alimentos, debido al consumo de bivalvos contaminados, contribuyendo a la vigilancia epidemiológica y mejora de la salud pública en nuestro país. Además, de presentar una línea base para establecer nuevos indicadores de contaminación viral, para evitar brotes de gastroenteritis en la población

vulnerable por causa de consumo de bivalvos infectados con algún tipo de virus entéricos.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar cebadores comerciales con alta sensibilidad y especificidad para la detección de HAV, HEV, NoV, AstV y SaV, como de otros virus entéricos, utilizando la metodología de PCR o RT-PCR en tiempo real, para mejorar la sensibilidad de los métodos de detección y conocer la carga viral presente en los bivalvos.
2. Utilizar líneas celulares específicas para mejorar la detección de los virus a estudiar.
3. Realizar un estudio de toxicidad de las muestras provenientes de los bivalvos en las células, para determinar si el ECP es producido por algún agente externo como factores químicos.
4. Realizar la estandarización de la detección de colífagos para su cuantificación y asociación con la detección de virus entéricos, como un potencial indicador de contaminación viral en muestras ambientales.
5. Continuar estandarizando la secuenciación para muestras ambientales que permitan obtener productos de amplificación específicos y limpios, para poder realizar análisis filogenéticos para determinar el posible origen de los virus patógenos ambientales que circulan en Panamá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abad Morejón de Girón, F. X. (1994). *Supervivencia y desinfección de virus entericos en el ambiente*.
- Abedi, G., Watson, J., Pham, H., Allan, W., Oberste, S., & Gerber, S. (2015). Enterovirus and Human Parechovirus Surveillance — United States, 2009–2013. *MMWR Surveil Summ*, 64(34), 940-943. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6434a3.htm>
- Abedon, S. (2009). Bacteriophage Ecology. *Bacteriophage Ecology*, 42-57. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511541483>
- Abo-senna, A. S. M. (2017). Occurrence of Bacillus thuringiensis Bacteriophages in the Egyptian Arid Soil. *International Journal of Virology and Molecular Biology*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.5923/j.ijvmb.20170601.01>
- Abreu, A., Rigotto, C., Moresco, V., Kleemann, C., Teixeira, A., Rogério, C., Oliveira, C., & Monte, C. (2012). The depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(1), 11-17.
- Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4), 245-251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227-243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Allard, A. (1992). *ENTERIC ADENOVIRUS TYPE 41 Genome organization and specific detection procedures Annika Allard*. UMEÅ UNIVERSITY MEDICAL DISSERTATIONS.
- Alonso Pérez, N., Sagastizabal Cardelus, B., Prieto Tato, L. M., Guillén Martín, S., González Torralba, A., García Bermejo, I., & Ramos Amador, J. T. (2017). Evaluación de una técnica de diagnóstico molecular Xpert EV (Cepheid®) en la meningitis por enterovirus. *Anales de Pediatría*, 87(4), 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.09.010>
- Amor, A., & Snchez-Conde, M. (2006). Infecciones v?ricas. Clasificaci?n. Infecciones por virus herpes. *Medicine - Programa de Formaci?N M?Dica Continuada Acreditado*, 9(59), 3813-3819. [https://doi.org/10.1016/s0211-3449\(06\)74333-8](https://doi.org/10.1016/s0211-3449(06)74333-8)
- Anderson, E. J., & Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *Lancet Infectious Diseases*, 4(2), 91-99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00928-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00928-4)

- Ansari, S. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Wells, G. A., & Tostowaryk, W. (1989). In vivo protocol for testing efficacy of hand-washing agents against viruses and bacteria: Experiments with rotavirus and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3113-3118. <https://doi.org/10.1128/aem.55.12.3113-3118.1989>
- ARAP. (2012). Baja producción de moluscos en Panamá - ElCapitalFinanciero.com - Noticias Financieras de Panamá. En *El capital Financiero*. <https://elcapitalfinanciero.com/baja-produccion-de-moluscos-en-panama/>
- Araud, E., DiCaprio, E., Yang, Z., Li, X., Lou, F., Hughes, J. H., Chen, H., & Li, J. (2015). High-pressure inactivation of rotaviruses: Role of treatment temperature and strain diversity in virus inactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6669-6678. <https://doi.org/10.1128/AEM.01853-15>
- Avellón, A., Pérez, P., Aguilar, J. C., Lejarazu, R. ortiz de, & Echevarría, J. E. (2001). Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 92(2), 113-120. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00269-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00269-X)
- Baert, L., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2007). Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 106-111. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02047.x>
- Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M., & Van Kuppeveld, F. J. M. (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 368-381. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
- Baker, J., Buchfellne, M., Britt, W., Sanchez, V., Potter, J., Ingram, A., Shiau, H., Gutierrez, L., Saaybi, S., Kelly, D., Lu, X., Vega, E., Ayers-Millsap, S., Willeford, W., Rassaei, N., Bullock, H., Reagan-Steiner, S., Martin, A., Moulton, E., ... Kirking, H. (2022). Acute Hepatitis and Adenovirus Infection Among Children — Alabama, October 2021–February 2022. En *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/CMR.5.3.262>
- Bakshi, S. S., & Rajalakshmi, P. (2016). Molusco contagioso. *Medicina Clinica*, 147(3), e17. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.04.021>
- Balsalobre-Arenas, L., & Alarcón-Cavero, T. (2017). Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(6), 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.002>

- Barrios, J. C., Russomando, G., & Espínola, E. E. (2016). Diversidad de adenovirus detectados en niños menores de 5 años hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Paraguay, 2010-2013. *Pediatr.*, 43(2), 115-122.
- Barrios, M. E., & Mbayed, V. (2019). "*Herramientas virales para la detección e identificación del origen de la contaminación fecal en desechos industriales y aguas residuales domiciliarias.*" [VIROLOGIA]. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
- Bergman, H., Henschke, N., Hungerford, D., Pitan, F., Ndwandwe, D., Cunliffe, N., & Soares-Weiser, K. (2021). Vaccines for preventing rotavirus diarrhea: vaccines in use. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008521.pub6>
- Beuret, C., Baumgartner, A., & Schluep, J. (2003). Virus-contaminated oysters: A three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2292-2297. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2292-2297.2003>
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281-1283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- Blutt, S. E., Matson, D. O., Crawford, S. E., Staat, M. A., Azimi, P., Bennett, B. L., Piedra, P. A., & Conner, M. E. (2007). Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Medicine*, 4(4), 660-668. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040121>
- Bolón, R., & Berois, M. (2016). *Detección y cuantificación de Adenovirus Humano en muestras de aguas ambientales*. Universidad de la republica.
- Bordigoni, P., Carret, A. S., Venard, V., Witz, F., & Le Faou, A. (2001). Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 32(9), 1290-1297. <https://doi.org/10.1086/319984>
- Bosch, A., Pintó, R., & Abad, X. (2016). Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. En *Food Microbiology and Food Safety* (Vol. 2, Issue 3, pp. 367-384). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7>
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Abad, F. X. (2006). Survival and Transport of Enteric Viruses in the Environment. *Viruses in Foods, January 1956*, 151-187. https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9_6

- Bostina, M., Levy, H., Filman, D. J., & Hogle, J. M. (2011). Poliovirus RNA Is Released from the Capsid near a Twofold Symmetry Axis. *Journal of Virology*, 85(2), 776-783. <https://doi.org/10.1128/jvi.00531-10>
- Both, G. W., Mattick, J. S., & Bellamy, A. R. (1983). Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(10), 3091-3095. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.10.3091>
- Bucher, A., Rivara, G., Briceño, D., & Huicho, L. (2017). Uso de una Prueba Rápida de Rotavirus en la Prescripción de Antibióticos en Diarrea Aguda Pediátrica: Un Estudio Observacional, Aleatorizado y Controlado. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 32(1), 11-15.
- Bukhari, N., Parveen, G., Ali, P., Sami, A., Lashari, Y., Mukhtar, N., Bano, R., Haider, N., Khowaja, A., & Kazmi, S. (2022). Diversity of Rotavirus Strains among Children with Acute Diarrhea in Karachi, Pakistan. *Hindaw*, 1, 6. <https://doi.org/10.1155/2022/5231910>
- Burnett, E., Parashar, U. D., & Tate, J. E. (2020). Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006–19: a literature review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 8(9), e1195-e1202. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30262-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30262-X)
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- Byington, C. L., Taggart, ; E William, Carroll, K. C., & Hillyard, D. R. (1999). A Polymerase Chain Reaction-based Epidemiologic Investigation of the Incidence of Nonpolio Enteroviral Infections in Febrile and Afebrile Infants 90 Days and Younger. <http://www.pediatrics.org/cgi/content/>
- Campos, C. J. A., Kershaw, S., Morgan, O. C., & Lees, D. N. (2017). Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.028>
- Campos-Pinilla, C., Cárdenas-Guzmán, M., & Guerrero-Cañizares, A. (2008). PERFORMANCE OF FAECAL CONTAMINATION INDICATORS IN DIFFERENT TYPE OF WATERS FROM THE SABANA OF BOGOTÁ (COLOMBIA). *Universitas Scientiarum*, 12(2), 103-108. www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum
- Canadian Food Inspection Agency. (2011). *Canadian Shellfish Sanitation Program: Manual of Operations*. 1-139.

