



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
TESIS DE LICENCIATURA

**“DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS EN MUESTRAS DE AIRE
Y AGUA PROVENIENTES DE LA BAHÍA DE PANAMÁ EN TEMPORADA SECA,
2021”.**

PRESENTADO POR:

KRYSTEL DÍAZ 8-941-1350

HERMELYNN HIDALGO 8-945-2005

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ALEX O. MARTÍNEZ TORRES

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

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2024

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

Ciudad Universitaria

Por este medio se hace constar que el proyecto de Trabajo de Graduación, titulado: **Detección molecular de virus entéricos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en temporada seca, 2021.** Ha sido recomendado por el departamento de Microbiología y Parasitología.

El trabajo será elaborado por las estudiantes: Krystel Díaz 8-941-1350

Hermelynn Hidalgo 8-945-2005

Dr. Alex O. Martínez Torres

Asesor Principal

Mgtr.. Humberto Cornejo

**Director del Departamento de
Microbiología y Parasitología**

Dr. Jordi Querol-Audi

Asesor

Dra. Sara Ahumada Ruiz

Asesora

Aprobado por: _____

Fecha _____

Yolanda Aguilar, Ph.D.

Directora de la Escuela de Biología

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

TÍTULO: Detección molecular de virus entéricos en muestras de aire y agua provenientes de la Bahía de Panamá en temporada seca, 2021

AUTORES: Krystel Díaz 8-941-1350

Hermelynn Hidalgo 8-945-2005

ASESORES:

Alex O. Martínez Torres _____

Asesor Principal

Firma del Profesor.

Sara Ahumada Ruíz _____

Asesora

Firma del Profesor.

Jordi Querol-Audi _____

Asesor

Firma del Profesor.

DURACIÓN: 12 meses

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

FECHA: _____ de _____.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por haberme permitido cumplir una de mis metas. A toda mi familia principalmente a mi madre, Yanireth Gallardo y hermano José Alberto Díaz por sus sacrificios, por creer en mí y siempre brindarme su amor y apoyo incondicional durante todos estos años de estudio. A mis amigos Kevin y Analía por sus consejos y palabras de aliento en mis peores momentos. En especial a mi compañera de tesis Hermelynn Hidalgo por su apoyo durante este largo camino de aprendizaje y superación. También, a nuestros profesores asesores y todas las personas que nos brindaron sus conocimientos, apoyo y dedicándonos su valioso tiempo que hicieron posible la realización y culminación de esta tesis.

Krystel Zaizeth Diaz Gallardo

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que contribuyeron brindando sus conocimientos y dedicando su valioso tiempo. En especial a mi compañera tesista Krystel Díaz por involucrarme en este proyecto y por trabajar juntas para superar los desafíos. Agradezco a todos los profesores asesores por su confianza y paciencia al guiarnos a lo largo de este camino. También quiero reconocer el papel fundamental de mi madre, Luz Marina, y mis tíos, Ida y Lynn Hooks, quienes han sido pilares importantes en mi formación. Por último y más importante al Gohonzon por darme fuerza, salud y sabiduría cada día.

Hermelynn Yolanda Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecemos a Dios sobre todas las cosas por habernos permitido culminar con éxito este trabajo.

Agradecemos a los profesores asesores, Dr. Alex O. Martínez-Torres (Asesor principal), Dr. Jordi Querol-Audi, Dra. Sara Ahumada-Ruiz, por el tiempo y la dedicación puesta durante el periodo de realización de la tesis, sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

Al Ministerio de Ambiente por la financiación del proyecto mediante el convenio N° 0-26-45-2019 de detección molecular y análisis filogenético de virus, bacteriófagos, bacterias, hongos filamentosos y parásitos patógenos en aire y agua provenientes de la bahía de Panamá del fondo de agua, áreas protegidas y vida silvestre, donde el investigador principal es el Dr. Alex O. Martínez Torres.

A la Lic. Janell Mague por toda su dedicación, orientación, paciencia y ayuda para el desarrollo de este proyecto.

A los laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y de Microbiología de Agua (LAMA) por habernos apoyado en cuanto a los equipos e insumos requeridos para realizar este trabajo.

Al Departamento de farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, por el apoyo con equipos especializados (Ultracentrífuga refrigerada) para el procesamiento de las muestras.

A todos personas y amigos que de una u otra manera colaboraron para la realización de esta meta.

A todos ustedes muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	8
MARCO TEÓRICO	8
Los Virus.....	9
Distribución de los virus en el ambiente.....	9
Virus entéricos	11
Gastroenteritis vírica.....	12
Adenovirus.....	14
Estructura	14
Patogénesis.....	15
Manifestaciones clínicas	16
Manifestaciones clínicas poco comunes	18
Epidemiología	20
Rotavirus.....	20
Estructura	21
Forma de transmisión	22
Patogénesis.....	23
Manifestaciones clínicas	24
Epidemiología	24
Enterovirus.....	25
Estructura	25
Forma de transmisión	26
Patogénesis.....	27
Manifestaciones clínicas	27
Epidemiología	29
Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales	29
Muestreo de virus transmitidos por el aire	29
Muestreo de virus transmitidos por agua	30

Concentración de virus por Ultracentrifugación.....	31
Métodos de detección y cuantificación de virus en agua.....	31
Cultivo Celular para Aislamiento Viral	31
Reacción en Cadena de la Polimerasa	32
Transcripción Inversa o Reversa (RT)-PCR.....	32
PCR anidada o nested	33
Electroforesis	33
OBJETIVOS	35
HIPÓTESIS	36
CAPÍTULO II.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Área de estudio	38
Fase de campo.....	38
Sitios de muestreo	38
Diseño experimental	39
Colecta de muestras.....	39
Fase de laboratorio.....	40
Clarificación de las muestras de agua	41
Concentración de ADN con Polietilenglicol (PEG).....	41
Filtrado de muestras	42
Cultivo celular	42
Extracción de ácidos nucleicos totales en muestras de cultivo celular y directas.....	46
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	47
Detección molecular de AdV con la técnica de ICC-PCR anidada	47
Detección molecular de EV con la técnica de ICC-RT-PCR anidada	48
Detección molecular de RoV con la técnica de RT-PCR anidada	49
PCR anidada.....	50
Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis	50
CAPÍTULO III	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52

Resultados.....	53
Aislamiento Viral.....	53
Detección molecular en cultivo celular.....	58
Detección molecular de AdV en matriz de aire y agua.....	58
Detección molecular de EV en matriz de aire y agua.....	61
Detección molecular en muestras directas.....	65
Detección molecular de AdV en matriz de aire y agua.....	65
Detección molecular de EV en matriz de aire y agua.....	68
Detección molecular de RoV en matriz de aire y agua.....	71
Discusión.....	76
CAPÍTULO IV.....	86
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86
Conclusiones.....	87
Recomendaciones.....	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXO.....	115

Índice de Tablas

Tabla 1. Sitios de muestreo.....	39
Tabla 2. Codificación de las muestras, según el punto de muestreo, matriz y mes en que se realizó la colecta.	40
Tabla 3. Volumen de soluciones para la preparación de medio de cultivo de crecimiento al 10% y mantenimiento al 2% en volumen final de 500 mL.	45
Tabla 4. Criterio para valorar la sensibilidad en la línea celular según la proporción de las células que manifiestan efecto citopático (ECP) (Mcintosh, 1996).	46
Tabla 5. Secuencia (5´- 3´) específica para 60 serotipos de AdV humanos.	48
Tabla 6. Secuencia (5´- 3´) específica para la detección de EV humanos.....	49
Tabla 7. Secuencia (5´- 3´) específica para la detección de RoV humanos.	50
Tabla 8. ECP de nivel dos (++) y tres (+++) en matriz de aire en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021.....	54
Tabla 9. ECP de nivel uno (+), dos (++) y tres (+++) en la matriz de agua en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021.	56