- Cardosa, M. J., Krishnan, S., Tio, P. H., Perera, D., & Wong, S. C. (1999). Isolation of subgenus B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibu, Sarawak. *Lancet*, 354(9183), 987-991. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11032-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11032-2)
- Casas, I., Tenorio, A., Echevarría, J. M., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (1997). Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *Journal of Virological Methods*, 66(1), 39-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00035-9)
- Casas, N., & Sun, E. (2001). Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus* spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Applied Microbiology*, 90, 89-95.
- Cassir, N., Hraiech, S., Nougairède, A., Zandotti, C., Fournier, P. E., & Papazian, L. (2014). Outbreak of adenovirus type 1 severe pneumonia in a French intensive care unit, September–October 2012. *Eurosurveillance*, 19(39), 20914. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.39.20914>
- Castañeda Narváez, J. L., & Ordoñez Ortega, J. (2014). La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Revista de Enfermedades Infecciosas En Pediatría*, 27(107), 394-396.
- Cates, J. E., Amin, A. B., Tate, J. E., Lopman, B., & Parashar, U. (2021). Do Rotavirus Strains Affect Vaccine Effectiveness? A Systematic Review and Meta-analysis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 40(12), 1135-1143. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003286>
- (CATHALAC), C. del A. del T. H. para A. L. y el C. (2007). *Diagnóstico del Estado Actual de los Manglares, su Manejo y su Relación con la Pesquería en Panamá*. <http://hdl.handle.net/1721.1/79549>
- CDC. (2021, agosto 11). *Enteroviruses | Disease or Condition of the Week | CDC*. <https://www.cdc.gov/dotw/enteroviruses/>
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2020). *Rotavirus | Acerca del rotavirus | CDC*. CDC. <https://www.cdc.gov/rotavirus/clinical-sp.html>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2020). *Declaración de información sobre la vacuna contra el adenovirus | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades*. <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/adenovirus.html>

- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., & Jameel, S. (2008). Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Journal of Biosciences*, 33(4), 451-464. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0064-1>
- Chang, S.-Y., Lee, C.-N., Lin, P.-H., Huang, H.-H., Chang, L.-Y., Ko, W., Chang, S.-F., Lee, P.-I. L., Huang, L.-M., & Kao, C.-L. (2008). A Community-Derived Outbreak of Adenovirus Type 3 in Children in Taiwan Between 2004 and 2005. *Journal of Medical Virology*, 80(Agisto 2007), 102-112. <https://doi.org/10.1002/jmv.21045>
- Chansaenroj, J., Tuanthap, S., Thanusuwanasak, T., Duang-In, A., Klinfueng, S., Thaneskongtong, N., Vutithanachot, V., Vongpunsawad, S., & Poovorawan, Y. (2017). Human enteroviruses associated with and without diarrhea in Thailand between 2010 and 2016. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182078>
- Cho, C. T., Hiatt, W. O., & Behbehani, A. M. (1973). Pneumonia and Massive Pleural Effusion Associated with Adenovirus Type 7. *American Journal of Diseases of Children*, 126(1), 92-94. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1973.02110190080017>
- Choi, E. H., Kim, H. S., Eun, B. W., Kim, B. Il, Choi, J. Y., Lee, H. J., & Inada, T. (2005). Adenovirus type 7 peptide diversity during outbreak, Korea, 1995-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 649-654. <https://doi.org/10.3201/eid1105.041211>
- Clark, H. F., Offit, P. A., Ellis, R. W., Eiden, J. J., Krah, D., Shaw, A. R., Pichichero, M., Treanor, J. J., Borian, F. E., Bell, L. M., & Plotkin, S. A. (1996). The development of multivalent bovine rotavirus (Strain WC3) reassortant vaccine for infants. *Journal of Infectious Diseases*, 174(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s73
- Comite Internacional de Taxonomia de Virus. (2021). *Comite Internacional de Taxonomia de Virus*. 1.
- Cooper, R. J., Hallett, R., Tullo, A. B., & Klapper, P. E. (2000). The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 333-345. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004550>
- Croci, L., de Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A. M., Moretti, P., Costantini, G., & De, D. (2000). Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in Adriatic Sea mussels. En *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 88).
- Cui, X., Wen, L., Wu, Z., Liu, N., Yang, C., Liu, W., Ba, Z., Wang, J., Yi, S., Li, H., Liang, B., Li, P., Jia, L., Hao, R., Wang, L., Hua, Y., Wang, Y., Qiu, S., &

- Song, H. (2015). Human adenovirus type 7 infection associated with severe and fatal acute lower respiratory illness and nosocomial transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 746-749. <https://doi.org/10.1128/JCM.02517-14>
- Cunliffe, N. A., Booth, J. A., Elliot, C., Lowe, S. J., Sopwith, W., Kitchin, N., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Hart, C. A., & Regan, M. (2010). Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 55-62. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090401>
- Dennehy, P. H. (2000). Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(10 SUPPL.), 103-105. <https://doi.org/10.1097/00006454-200010001-00003>
- Desai, R., Parashar, U. D., Lopman, B., De Oliveira, L. H., Clark, A. D., Sanderson, C. F. B., Tate, J. E., Matus, C. R., Andrus, J. K., & Pate, M. M. (2012). Potential intussusception risk versus health benefits from rotavirus vaccination in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 54(10), 1397-1405. <https://doi.org/10.1093/cid/cis191>
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Tantillo, G. M., Terio, V., & Buonavoglia, C. (2003). Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1681-1685. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.9.1681>
- Dias, E., Ebdon, J., & Taylor, H. (2018). The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. *Water Research*, 129, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.022>
- Diez-Valcarce, M., Castro, C. J., Marine, R. L., Halasa, N., Mayta, H., Saito, M., Tsaknaridis, L., Pan, C. Y., Bucardo, F., Becker-Dreps, S., Lopez, M. R., Magaña, L. C., Ng, T. F. F., & Vinjé, J. (2018). Genetic diversity of human sapovirus across the Americas. *Journal of Clinical Virology*, 104, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.003>
- Dilnessa, T., & Zeleke, H. (2017). Cell Culture, Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, 2(2575-5498).
- Doerfler, W. (1996). Adenoviruses. En S. Barón (Ed.), *Medical Microbiology* (4a ed., pp. 438-442). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch24>
- Doré, W. J., Henshilwood, K., & Lees, D. N. (2000). Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve

Molluscan Shellfish. En *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 4).

- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Dubois, E., Merle, G., Roquier, C., Trompette, A. L., le Guyader, F., Cruci re, C., & Chomel, J. J. (2004). Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-nested PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.06.001>
- Elamri, D. E., Aouni, M., Parnaudeau, S., & Le Guyader, F. S. (2006). Detection of human enteric viruses in shellfish collected in Tunisia. *Letters in Applied Microbiology*, 43(4), 399-404. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01978.x>
- Erdman, D. D., Xu, W., Gerber, S. I., Gray, G. C., Schnurr, D., Kajon, A. E., & Anderson, L. J. (2002). Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), 269-277. <https://doi.org/10.3201/eid0803.010190>
- Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, 53(4), 410-449. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
- Etchegaray, P. B. (2011). *Antecedentes generales de los virus animales 1*.
- ETESA. (2019). *Hidrometeorolog a de Etesa*. Datos Climatológicos de Panamá. <https://www.hidromet.com.pa/es/>
- Fall, A., Dia, N., K b , O., Sarr, F. D., Kiori, D. E., Ciss , E. H. A. K., Sy, S., Goudiaby, D., Richard, V., Diop, O. M., & Niang, M. N. (2016). Enteroviruses and rhinoviruses: Molecular epidemiology of the most influenza-like illness associated viruses in Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 339-347. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0799>
- FAO, & OMS. (2021). Orientación técnica para el desarrollo de los aspectos relativos a las zonas de cría de los programas de saneamiento de moluscos bivalvos. En *Serie inocuidad y calidad de los alimentos*. <https://doi.org/10.4060/cb5072es>
- Fenau, M., Cuadras, M. A., Feng, N., Jaimes, M., & Greenberg, H. B. (2006). Extraintestinal Spread and Replication of a Homologous EC Rotavirus Strain and a Heterologous Rhesus Rotavirus in BALB/c Mice. *Journal of Virology*, 80(11), 5219-5232. <https://doi.org/10.1128/jvi.02664-05>

- Fernández-Cruz, E., & Rodríguez-Sainz, C. (2013). INMUNOLOGÍA DE LA POLIOMIELITIS: VACUNAS, PROBLEMAS PARA LA PREVENCIÓN / ERRADICACIÓN E INTERVENCIONES DE FUTURO Eduardo Fernández-Cruz Pérez (1) y Carmen Rodríguez-Sainz (2). Poliovirus Immunology: Vaccines, Problems for the Prevention / Eradication. *Revista Española de Salud Pública*, 87(5), 443-454.
- Ferreira, M. S. R., da Xavier, M. P. T. P., de Tinga, A. C. C., Rose, T. L., Fumian, T. M., Fialho, A. M., de Assis, R. M., Costa, F. A. C., de Oliveira, S. A., Leite, J. P. G., & Miagostovich, M. P. (2012). Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in rio de Janeiro, Brazil: A fifteen-year study (1994-2008). *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033754>
- Fiorito, F., Amoroso, M. G., Lambiase, S., Serpe, F. P., Bruno, T., Scaramuzza, A., Maglio, P., Fusco, G., & Esposito, M. (2019). A relationship between environmental pollutants and enteric viruses in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental Research*, 169, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.001>
- Fiorito, F., di Concilio, D., Lambiase, S., Amoroso, M. G., Langellotti, A. L., Martello, A., Esposito, M., Galiero, G., & Fusco, G. (2021). Oyster *Crassostrea gigas*, a good model for correlating viral and chemical contamination in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112825>
- Flewett, T., Engvall, E., & Perlman, P. (1973). Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 3909(941), 4-6. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)92760-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)92760-8)
- Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357-371. <https://doi.org/10.1128/mmbr.69.2.357-371.2005>
- Formiga-Cruz, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Albiñana-Gimenez, N., Allard, A., & Girones, R. (2005). Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, 125(2), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.009>
- Fusco, G., Anastasio, A., Kingsley, D. H., Amoroso, M. G., Pepe, T., Fratamico, P. M., Cioffi, B., Rossi, R., Rosa, G. la, & Boccia, F. (2019). Detection of hepatitis A virus and other enteric viruses in shellfish collected in the gulf of Naples, Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14). <https://doi.org/10.3390/ijerph16142588>