Índice de Figuras

- Figura 1.** Diagrama de la partícula vírica de AdV, mostrando las proteínas mayoritarias de la cápside, proteínas estabilizadoras de la cápside y las proteínas core asociadas al ADN (Pedrero, 2001). 15
- Figura 2.** Características estructurales de RoV. A. Reconstrucción mediante la criomicroscopía electrónica de la partícula de RoV. Las espículas de la proteína VP4 se indican en rojo y la proteína que conforma la capa exterior, VP7 en amarillo. B. Un corte transversal de la partícula viral muestra las cubiertas internas, en azul VP6 y en verde VP2. Las enzimas VP1 y VP3 se muestran en rojo en la capa interna. Imagen extraída y modificada de Jayaram *et al.*, 2004 (Gillman, 2016). 22
- Figura 3.** Ilustración de la estructura de la cápside de Enterovirus. Las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 se encuentran en la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en la cara interna de la misma. En el interior se encuentra un ARN+ monocatenario unido a la proteína viral VPg (Hernández, 2014). 26
- Figura 4.** Vista panorámica de los sitios de muestreo a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá (Realizada en este trabajo con Google Earth). 38
- Figura 5.** Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de aire. A). Células inoculadas con medio de mantenimiento (DMEM + 2% SFB) (control negativo). B). Células inoculadas con AdV (control positivo). C). Muestra río Matasnillo de marzo donde se evidencio ECP + 24 h post-infección. D). Muestra del HST de mayo donde se evidencio ECP +++ a las 24 h post-infección. E). Muestra del HST de marzo donde se evidencio ECP ++ a las 48h post-infección. F). Muestra del Club Unión de abril, segundo pasaje, donde se evidencio ECP ++ a las 96 h post-infección 54
- Figura 6.** Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de agua. A). Células inoculadas con medio de mantenimiento (DMEM + 2% SFB) (control negativo). B). Células inoculadas con EV (control positivo). C). Muestra de Costa del Este de marzo donde se evidencio ECP ++. D). Muestra del río Matasnillo de marzo donde se evidencio ECP +++ a las 48 h post-infección, E). Muestra de Boca la Caja de abril donde se evidencio ECP +++ a las 24h post-

infección, F). Muestra de la Antigua ARI de mayo donde se evidencio ECP + a las 96 h post-infección. 56

Figura 7. Efecto citopático en matriz de agua y aire de los doce puntos de muestreo de la Bahía de Panamá con respecto al nivel categorizado de ECP 58

Figura 8. Porcentaje de ECP en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021 con respecto al ECP en cultivo celular por presencia viral. 58

Figura 9. Detección de AdV en matriz de aire en cultivo celular del primer pasaje, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, y 8 µL de producto de la PCR + 2 µL de loading buffer. Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 13 – Ai 27. Código de muestras: Ai: aire. 13 a 27: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo el control positivo. 59

Figura 10. Repetición de la detección de AdV en matriz de aire y agua en cultivo celular del primer pasaje, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. A). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Controles positivos), Ai 22 a Ai 24, Ag 44, Ag 50 a Ag 54, Ag 65 y Ag 38. Código de muestras: Ag: agua y Ai: aire. 22-24, 44, 50-54, 65 y 38: número de muestra. Se amplificaron los controles positivos y la muestra 24 (Isla Flamenco, mes de abril en aire) y 54 (Salida de río Matasnillo, mes de abril en agua). 60

Figura 11. Porcentaje de Positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de cultivo celular por presencia de AdV. 61

Figura 12. Prueba de controles positivos de EV, visualizados en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. Orden de muestra: M (marcador de peso molecular), C- (control negativo), 1C+, 2C+ y 3C+ (controles positivos). Los tres controles positivos amplificaron en el tamaño esperado. 62

Figura 13. Detección de EV en matriz de aire del primer pasaje de cultivo celular, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. A). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a 21. B). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), 1C+, 2C+ (Control positivo), C- (Control negativo), Ai 22 y Ai

23. Código de muestras: Ai: aire. 1-21, 22–23: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo los controles positivos. 63