- Gabrieli, R., Macaluso, A., Lanni, L., Saccares, S., Giamberardino, F. di, Cencioni, B., Petrinca, A. R., & Divizia, M. (2007). Enteric viruses in molluscan shellfish. En *NEW MICROBIOLOGICA* (Vol. 30).
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage production models: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01187>
- García, S. H. (2014). Poxvirus: Características Y Enfermedades Producidas. Importancia En El Desarrollo De Vacunas. En *Facultad de Biología, Universidad de Salamanca*. Universidad de Salamanca.
- Garrido Bañuelos, G. (2010). Virus influenza: la gripe a. *Ct*, 2, 263-280.
- Ghosh, S. K., Lekshmi, M., Das, O., Kumar, S., & Nayak, B. B. (2019). Occurrence of Human Enteric Adenoviruses in Fresh Tropical Seafood from Retail Markets and Landing Centers. *Journal of Food Science*, 84(8), 2256-2260. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14735>
- Giorgio Gallinella. (2013). Parvovirus B19 Achievements and Challenges. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, 1-33.
- Glass, R. I., Bresee, J., Jiang, B., Parashar, U., Yee, E., & Gentsch, J. (2006). Rotavirus and rotavirus vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 582, 45-54. https://doi.org/10.1007/0-387-33026-7_5
- Gomes, D. (2013). *BACTERIOPHAGES AS INDICATORS OF HUMAN ENTERIC VIRUSES IN MUSSELS (MYTILUS EDULIS)* [Doctor of Philosophy]. University of Brighton .
- Gonçalves, G., Gouveia, E., Mesquita, J. R., Almeida, A., Ribeiro, A., R cha-Pereira, J., & São José Nascimento, M. (2011). Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. *Epidemiology and Infection*, 139(11), 1672-1675. <https://doi.org/10.1017/S0950268810002803>
- González, M. de los A. (2003). Rotavirus: Enfermedad emergente de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Pediatría*, 75(1).
- Gray, G. C., McCarthy, T., Lebeck, M. G., Schnurr, D. P., Russell, K. L., Kajon, A. E., Landry, M. L., Leland, D. S., Storch, G. A., Christine, C., Robinson, C. C., Demmler, G. J., Saubolle, M. A., Sue, C., Selvarangan, R., Miller, M. B., Chappell, J. D., Danielle, M., Kiska, D. L., ... Erdman, D. D. (2007). Genotype Prevalence and Risk Factors for Severe Clinical Adenovirus Infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis.*, 45(9), 1120-1131.

- Green, M., & Piña, M. (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology*, 20(1), 199-207. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(63\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(63)90157-0)
- Guerra Lima, Z. I., Vergara Lopez, P. M., & Collado Milan, G. N. (2012). Guía Básica Para El Cultivo De Moluscos Bivalvos Del Pacífico Panameño: Conchuela, Ostras Y Concha Negra. En *Arap*. <http://hdl.handle.net/1834/8123>
- Guiguet Leal, D. A., Marques Souza, D. S., Silva Caumo, K., Fongaro, G., Ferreira Panatieri, L., Durigan, M., Brittes Rott, M., Monte Barardi, C. R., & Franco, R. M. B. (2018). Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. *Water Research*, 137, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.024>
- Gularte, J. S., Girardi, V., Demoliner, M., de Souza, F. G., Filippi, M., Eisen, A. K. A., Mena, K. D., de Quevedo, D. M., Rigotto, C., de Barros, M. P., & Spilki, F. R. (2019). Human mastadenovirus in water, sediment, sea surface microlayer, and bivalve mollusk from southern Brazilian beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 335-349. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.046>
- Guyader, F. le, Pelletier, Do., Haugarreau, L., Caprais, M., & POIVIMEPUy, M. (2001). *VALIDITY OF ESCHER/CH/A COLI, ENTEROVIRUS, AND F-SPECIFIC RNA BACTERIOPHAGES AS INDICATORS OF VIRAL SHELLFISH CONTAMINATION* (Vol. 20).
- Hage, E., Huzly, D., Ganzenmueller, T., Beck, R., Schulz, T. F., & Heim, A. (2014). A human adenovirus species B subtype 21a associated with severe pneumonia. *Journal of Infection*, 69(5), 490-499. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.015>
- Hankin, M. (2011). Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes . Ann. Inst. Pasteur 10:511–523 (1896). *Bacteriophage*, 1(3), 117-126. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16736>
- Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). Relevance of F-specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5709-5719. <https://doi.org/10.1128/AEM.01528-16>
- Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2018). F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of

- oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-17>
- Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Berginc, N., Ladhani, S., Susi, P., Christiansen, C., McKenna, J., Allen, D., Makiello, P., McAllister, G., Carmen, M., Zakikhany, K., Dyrdak, R., Nielsen, X., Madsen, T., Paul, J., Moore, C., von Eije, K., ... Fischer, T. K. (2018). Recommendations for enterovirus diagnostics and characterization within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology*, 101, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008>
- Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 471-480. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1590>
- Hernández, E., & García, L. (2014). *Tipificación de Enterovirus no-PolioComunitarios Causantes de Neurovirosis en Niños Uruguayos* (Vol. 39, Issue 1). Universidad de La Republica de Uruguay.
- Hernández V, R., Camacaro Gaunipa, H. J., Noureddine Mouhtar, A. Y., Torres, V., & Urbina, L. (2019). Rotavirus: causa de diarrea aguda en niños menores de 5 años que acuden a los centros de salud urbanos Dr. Pedro Iturbe, Dr. José María Espinoza y Dr. Edgar Peña, Municipio miranda, Coro. Falcón. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de La Salud. Salud y Vida*, 3(5), 129. <https://doi.org/10.35381/s.v.v3i5.255>
- Hernroth, B., & Allard, A. (2007). The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.009>
- Herrero, L., Palacios, A., Hun, L., & Vega, F. (s. f.). *Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos Anadara tuberculosa (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica*.
- Herrero, L., Palacios, A., Hun, L., & Vega, F. (1999). Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica. *Biología Tropical*, 47(3). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77441999000300015&script=sci_arttext&tlng=en
- Herrero Uribe, L., Avila Arias, R., Corrales Aguilar, E., & Hum Opfer, L. (2004). *Procedimientos en virología médica* (1.a ed. 20). Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Herrmann, J. E., Blacklow, N. R., Perron-Henry, D. M., Clements, E., Taylor, D. N., & Echeverria, P. (1988). Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in gastroenteritis.

- Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1783-1786.
<https://doi.org/10.1128/JCM.26.9.1783-1786.1988>
- Hilleman, M. R., & Werner, J. H. (1954). Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. (20825). *Proc Soc. Exp Biol and Med*, 85, 183-188.
- Hodgson, K. R., Torok, V. A., & Turnbull, A. R. (2017). Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusk management. *Food Microbiology*, 65, 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.003>
- Hong, J. Y., Lee, H. J., Piedra, P. A., Choi, E. H., Park, K. H., Koh, Y. Y., & Kim, W. S. (2001). Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: Epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(10), 1423-1429. <https://doi.org/10.1086/320146>
- Hoque, S. A., Wakana, A., Shimizu, H., Takanashi, S., Okitsu, S., Anwar, K. S., Hayakawa, S., Maneekarn, N., Okabe, N., & Ushijima, H. (2022). Detection of Rotavirus Strains in Freshwater Clams in Japan. *Food and Environmental Virology*, 14(1), 94-100. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09505-w>
- Iaconelli, M., Muscillo, M., della Libera, S., Fratini, M., Meucci, L., de Ceglia, M., Giacosa, D., & la Rosa, G. (2017). One-year Surveillance of Human Enteric Viruses in Raw and Treated Wastewaters, Downstream River Waters, and Drinking Waters. *Food and Environmental Virology*, 9(1), 79-88. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9263-3>
- IAWPRC Study Group on Health-Related Water Microbiology. (1991). Bacteriophages as Model Viruses in the Water Quality Control. *Water Research*, 25(5), 529-545. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B).
- ICTV. (2020a). *Genus: Enterovirus - Picornaviridae - Positive-sense RNA Viruses* - ICTV. EC 52. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus
- ICTV. (2020b). *Adenoviridae - Virus dsDNA - Virus dsDNA (2011) - ICTV*.
- IGNTG-Instituto Geográfico Nacional Tommy Guardia. (2011). *Autoridad Nacional de Administración de Tierras*. Visor Índice de Mapas, Año 2011. Escala 1:50 000, 1:25 000 y 1:5 000. <https://ignpanama.anati.gob.pa/>
- INEC. (2016). *Instituto Nacional de Estadísticas y Censo INEC* (p. 2016).