Figura 14. Detección de EV en matriz de agua del primer pasaje en cultivo celular, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (control positivo), C- (control negativo), Ag 48 a Ag 63. B). Orden de las muestras: M (marcador de peso molecular), C+ (control positivo), C- (control negativo), Ag 64 a Ag 72, Ag 47. C). Códigos de muestras: Ag: agua. 48 a 63, 64 a 72, 47: número de muestra. Amplificaron 6 muestras, dos pertenecen a marzo: 47 (Antigua ARI) y 48 (Isla Flamenco), 2 corresponden a abril 53 (Club Unión) y 60 (Isla Flamenco) y las 2 restantes corresponden a mayo 61 (Costa del Este) y 68 (Mercado de Mariscos)..... 64

Figura 15. Porcentaje de positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de cultivo celular por presencia de EV..... 65

Figura 16. Detección de AdV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 1 a Ai 21. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 22 a Ai 24. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 21, 22 a 24: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo el control positivo. 66

Figura 17. Detección de AdV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 26 a Ai 36, Ag 37 a Ag 47. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ag 48 a Ag 69. Código de muestras: Ai: aire. 26 a 36, 37 a 47 y 48 a 69: número de muestra. Se reportó solo 1 muestra positiva en la matriz de agua, correspondiente a la 38 (Panamá La Vieja de marzo). 67

Figura 18. Porcentaje de Positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de muestras directas por presencia de AdV..... 68

Figura 19. Detección de EV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de

muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a Ai 21. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 22 a Ai 36. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 21, 22 a 36: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo los controles positivos a excepción del 2C+ de la segunda columna..... 69

Figura 20. Detección de EV en muestras directas de aire y agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (Control positivo), C- (Control negativo), Ai 36, Ag 37 a Ag 57. Código de muestras: Ai: aire, Ag: agua. 36, 37 a 57: número de muestra. Solo amplificó una muestra la 49 correspondiente al mes de abril (Costa del este), al contrario del control positivo que no amplificó. 70

Figura 23. Prueba de controles positivos y cebadores de PCR anidada de RoV, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), 1 a 11 (Controles positivos) con el cebador RoV 2.2 R-. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), 1 a 11 (Controles positivos) con el cebador RoV 2.1R-. El cebador RoV 2.1 R- fue el que mejor amplificó a 8/11 controles positivos con el tamaño de banda esperado de 381 pb. 72

Figura 24. Detección de RoV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+, 2C+, 3C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a Ai 19. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 19 número de muestras. Solo amplificó 2/3 de los controles positivos y no hubo amplificación en ninguna de las muestras directas..... 72

Figura 26. Detección de RoV en muestras directas de agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 31, Ag 38 y Ag 49. Código de muestras: Ai: Aire, Ag: agua. 31, 38 y 49: número de muestras. Amplificaron las tres muestras. 74

Figura 27. Porcentaje de positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras directas positivas por presencia de RoV.....	75
Figura 28. Punto de muestreo y colecta de muestras de aire y agua en la Bahía de Panamá.	116
Figura 29. A. Procesamiento de muestras de aire y agua dentro de la cámara de flujo laminar. B. Filtrado de muestras.....	116
Figura 30. A. Preparación de medios de crecimiento 10%. B. Cambio de medio a células en botella de 75 cm ²	117
Figura 31. A. Preparación de platos de 24 pocillos. B. Infección viral.....	117
Figura 32. Revisión de ECP en células Vero en microscopio invertido, luego de infección viral con muestras de aire y agua de la Bahía de Panamá.	118
Figura 33. Clarificación de muestras de cultivo celular, después de la semana de incubación.	118
Figura 34. A. Extracción de los ácidos nucleicos virales se utilizó el kit de extracción Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification (Promega, EE.UU). B. Cuantificación de muestras con Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).....	119
Figura 35. A. Preparación de la mezcla maestra para PCR en cámara de flujo laminar. B. Montaje de muestras en termociclador. C. Montaje de muestras en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5x.....	119