- Instituto de Vacunas Albert B. Sabin. (2005). *Rotavirus y Vacunas contra el Rotavirus*.
- Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J. I., Yamamoto, S. P., Goto, K., Tanaka, T., & Noda, M. (2014). Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *Journal of Medical Virology*, 86(12), 2019-2025. <https://doi.org/10.1002/jmv.23883>
- Ito, E., Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Nishiyama, M., Ito, H., Konta, Y., Omura, T., & Watanabe, T. (2021). Detection of Rotavirus Vaccine Strains in Oysters and Sewage and Their Relationship with the Gastroenteritis Epidemic. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(10), 1-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02547-20>
- Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., & Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic Escherichia coli. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2), 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.028>
- Jesús Romalde. (2014). Contaminación de moluscos por virus entericos: Validez de los estándares legales y microorganismos indicadores. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica SIIC*.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191-200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kaas, L., Gourinat, A. C., Urbès, F., & Langlet, J. (2016). A 1-Year Study on the Detection of Human Enteric Viruses in New Caledonia. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 46-56. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9224-2>
- Kajon, A. E., Hang, J., Hawksworth, A., Metzgar, D., Hage, E., Hansen, C. J., Kuschner, R. A., Blair, P., Russell, K. L., & Jarman, R. G. (2015). Molecular Epidemiology of Adenovirus Type 21 Respiratory Strains Isolated from US Military Trainees (1996-2014). *Journal of Infectious Diseases*, 212(6), 871-880. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv141>
- Kajon, A. E., Lu, X., Erdman, D. D., Louie, J., Schnurr, D., St. George, K., Koopmans, M. P., Allibhai, T., & Metzgar, D. (2010). Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 202(1), 93-103. <https://doi.org/10.1086/653083>

- Kajon, A. E., Mistchenko, A. S., Videla, C., Hortal, M., Wadell, G., & Avendaño, L. F. (1996). Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the South Cone of South America (1991-1994). *Journal of Medical Virology*, 48(2), 151-156. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199602\)48:2<151:AID-JMV6>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199602)48:2<151:AID-JMV6>3.0.CO;2-8)
- Kajon, A. E., & Wadell, G. (1992). Molecular epidemiology of adenoviruses associated with acute lower respiratory disease of children in Buenos Aires, Argentina (1984–1988). *Journal of Medical Virology*, 36(4), 292-297. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890360411>
- Kampmann, B., Cubitt, D., Walls, T., Naik, P., Depala, M., Samarasinghe, S., Robson, D., Hassan, A., Rao, K., Gaspar, H., Davies, G., Jones, A., Cale, C., Gilmour, K., Real, M., Foo, M., Bennett-Rees, N., Hewitt, A., Amrolia, P., & Veys, P. (2005). Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology*, 130(4), 595-603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05649.x>
- Keller, R., Justino, J. F., & Cassini, S. T. (2013). Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. *Journal of Water and Health*, 11(3), 573-580. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.245>
- Keller, R., Pratte-Santos, R., Scarpati, K., Martins, S. A., Loss, S. M., Fumian, T. M., Miagostovich, M. P., & Cassini, S. T. (2019). Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil. *Food and Environmental Virology*, 11(3), 288-296. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09391-3>
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M., & Center for disease C, P. (2006). Enterovirus Surveillance --- United States, 1970--2005. *MMWR Surveil Summ*, 55, 1-20. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>
- Kidd, A. H. (1984). Genome variants of adenovirus 41 (subgroup G) from children with diarrhea in South Africa. *Journal of Medical Virology*, 14(1), 49-59. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890140108>
- Kim, Y. J., Hong, J. Y., Lee, H. J., Shin, S. H., Kim, Y. K., Inada, T., Hashido, M., & Piedra, P. A. (2003). Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4594-4599. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4594-4599.2003>

- Kittigul, L., Panjangampatthana, A., Rupprom, K., & Pombubpa, K. (2014). Genetic diversity of rotavirus strains circulating in environmental water and bivalve shellfish in Thailand. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 1299-1311. <https://doi.org/10.3390/ijerph110201299>
- Kittigul, L., Singhaboot, Y., Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P., Pombubpa, K., & Hirunpetcharat, C. (2015). A comparison of virus concentration methods for molecular detection and characterization of rotavirus in bivalve shellfish species. *Food Microbiology*, 46, 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.020>
- Koizumi, Y., Isoda, N., Sato, Y., Iwaki, T., Ono, K., Ido, K., Sugano, K., Takahashi, M., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2004). Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis E virus while traveling in Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3883-3885. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3883-3885.2004>
- la Rosa, G., Sanseverino, I., della Libera, S., Iaconelli, M., Ferrero, V. E. V., Barra Caracciolo, A., & Lettieri, T. (2017). The impact of anthropogenic pressure on the virological quality of water from the Tiber River, Italy. *Letters in Applied Microbiology*, 65(4), 298-305. <https://doi.org/10.1111/lam.12774>
- Larsen, R. A., Jacobson, J. T., Jacobson, J. A., Strikas, R. A., Hierholzer, J. C., Larsen, R. A., Jacobson, J. T., Jacobson, J. A., Strikas, R. A., & Hierholzer, J. C. (1986). Hospital-associated epidemic of pharyngitis and conjunctivitis caused by adenovirus (21/h21+35). *Journal of Infectious Diseases*, 154(4), 706-709. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.4.706>
- Laudien, J., Brey, T., & Arntz, W. E. (2003). Population structure, growth and production of the surf clam *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) on two Namibian sandy beaches. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58(SUPPL.), 105-115. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(03)00044-1)
- Le Guyader, F. S., Le Saux, J. C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., & Atmar, R. L. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 4011-4017. <https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>
- le Guyader, F. S., le Saux, J. C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., & Atmar, R. L. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related

- gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 4011-4017. <https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>
- Lee, B. E., Chawla, R., Langley, J. M., Forgie, S. E., Al-Hosni, M., Baerg, K., Husain, E., Strong, J., Robinson, J. L., Allen, U., Law, B. J., Dobson, S., & Davies, H. D. (2006). Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of aseptic meningitis. *BMC Infectious Diseases*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-68>
- Lee, J., Choi, E., & Lee, H. (2010). Comprehensive Serotyping and Epidemiology of Human Adenovirus Isolated from the Respiratory Tract of Korean Children Over 17 Consecutive Years (1991–2007). *Journal of Medical Virology*, 82(September 2009), 624-631. <https://doi.org/10.1002/jmv.21701>
- Lees, D. N., Henshilwood, K., & Dore, W. J. (1994). Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2999-3005. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2999-3005.1994>
- Lekshmi, M., Das, O., Kumar, S., & Nayak, B. B. (2018). Occurrence of human enterovirus in tropical fish and shellfish and their relationship with fecal indicator bacteria. *Veterinary World*, 11(9), 1285-1290. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1285-1290>
- Lerma Sánchez, M., & Martí, A. F. (2019). Enterovirus: Características y diagnóstico. *Control Calidad SEIMC*, 3.
- Leruez-Ville, M., Chardin-Ouachée, M., Neven, B., Picard, C., le Guinche, I., Fischer, A., Rouzioux, C., & Blanche, S. (2006). Description of an adenovirus A31 outbreak in a pediatric hematology unit. *Bone Marrow Transplantation*, 38(1), 23-28. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705389>
- Li, Q. G., Hambræus, J., & Wadell, G. (1991). Genetic relationship between thirteen genome types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Intervirology*, 32(6), 338-350. <https://doi.org/10.1159/000150218>
- Light, J. S., & Hodes, H. L. (1943). Studies on Epidemic Diarrhea of the New-born: Isolation of a Filtrable Agent Causing Diarrhea in Calves. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 33(12), 1451-1454. <https://doi.org/10.2105/ajph.33.12.1451>
- Lin, K. H., Lin, Y. C., Chen, H. L., Ke, G. M., Chiang, C. J., Hwang, K. P., Chu, P. Y., Lin, J. H., Liu, D. P., & Chen, H. Y. (2004). A Two Decade Survey of Respiratory Adenovirus in Taiwan: The Reemergence of Adenovirus Types 7 and 4. *Journal of Medical Virology*, 73(2), 274-279. <https://doi.org/10.1002/jmv.20087>

- Lin, L., Hong, W., Ji, X., Han, J., Huang, L., & Wei, Y. (2010). Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tengchong hot springs in China. *Journal of Basic Microbiology*, 50(5), 452-456. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000116>
- Liu, X., Yamamoto, D., Saito, M., Imagawa, T., Ablola, A., Tandoc, A. O., Segubre-Mercado, E., Lupisan, S. P., Okamoto, M., Furuse, Y., Saito, M., & Oshitani, H. (2015). Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *Journal of Clinical Virology*, 68, 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.001>
- Lodder-Verschoor, F., De, A. M., Husman, R., van den Berg, H. H. J. L., Stein, A., van Pelt-Heerschap, H. M. L., & van der Poel, W. H. M. (2005). Year-Round Screening of Noncommercial and Commercial Oysters for the Presence of Human Pathogenic Viruses. En *Journal of Food Protection* (Vol. 68, Issue 9). http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/68/9/1853/1676489/0362-028x-68_9_1853.pdf
- López, I. E., Luna, G., Gutiérrez, A., & Villalaz, J. (2003). RELACIÓN DEL DESARROLLO GONADAL DE LA ALMEJA BLANCA (*Protothaca asperrima*) (Pelecypoda: Veneridae) CON LA TASA DE CONSUMO DE OXIGENO. *Tecnociencia*, 5(2).
- López, I., Luna, I. G., Gutiérrez, A., & Villalaz, J. (2005). CICLO REPRODUCTIVO DE LA ALMEJA BLANCA *Protothaca asperrima* (Pelecypoda: Veneridae) EN PLAYA BIQUE, ARRAIJAN. *Tecnociencia*, 7(1).
- López, S., & Arias, C. F. (2020). Rotavirus genomics. Public health impact. *Salud Publica de Mexico*, 62(1), 36-41. <https://doi.org/10.21149/9965>
- Lowther, J. A., Cross, L., Stapleton, T., Gustar, N. E., Walker, D. I., Sills, M., Treagus, S., Pollington, V., & Lees, D. N. (2019). Use of F-Specific RNA Bacteriophage to Estimate Infectious Norovirus Levels in Oysters. *Food and Environmental Virology*, 11(3), 247-258. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09383-3>
- Lu, X., & Erdman, D. D. (2006). Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Archives of Virology*, 151(8), 1587-1602. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0722-7>
- Lulla, V., Dinan, A. M., Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Sherry, L., Irigoyen, N., Nayak, K. M., Stonehouse, N. J., Zilbauer, M., Goodfellow, I., & Firth, A. E. (2019). An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nature Microbiology*, 4(2), 280-292. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0297-1>