RESUMEN

El agua y el aire son recursos naturales, únicos y escasos, esenciales para la vida. El área metropolitana de la ciudad de Panamá produce diariamente más de 140 millones de galones de aguas residuales contaminantes (casi el equivalente a la producción diaria de agua potable de la planta potabilizadora de Chilibre) (Panamá América, 2006), los cuales han provocado la situación actual de descargas de aguas residuales domésticas, urbanas e industriales sin tratamiento alguno (Pinto y Yee, 2011; ARAP, 2010), ya que son vertidas al sistema de recolección del alcantarillado sanitario, al sistema de drenaje pluvial o a las quebradas (Panamá América, 2006), y ríos cercanos como: el río Matasnillo, Matías Hernández y Pacora, entre otros, los cuales son residuos que desembocan en la Bahía de Panamá, y como consecuencia, se da la contaminación del agua (Pinto y Yee, 2011; ARAP, 2010), y el aire en la bahía (González y González, 2015). El muestreo de aire y agua de la bahía de Panamá se llevó a cabo en la temporada seca (marzo, abril y mayo) de 2021, para la detección de adenovirus (AdV), enterovirus (EV) y rotavirus (RoV). Se colectaron 36 muestras de aire y 36 de agua correspondiente a 12 estaciones desde Costa del Este hasta la Calzada de Amador en la bahía de Panamá. Dentro de los resultados se obtuvo un 100% de efecto citopático (ECP) o aislamiento viral de muestras de agua y 92% de muestras de aire. En la detección molecular se obtuvo 6.94% de las muestras directas positivas (5/72) de las cuales 4 de estas fueron provenientes de la matriz de agua en los puntos de Costa del Este para EV y RoV, y 1 en la matriz de aire en el punto del Hospital del Niño para RoV. El 11.11% de las muestras de cultivo celular (8/72), de las cuales 7 de estas fueron provenientes de la matriz de agua en los puntos Río Matasnillo en AdV, y Antigua Ari, Isla Flamenco, Club Unión, Costa del Este y Mercado de Marisco en EV. Estos resultados fueron obtenidos con la técnica ICC-RT-PCR e ICC-PCR anidada. Los puntos con más prevalencia de muestras positivas fueron Isla Flamenco con 3 muestras positivas, Costa del Este con 3 muestras positivas, seguido por Panamá La Vieja con 2 muestras positivas. Es relevante señalar que estos puntos pueden ser clasificados como zona residencial (Costa del Este y Panamá La Vieja), y zona de recreación (Costa del Este y Panamá La Vieja), ya que mucha de la población va a estos lugares a recrearse y por lo menos Isla Flamenco y Panamá La Vieja son zonas donde suelen transcurrir muchos turistas. Estos resultados serán de suma importancia para las autoridades de salud, ya que les permitirán tomar medidas preventivas adecuadas para evitar posibles brotes de virus entéricos.

Palabras claves: Enterovirus, Rotavirus, Adenovirus, cultivo celular, RT-PCR.