- LWOFF, A. (1957). The concept of virus. *Journal of General Microbiology*, 17(2), 239-253. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-239>
- Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016a). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 586-602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>
- Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016b). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 586-602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>
- Macaluso, G., Guercio, A., Gucciardi, F., di Bella, S., la Rosa, G., Suffredini, E., Randazzo, W., & Purpari, G. (2021). Occurrence of Human Enteric Viruses in Shellfish along the Production and Distribution Chain in Sicily, Italy. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061384>
- Madisch, I., Wolfel, R., Harste, G., Pommer, H., & Heim, A. (2006). Molecular Identification of Adenovirus Sequences: A Rapid Scheme for Early Typing of Human Adenoviruses in Diagnostic Samples of Immunocompetent and Immunodeficient Patients. *Journal of Medical Virology*, 78(Mayo 2006), 1210-1217. <https://doi.org/10.1002/jmv.20683>
- Martínez Azcona, O., Vázquez Gómez, L., Buyo Sánchez, P., Díaz Soto, R., & Moldes Suárez, L. M. (2017). Gastroenteritis agudas y virus entéricos: impacto de la detección de norovirus. *Anales de Pediatría*, 87(3), 143-147. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.08.006>
- Martínez-Torres, A. O., Mosquera, M. M., Sanz, J. C., Ramos, B., & Echevarría, J. E. (2009). Phylogenetic analysis of rubella virus strains from an outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 158-163. <https://doi.org/10.1128/JCM.00469-08>
- Matthijnssens, J., Attoui, H., Bányai, K., Brussaard, C., Danthi, P., del Vas, M., Dermody, T., Duncan, R., Fäng, Q., Johne, R., Mertens, P., Mohd Jaafar, F., Patton, J., Sasaya, T., Suzuki, N., & Wei, T. (2021, octubre). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Reoviridae. Genus: Rotavirus - dsRNA Viruses - ICTV*. *Journal of General Virology*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsrna-viruses/w/reoviridae/1687/genus-rotavirus
- Mattner, F., Sykora, K. W., Meissner, B., & Heim, A. (2008). An adenovirus type F41 outbreak in a pediatric bone marrow transplant unit: analysis of clinical impact and preventive strategies. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(5), 419-424. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181658c46>

- McKay, S., Lee AD, Lopez, A., Nix, W., Dooling, K., Keaton, A., Spence-Davison, E., Herlihy, R., Clark, T., Hopkins, S., Pastula, D., Sejvar, J., Oberste, S., Pallansch, M., Patel, M., & Routh, J. (2018). Increase in Acute Flaccid Myelitis — United States, 2018. *MMWR*, 67, 1273-1275. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw372>
- McLeod, C., Hay, B., Grant, C., Greening, G., & Day, D. (2009). Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1809-1818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04373.x>
- McNeil, M. M., Paradowska-Stankiewicz, I., Miller, E. R., Marquez, P. L., Seshadri, S., Collins, L. C., & Cano, M. v. (2019). Adverse events following adenovirus type 4 and type 7 vaccine, live, oral in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, October 2011–July 2018. *Vaccine*, 37(44), 6760-6767. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.087>
- Melnick, J. L., Gerba, C. P., & Wallis, C. (1978). Viruses in water. *Bulletin of the World Health Organization*, 56(4), 499-508. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1969.tb03810.x>
- Mennechet, F. J. D., Paris, O., Ouoba, A. R., Salazar Arenas, S., Sirima, S. B., Takoudjou Dzomo, G. R., Diarra, A., Traore, I. T., Kania, D., Eichholz, K., Weaver, E. A., Tuailon, E., & Kremer, E. J. (2019). A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert Review of Vaccines*, 18(6), 597-613. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1588113>
- Messacar, K., Abzug, M. J., & Dominguez, S. R. (2016a). 2014 outbreak of enterovirus D68 in North America. *Journal of Medical Virology*, 88(5), 739-745. <https://doi.org/10.1002/jmv.24410>
- Messacar, K., Abzug, M. J., & Dominguez, S. R. (2016b). The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ei10-0018-2016>
- Messacar, K., Robinson, C. C., Pretty, K., Yuan, J., & Dominguez, S. R. (2017). Surveillance for enterovirus D68 in Colorado children reveals continued circulation. *Journal of Clinical Virology*, 92, 39-41. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.009>
- Ministerio de Salud de Argentina. (2015). *Fundamentos de la introducción de la vacuna contra Rotavirus*.
- Mitchell, L. S., Taylor, B., Reimels, B., Barrett, F. F., & DeVincenzo, J. P. (2000). Adenovirus 7a: A community acquired outbreak in a children's hospital. *Journal of Investigative Medicine*, 47(2), 996-1000.

- Mozgovoij, M., Miño, S., Barbieri, E. S., Tort, F. L., Victoria-Montero, M., Frydman, C., Cap, M., Baron, P. J., Colina, R., Matthijssens, J., & Parreño, V. (2022). GII.4 human norovirus and G8P[1] bovine-like rotavirus in oysters (*Crassostrea gigas*) from Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 365, 109553. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109553>
- Murphy, T. V., Gargiullo, P. M., Massoudi, M. S., Nelson, D. B., Jumaan, A. O., Okoro, C. A., Zanardi, L. R., Setia, S., Fair, E., LeBaron, C. W., Schwartz, B., Wharton, M., & Livingood, J. R. (2001). Intussusception among Infants Given an Oral Rotavirus Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 344(8), 564-572. <https://doi.org/10.1056/nejm200102223440804>
- Nasir, A., Romero-Severson, E., & Claverie, J. M. (2020). Investigating the Concept and Origin of Viruses. En *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Issue 12, pp. 959-967). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.08.003>
- Negroni, M., & Inés González, M. (2018). Virus: Generalidades. *Microbiología Estomatológica Parte I*, 69-80.
- Neubauer, D., Steinberger, J., & Skern, T. (2009). Picornaviruses. En D. Springer (Ed.), *Viral Proteases and Antiviral Protease Inhibitor Therapy* (8th ed., pp. 101-130). https://doi.org/10.1007/978-90-481-2348-3_6
- Newton, K., Meyer, J. C., Bellamy, A. R., & Taylor, J. A. (1997). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *Journal of Virology*, 71(12), 9458-9465. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9458-9465.1997>
- Ngaosuwankul, N., Thippornchai, N., Yamashita, A., Vargas, R. E. M., Tunyong, W., Mahakunkijchareon, Y., Ikuta, K., Singhasivanon, P., Okabayashi, T., & Leaungwutiwong, P. (2013). Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 Thai flood. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66(5), 398-403. <https://doi.org/10.7883/yoken.66.398>
- Nishimura, Y., & Shimizu, H. (2012). Cellular receptors for human enterovirus species A. *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR), 1-5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00105>
- Noda, M., Yoshida, T., Sakaguchi, T., Ikeda, Y., Yamaoka, K., & Ogino, T. (2002). Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 140-145. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.140-145.2002>

- Nour, I., Hanif, A., Zakri, A. M., Al-Ashkar, I., Alhetheel, A., & Eifan, S. (2021). Human adenovirus molecular characterization in various water environments and seasonal impacts in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph18094773>
- Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., Peñaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M., & Pallansch, M. A. (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enterovirus: A tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *Journal of General Virology*, 87(1), 119-128. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81179-0>
- Olalemi, A. O. (2015). *Bacteriophages as surrogates of viral pathogens: A novel tool for the shellfisheries industry*.
- Olalemi, A., Purnell, S., Caplin, J., Ebdon, J., & Taylor, H. (2016). The application of phage-based fecal pollution markers to predict the concentration of adenoviruses in mussels (*Mytilus edulis*) and their overlying waters. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1152-1162. <https://doi.org/10.1111/jam.13222>
- Olson, M. R., Axler, R. P., & Hicks, R. E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of Virological Methods*, 122(2), 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010>
- Ooi, M. H., Wong, S. C., Clear, D., Perera, D., Krishnan, S., Preston, T., Tio, P. H., Willison, H. J., Tedman, B., Kneen, R., Cardoso, M. J., & Solomon, T. (2003). Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clinical Infectious Diseases*, 36(5), 550-559. <https://doi.org/10.1086/367648>
- Organizations World Health. (2013). Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 - Recommendations. *Vaccine*, 31(52), 6170-6171. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.037>
- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 304-306. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050006>
- Paredes, C., & Cardoso, F. (2001). EL GÉNERO Donax EN LA COSTA PERUANA (BIVALVIA: TELLINOIDEA). *Rev Peru Biol*, 8(2), 83-93.
- DIRECTIVA (UE) 2020/2184 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2020 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, Diario Oficial de la Union Europea 1 (2020). <https://www.boe.es/doue/2020/435/L00001-00062.pdf>

- REGLAMENTO (UE) 2020/741 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, 32 (2020). <https://www.boe.es/doue/2020/177/L00032-00055.pdf>
- Paz-Y-Miño, M., Barzola, C., Lazcano, ; César, Ponce, M., & León, J. (2003). Coliphages as fecal pollution and removal bacterial indicators in the drinking water process. *Rev. Peru. Biol*, 10(2), 133-144. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Peláez, D., Rodríguez, J. A., Rocha, E. L., & Rey, G. J. (2010). Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica*, 30, 276-282.
- Peña, C., & Faúndes G., N. (2019). Introducción a la Virología I. *Boletín Micológico*, 33(2), 10. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2018.33.2.1387>
- Pereira Filho, E., Da Costa Faria, N. R., Fialho, A. M., De Assis, R. S., Almeida, M. M. S., Rocha, M., Galvão, M., Dos Santos, F. B., Barreto, M. L., & Leite, J. P. G. (2007). Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 313-319. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46685-0>
- Pettersson, U. (1984). Structural and Nonstructural Adenovirus Proteins. *The Adenoviruses*, 205-270. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7935-5_6
- Pilotto, M. R., Souza, D. S. M., & Barardi, C. R. M. (2019). Viral uptake and stability in *Crassostrea gigas* oysters during depuration, storage and steaming. *Marine Pollution Bulletin*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110524>
- Pina Pedrero, S. (2001). *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. Universidad de Barcelona.
- Piralla, A., Girello, A., Grignani, M., Gonzalo-Marguello, M., Marchi, A., Marseglia, G., & Baldanti, F. (2014). Phylogenetic Characterization of Enterovirus 68 Strains in Patients with Respiratory Syndromes in Italy. *Journal of Medical Virology*, 55(November 2005), 52-55. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Piralla, A., Girello, A., Premoli, M., & Baldanti, F. (2015). A new real-time reverse transcription-PCR assay for detection of human enterovirus 68 in respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1725-1726. <https://doi.org/10.1128/JCM.03691-14>
- Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically Engineered Phages: A Review of Advances over the Last Decade.

- Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 523-543.
<https://doi.org/10.1128/mnbr.00069-15>
- Ponce, L., Marrero, O., & Kouri, P. (2021). Aislamiento y diagnóstico de cepas clínicas de enterovirus humanos por métodos convencionales y moleculares. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 9(1), 1-8.
- Portal, T. M., Reymão, T. K. A., Quinderé Neto, G. A., Fiuza, M. K. D. C., Teixeira, D. M., Lima, I. C. G., Sousa Júnior, E. C., Bandeira, R. D. S., de Deus, D. R., Justino, M. C. A., Linhares, A. D. C., Silva, L. D. da, Resque, H. R., & Gabbay, Y. B. (2019). Detection and genotyping of enteric viruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil: Occurrence of adenovirus viremia by species F, types 40/41. *Journal of Medical Virology*, 91(3), 378-384. <https://doi.org/10.1002/jmv.25321>
- Primo, D., Pacheco, G. T., Timenetsky, M. do C. S. T., & Luchs, A. (2018). Surveillance and molecular characterization of human adenovirus in patients with acute gastroenteritis in the era of rotavirus vaccine, Brazil, 2012–2017. *Journal of Clinical Virology*, 109, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.010>
- Purpari, G., Macaluso, G., di Bella, S., Gucciardi, F., Mira, F., di Marco, P., Lastra, A., Petersen, E., la Rosa, G., & Guercio, A. (2019). Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *International Journal of Infectious Diseases*, 80, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.12.011>
- Raty, R., Kleemola, M., Melen, K., Stenvik, M., & Jukunen, I. (1999). Eficacia de la PCR y otros métodos de diagnóstico para la detección de infecciones respiratorias adenovirales - Rätý - 1999 - Journal of Medical Virology - Wiley Online Library. *Medical Virology*, 59(1), 66-72. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199909\)59:1<66:AID-JMV11>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199909)59:1<66:AID-JMV11>3.0.CO;2-%23)
- Rebello-de-Andrade, H., Pereira, C., Gíria, M., Prudêncio, E., Brito, M. J., Calé, E., & Taveira, N. (2010). Outbreak of acute respiratory infection among infants in Lisbon, Portugal, caused by human adenovirus serotype 3 and a new 7/3 recombinant strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1391-1396. <https://doi.org/10.1128/JCM.02019-09>
- Rekosh, D. M. K., Russell, W. C., & Bellet, A. J. D. (1977). Identification of a Protein Linked to the Ends of Adenovirus DNA. *Virology*, 11(June), 283-295.
- Rhoden, E., Zhang, M., Nix, W. A., & Oberste, M. S. (2015). In vitro efficacy of antiviral compounds against enterovirus D68. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7779-7781. <https://doi.org/10.1128/AAC.00766-15>

- RÍOS-SANDOVAL, M. (2019). CARACTERIZACIÓN GENÓMICA, MORFOLÓGICA Y REPLICATIVA DEL BACTERIÓFAGO ΦXaF18 DE *Xanthomonas vesicatoria*. *Centro De Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado De Jalisco, a. C.*, 15-22.
- Rodríguez, S. (2008). TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA 515 Enterovirus. En *Bacteriología y Virología Medica* (Vol. 24, pp. 515-518).
- Rodríguez-Frias, F., Jardi, R., & Buti, M. (2012). Hepatitis E: Molecular virology, epidemiology and pathogenesis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(10), 624-634. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.014>
- Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Calgua, B., Carratala, A., Maluquer de Motes, C., Rusiñol, M., Moresco, V., Ramos, A. P., Martínez-Marca, F., Calvo, M., Monte Barardi, C. R., Girones, R., & Bofill-Mas, S. (2014). Adenovirus and Norovirus Contaminants in Commercially Distributed Shellfish. *Food and Environmental Virology*, 6(1), 31-41. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9133-1>
- Romalde, J. L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pintó, R. M., Barja, J. L., & Bosch, A. (2002). Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 119-130. www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
- Romalde, J. L., Rivadulla, E., Varela, M. F., & Barja, J. L. (2018). An overview of 20 years of studies on the prevalence of human enteric viruses in shellfish from Galicia, Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 124(4), 943-957. <https://doi.org/10.1111/jam.13614>
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology*.
- Roux, M., & D'Hérelle, F. (2011). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli . Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences* 1917; 165:373–5. *Bacteriophage*, 1(1), 3-5. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14941>
- Rowe, W., Huebner, R., Gilmore, L., Parrott, R., & Ward, T. (1953). Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. (20714). *Proc Soc. Exp Biol and Med*, 84, 570-573.
- Ruiz-Palacios, G. M., & Pérez-Schael, Irene; Velázquez, F. Raúl; Abate, Hector; Breuer, Thomas; Clemens, SueAnn Costa; Cheuvart, Brigitte; Espinoza, Felix; Gillard, Paul; Innis, Bruce L.; Cervantes, Yolanda; Linhares, Alexandre

- C.; López, Pío; Macías-Parra, Mercedes; Ortega-Barr, M. (2006). Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 354(1), 11-22.
- Rupp, G.S., de Oliveira Neto, F.M. y Guzinski, J. (2008). Estado actual del cultivo de moluscos en México. En *FAO Actas de Pesca y Acuicultura* (Vol. 12, Issues 20-24).
- Russell, K. L., Hawksworth, A. W., Ryan, M. A. K., Strickler, J., Irvine, M., Hansen, C. J., Gray, G. C., & Gaydos, J. C. (2006). Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine*, 24(15), 2835-2842. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.062>
- Saavedra, M., Tovar, C., & Bentancourt, W. (2012). Virus entéricos en ambientes acuáticos: Métodos de concentración Y detección. *Interciencia*, 37(4).
- Saavedra, M., Tovar, C., & Betancourt, W. Q. (2012). Virus entéricos en Ambientes Acuáticos: Métodos De Concentración y detección. *Interciencia*, 37(4), 260-265.
- Salgado, S. (2005). Infecciones por adenovirus. *Medwave*, 5(04). <https://doi.org/10.5867/MEDWAVE.2005.04.2385>
- Sallam, M., Mahafzah, A., & Şahin, G. Ö. (2022). Hepatitis of Unknown Origin and Etiology (Acute Non HepA-E Hepatitis) among Children in 2021/2022: Review of the Current Findings. *Healthcare (Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/healthcare10060973>
- Santos, G., Borraz, M., & Reyes, J. (2004). La naturaleza e importancia de los virus. *Ciencia y Cultura Elementos*, 11(053), 25-31.
- Saucedo-Uriarte, J. A., Honorio-Javes, C. E., Vallenas-Sánchez, Y. P. A., & Acuña-Leiva, A. (2020). *Bacteriófagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de partida en la acuicultura ecológica*. <https://doi.org/https://doi.org/10.36610/j.jsars.2020.110200107>
- Savón, C., Goyenechea, A., Oropesa, S., Valdés, O., Acosta, B., González, G., Pérez, L., Palerm, L., & Piñon, A. (2003). *Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral*.
- Schmitz, H., Wigand, R., & Heinrich, W. (1983). Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *American Journal of Epidemiology*, 117(4), 455-466. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113563>

- Schoenfeld, T., Patterson, M., Richardson, P. M., Wommack, K. E., Young, M., & Mead, D. (2008). Assembly of viral metagenomes from Yellowstone hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4164-4174. <https://doi.org/10.1128/AEM.02598-07>
- Scholthof, K.-B. (1997). Tobacco mosaic virus. *Plant Health Instructor*, 83. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2000-1010-01>
- Seo, D. J., Lee, M. H., Son, N. R., Seo, S., Lee, K. B., Wang, X., & Choi, C. (2014). Seasonal and regional prevalence of norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and rotavirus in shellfish harvested from South Korea. *Food Control*, 41(1), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.020>
- Shaheen, M. N. (2018). Burden of Adenovirus, Astrovirus, Norovirus and Rotavirus Gastroenteritis in Egyptian Children during 2000-2017. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 07(03). <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000283>
- Shao, Y., & Wang, I. N. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, 180(1), 471-482. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>
- Shih, Y. J., Chen, J. S., Chen, Y. J., Yang, P. Y., Kuo, Y. J., Chen, T. H., & Hsu, B. M. (2021). Impact of heavy precipitation events on pathogen occurrence in estuarine areas of the Puzi River in Taiwan. *PLoS ONE*, 16(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256266>
- Shult, P. A., Polyak, F., Dick, E. C., Warshauer, D. M., King, L. A., & Mandel, A. D. (1991). Adenovirus 21 infection in an isolated Antarctic station: Transmission of the virus and susceptibility of the population. *American Journal of Epidemiology*, 133(6), 599-607. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115932>
- Simhon, A., Amato, S., Hernández, F., Yolken, R. H., & Mata, L. (1979). Diagnóstico de Rotavirus por microscopia electrónica y el ensayo inmunosorbente enzima conjugada (ELISA). *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, 86(5), 391-397.
- Slatter, M. A., Read, S., Taylor, C. E., Crooks, B. N. A., Abinun, M., Flood, T. J., Cant, A. J., Wright, C., & Gennery, A. R. (2005). Adenovirus type F subtype 41 causing disseminated disease following bone marrow transplantation for immunodeficiency. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1462-1464. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1462-1464.2005>

- Soler, M., Lobos, S., Lorca, M., & Navarrete, E. (2009). Enterovirus en aguas naturales de Valparaíso: una propuesta metodológica para su análisis. *Biología Marina y Oceanografía*, 44(2), 511-516.
- Souza, D. S. M., Dominot, A. F. Á., Moresco, V., & Barardi, C. R. M. (2018). Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliensis* clams (Gmelin, 1791). *International Journal of Food Microbiology*, 266, 363-371. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.004>
- Souza, Y. F. V. P. de, Souza, E. V. de, Azevedo, L. S. de, Medeiros, R. S., Timenetsky, M. do C. S. T., & Luchs, A. (2021). Enteric adenovirus epidemiology from historical fecal samples in Brazil (1998–2005): Pre-rotavirus vaccine era. *Infection, Genetics and Evolution*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105007>
- Stock, I. (2014a). [Hand, foot and mouth disease--more than a harmless «childhood disease»]. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, 37(1), 4-10; quiz 11.
- Stock, I. (2014b). [Human rhinovirus diseases--epidemiology, treatment and prevention]. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, 37(2), 44-53.
- Suffredini, E., Lanni, L., Arcangeli, G., Pepe, T., Mazzette, R., Ciccaglioni, G., & Croci, L. (2014). Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve mollusks harvested in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026>
- Sulbarán, M. Z., Maldonado, A. J., Antonio, J., Rojas, Y., & Bastardo, J. W. (2002). Características clínicas de la gastroenteritis por rotavirus y su asociación con distintos electroferotipos. *Kasmera*, 30(2), 126-136.
- Sun, Z. W., Fu, Y., Lu, H. L., Yang, R. X., Goyal, H., Jiang, Y., & Xu, H. G. (2021). Association of Rotavirus Vaccines with Reduction in Rotavirus Gastroenteritis in Children Younger Than 5 Years: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials and Observational Studies. *JAMA Pediatrics*, 175(7), e210347-e210347. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.0347>
- Suñén, E., & Sobsey, M. D. (1999). Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR methods. En *Journal of Virological Methods* (Vol. 77).
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 801-812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>

- Tamayo, L., Berti, M., & Moreno, O. (2007). Rotavirus Actualizacion. *Revista Boliviana*, 52(1).
- Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T. J., & Kaiser, L. (2013). Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 14(1), 282-293. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., & Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(2), 136-141. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5)
- Teng, S., Zhao, S. yong, Wei, Y., Shao, Q. min, Jiang, M. Ying, Cui, D. Wei, & Xie, G. liang. (2013). [Observation on virus shedding periods of enterovirus-71 and coxsackievirus A 16 monitored by nucleic acids determination in stool samples of children with hand, foot and mouth disease]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi. Chinese Journal of Pediatrics*, 51(10), 787-792.
- Tey, B. T., Ooi, S. T., Yong, K. C., Ng, M. Y. T., Ling, T. C., & Tan, W. S. (2009). Production of fusion m13 phage bearing the di-sulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 268-273.
- Torres Martínez, C. (2013). *Vacunación contra rotavirus: una historia exitosa de impacto en la vida real* | Sociedad Colombiana de Pediatría | SCP. Sociedad Colombiana de Pediatría | SCP. <https://scp.com.co/notas-destacadas/vacunacion-contra-rotavirus-una-historia-exitosa-de-impacto-en-la-vida-real/>
- TRAJANO, D. (2013). *BACTERIOPHAGES AS INDICATORS OF HUMAN ENTERIC VIRUSES IN MUSSELS (MYTILUS EDULIS)* [Thesis of Doctor of Philosophy]. University of Brighton.
- Trallero, G., & Avellón, A. (2003). Importancia del diagnostico de los echovirus desde el punto de vista epidemiológico. circulación de echovirus 11 en los últimos años en españa. *Control Calidad SEIMC*, 6.
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 165-177. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Twort, F. W. (1915). an Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241-1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)

- Uhnöo, I., Wadell, G., Svensson, L., & Johansson, M. E. (1984a). Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), 365-372. <https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.365-372.1984>
- Uhnöo, I., Wadell, G., Svensson, L., & Johansson, M. E. (1984b). Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), 365-372. <https://doi.org/10.1128/JCM.20.3.365-372.1984>
- Uprety, P., Curtis, D., Elkan, M., Fink, J., Rajagopalan, R., Zhao, C., Bittinger, K., Mitchell, S., Ulloa, E. R., Hopkins, S., & Graf, E. H. (2019). Association of enterovirus D68 with acute flaccid myelitis, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2009-2018. *Emerging Infectious Diseases*, 25(9), 1676-1682. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190468>
- van der Avoort, H. G. A. M., Adrian, T., Wigand, R., Wermenbol, A. G., Zomerdijs, T. P., & de Jong, J. C. (1986). Molecular epidemiology of adenovirus type 21 in The Netherlands and the Federal Republic of Germany from 1960 to 1985. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6), 1084-1088. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.6.1084-1088.1986>
- van der Avoort, H. G. A. M., Wermenbol, A. G., Zomerdijs, T. P. L., Kleijne, J. A. F. W., van Asten, J. A. A. M., Jensma, P., Osterhaus, A. D. M. E., Kidd, A. H., & de Jong, J. C. (1989). Characterization of fastidious adenovirus types 40 and 41 by DNA restriction enzyme analysis and by neutralizing monoclonal antibodies. *Virus Research*, 12(2), 139-157. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(89\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(89)90060-9)
- Van der Donck, I., Van Hoovels, L., De Leener, K., Goegebuer, T., Vanderwegen, L., Frans, J., Rahman, M., & Van Ranst, M. (2003). Seizoensgebonden diarree door rotaviruses in België gedurende 1981-2002. *Acta Clinica Belgica*, 58(1), 12-18. <https://doi.org/10.1179/acb.2003.58.1.002>
- Velázquez, R. F., Linhares, A. C., Muñoz, S., Seron, P., Lorca, P., DeAntonio, R., & Ortega-Barria, E. (2017). Efficacy, safety and effectiveness of licensed rotavirus vaccines: A systematic review and meta-analysis for Latin America and the Caribbean. *BMC Pediatrics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0771-y>
- Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., André, F. E., & Zissis, G. (1984). Protection of Infants Against Rotavirus Diarrhoea By Rit 4237 Attenuated Bovine Rotavirus Strain Vaccine. *The Lancet*, 323(8384), 977-981. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)92323-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)92323-7)

- Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., Dallas, M. J., Heyse, J. F., Goveia, M. G., Black, S. B., Shinefield, H. R., Christie, C. D. C., Ylitalo, S., Itzler, R. F., Coia, M. L., Onorato, M. T., Adeyi, B. A., Marshall, G. S., Gothefors, L., ... Heaton, P. M. (2006). Safety and Efficacy of a Pentavalent Human–Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 23-33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa052664>
- Villena Portella, C. (2003). *Vigilancia Ambiental Molecular De Rotavirus Grupo a Humanos*. 191.
- Voevodin, A. F., & Marx, P. A. (2010). Simian Virology A. F. Voevodin , P. A. Marx Jr . 2009. Simian Virology. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. 511 pp. ISBN 978-0-81382-423-1, price (hardbound), \$199.99. *Journal of Mammalogy*, 91(6), 1529-1530. <https://doi.org/10.1644/10-mamm-r-153.1>
- Vos, H. J., & Knox, C. M. (2018). The recovery and molecular identification of HAdV-D17 in raw sewage and mussel samples collected in the Eastern Cape province of South Africa. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 33(1), 4-7. <https://doi.org/10.1080/23120053.2017.1368617>
- Vyas, J. M. (2019). *Enterovirus D68*. MedlinePlus Enciclopedia Médica. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000782.htm>
- Wang, C., Liu, J., Mi, Y., Chen, J., Bi, J., & Chen, Y. (2021). Clinical features and epidemiological analysis of respiratory human adenovirus infection in hospitalized children: a cross-sectional study in Zhejiang. *Virology Journal*, 18(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01705-x>
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127-181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
- Winnacker, E.-L. (1978). Adenovirus DNA: Structure and function of a novel replicon. *Cell*, 14(4), 761-773. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90332-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90332-X)
- Witsø, E., Palacios, G., Cinek, O., Stene, L. C., Grinde, B., Janowitz, D., Lipkin, W. I., & Rønningen, K. S. (2006). High prevalence of human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4095-4100. <https://doi.org/10.1128/JCM.00653-06>
- Wong, C. M., McFall, E. R., Burns, J. K., & Parks, R. J. (2013). The role of chromatin in adenoviral vector function. *Viruses*, 5(6), 1500-1515. <https://doi.org/10.3390/v5061500>

- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D. J., Mullen, T.-M., Mikyas, Y., Stewart, P. L., & Nemerow, G. R. (2003). Flexibility of the Adenovirus Fiber Is Required for Efficient Receptor Interaction. *Journal of Virology*, 77(13), 7225-7235. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7225-7235.2003>
- Yamadera, S., Yamashita, K., Akatsuka, M., Kato, N., & Inouye, S. (1998). Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 51(1), 43-51.
- Yamamoto, D., Okamoto, M., Lupisan, S., Suzuki, A., Saito, M., Tamaki, R., Tandoc, A., Mercado, E., Sombrero, L., Olveda, R., & Oshitani, H. (2014). Impact of human adenovirus serotype 7 in hospitalized children with severe fatal pneumonia in the Philippines. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 67(2), 105-110. <https://doi.org/10.7883/yoken.67.105>
- Yeung, R., Eshaghi, A., Lombos, E., Blair, J., Mazzulli, T., Burton, L., & Drews, S. J. (2009). Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virology Journal*, 6, 2006-2008. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-11>
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., & Yamashita, T. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 98(10), 2421-2422. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000911>
- Zhao, S., Wan, C., Ke, C., Seto, J., Dehghan, S., Zou, L., Zhou, J., Cheng, Z., Jing, S., Zeng, Z., Zhang, J., Wan, X., Wu, X., Zhao, W., Zhu, L., Seto, D., & Zhang, Q. (2014). Re-emergent human adenovirus genome type 7d caused an acute respiratory disease outbreak in southern China after a twenty-one-year absence. *Scientific Reports*, 4, 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep07365>
- Zheng, B. J., Chang, R. X., Ma, G. Z., Xie, J. M., Liu, Q., Liang, X. R., & Ng, M. H. (1991). Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *Journal of Medical Virology*, 34(1), 29-37. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890340106>

ANEXOS

Procesamiento de las muestras



Figura 37. Manejo de las muestras de bivalvos en la cámara de flujo laminar manteniendo la asepsia de las muestras.



Figura 38. Limpieza de las muestras de bivalvos previo al procesamiento.

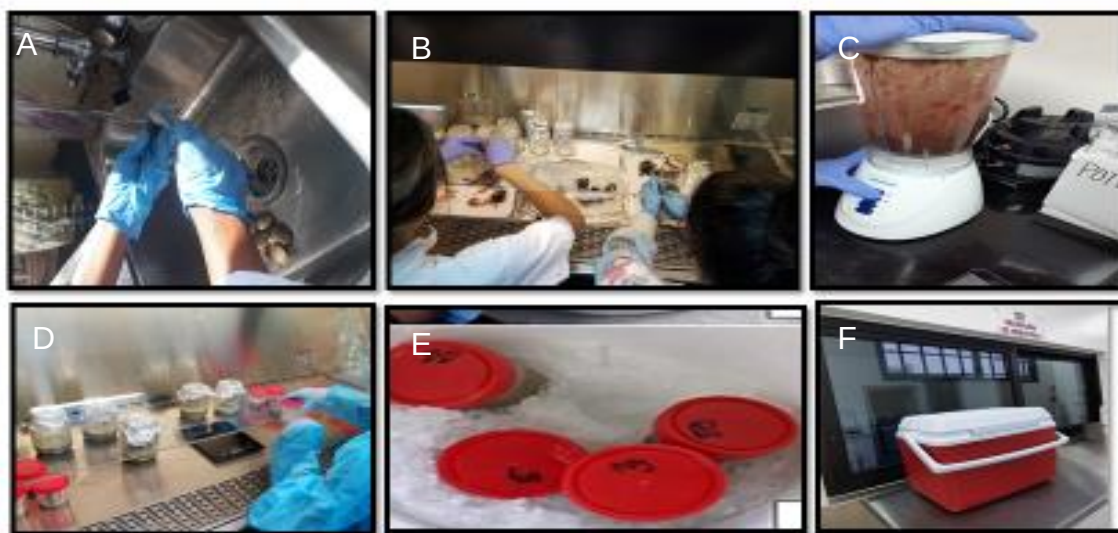


Figura 39. **A.** Limpieza externa de los bivalvos. **B.** Apertura de los bivalvos dentro de la cámara de bioseguridad **C.** Licuado de las almejas según los periodos de tiempo **D.** Separación del licuado del bivalvo para la distribución de los diferentes grupos que conforman el proyecto **E.** Conservación del licuado por número de muestra para realizar los

vortex y centrifugación de las muestras **F.** Traslado de las muestras a los diferentes laboratorios para los procesamientos.

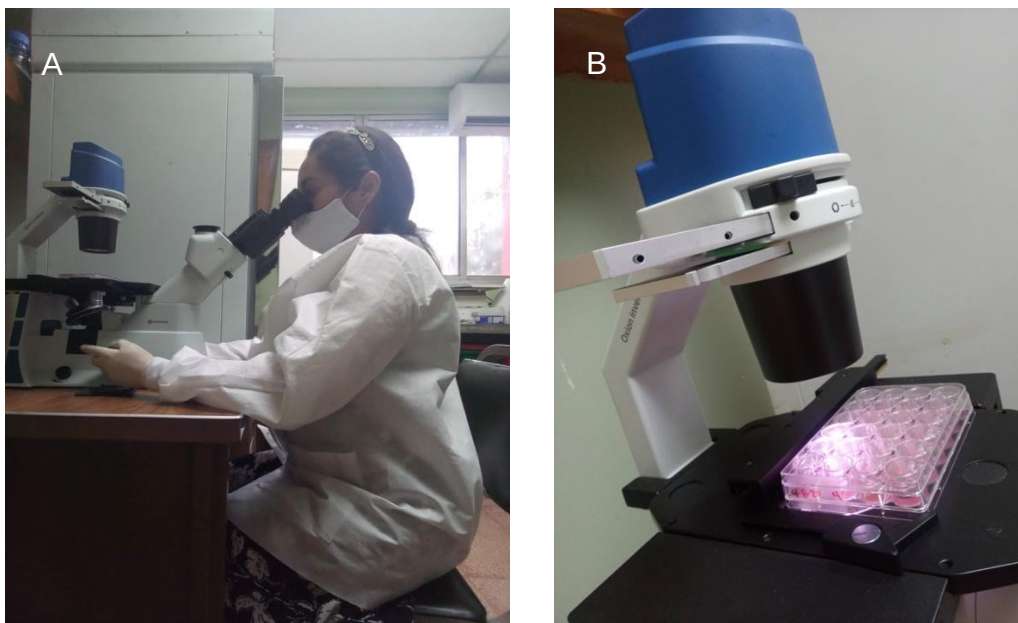


Figura 40. **A.** Observación de ECP en las células Vero, luego de infección viral con muestras de bivalvos. **B.** Platos de 24 pocillos en el microscopio invertido para la observación y monitoreo del ECP en las células.

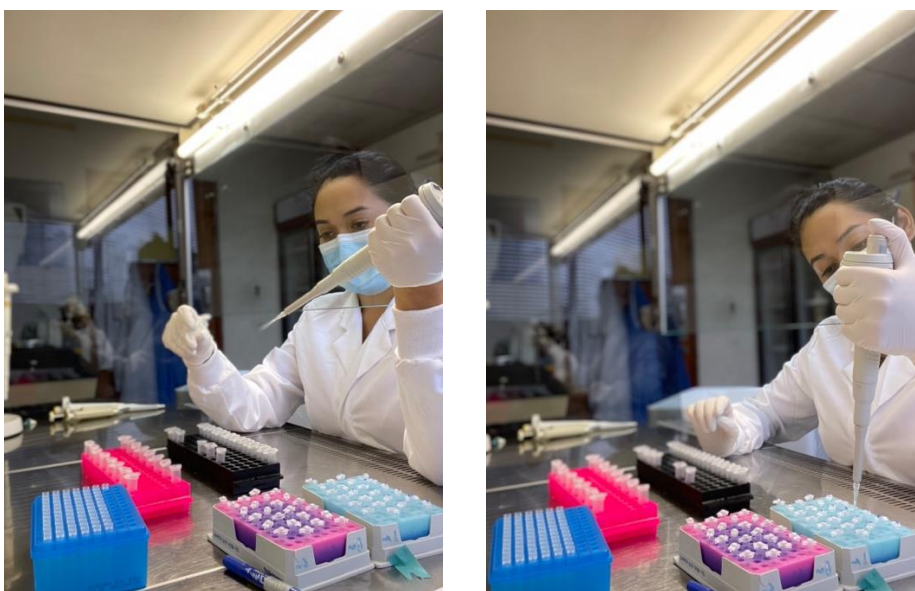


Figura 41. Preparación para la detección de virus en muestras de bivalvos.

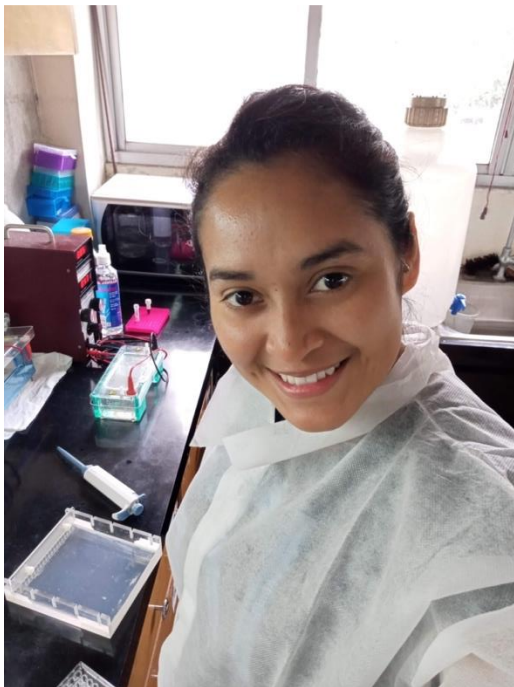


Figura 42. Preparación de gel de agarosa al 1.5% para el revelado de las bandas esperadas (electroforesis), post amplificación.