ABSTRACT

Water and air are natural, unique, and scarce resources essential for life. The metropolitan area of Panama City produces over 140 million gallons of contaminating wastewater daily (almost equivalent to the daily production of potable water from the Chilibre water treatment plant) (Panama America, 2006). These have led to the current situation of untreated domestic, urban, and industrial wastewater discharges (Pinto and Yee, 2011; ARAP, 2010), as they are discharged into the sewage collection system, stormwater drainage system, or streams (Panama America, 2006), and nearby rivers such as the Matasnillo, Matías Hernández, and Pacora rivers, among others, which discharge residues into the Panama Bay, resulting in water contamination (Pinto and Yee, 2011; ARAP, 2010), and air pollution in the bay (González and González, 2015). Air and water sampling in the Panama Bay was conducted during the dry season (March, April, and May) of 2021 for the detection of adenovirus (AdV), enterovirus (EV), and rotavirus (RoV). Thirty-six air samples and thirty-six water samples corresponding to twelve stations from Costa del Este to the Amador Causeway in the Panama Bay were collected. Within the results, a 100% cytopathic effect (CPE) or viral isolation was obtained from water samples and 92% from air samples. Molecular detection yielded 6.94% positive direct samples (5/72), with four of these originating from the water matrix at Costa del Este for EV and RoV, and one in the air matrix at the Hospital del Niño for RoV. 11.11% of cell culture samples (8/72), with seven of these originating from the water matrix at the Río Matasnillo for AdV, and Antigua Ari, Isla Flamenco, Club Unión, Costa del Este, and Mercado de Marisco for EV. These results were obtained using ICC-RT-PCR and nested ICC-PCR techniques. Points with the highest prevalence of positive samples were Isla Flamenco with 3 positive samples, Costa del Este with 3 positive samples, followed by Panamá La Vieja with 2 positive samples. It is relevant to note that these points can be classified as residential areas (Costa del Este and Panamá La Vieja) and recreation areas (Costa del Este and Panamá La Vieja), as many people go to these places for recreation, and at least Isla Flamenco and Panamá La Vieja are areas where many tourists frequent. These results will be of utmost importance for health authorities, as they will allow them to take appropriate preventive measures to avoid possible outbreaks of enteric viruses.

Keywords: Enterovirus, Rotavirus, Adenovirus, cell culture, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El agua desempeña un papel importante tanto en las actividades humanas como en los sistemas naturales y es esencial para el sostenimiento y la reproducción de la vida en el planeta ya que forma parte indispensable del desarrollo de los procesos biológicos que la hacen posible. Sin embargo, el hombre excreta una gran cantidad de virus distintos a través de las heces, la orina y otras secreciones, que constituyen contaminantes del medio acuático (Pedrero, 2001). Comúnmente esto se lleva a cabo en zonas cercanas a núcleos poblacionales, lo cual causa una gran variedad de enfermedades que afectan principalmente el tracto gastrointestinal, el hígado, la piel y mucosas, y el sistema nervioso (Pedrero, 2001).

Por otro lado, en el aire deambulan millones de virus los cuales se pueden transmitir fácilmente a través de los aerosoles o con un simple contacto. Las enfermedades transmitidas por el aire pueden propagarse cuando las personas con ciertas infecciones tosen, estornudan o hablan, arrojando al aire secreciones nasales y de garganta (Pietrangelo, 2021). Según los científicos, los virus expelidos de esta forma pueden viajar varios metros y permanecer suspendidos en el aire hasta 10 min y pueden sobrevivir en las superficies durante horas (h) a temperatura ambiente (TA) (Tesini, 2021). Los estudios sobre virus en los sistemas marinos muestran que estos son más abundantes que las bacterias, lo que indica la importancia de estos en la dinámica de los sistemas marinos (Proctor, 1997; Weinbauer y Höfle, 1998; van Hannen *et al.*, 1999; Espinosa *et al.*, 2004).

Se ha estimado que aproximadamente 3.000 millones de personas en todo el mundo carecen de sistemas de saneamiento. El 44% de los flujos de aguas residuales domésticas son vertidas al medio sin ser tratadas de manera adecuada, debido, principalmente a que no se dispone de una forma de recogida en plantas de tratamiento centralizadas o tanques sépticos (ONU-Agua, 2021). En 2022 menos de 1,700 millones de personas aún consumen agua de fuentes contaminadas con heces (OMS, 2023). Como consecuencia de estas deficiencias sanitarias y de la falta de aguas limpias para consumo humano, se ha estimado que cerca de 1 millón de personas fallecen cada año a causa de enfermedades diarreicas contraídas como resultado de la insalubridad del agua, de un saneamiento insuficiente o de una mala higiene de las manos (OMS, 2023). La razón principal de esta situación es el alto costo que supone la puesta a punto de procesos de tratamiento, y el mantenimiento de infraestructuras apropiadas que

permitan el control sanitario, de los que solamente se beneficia el 6% de la población mundial (Pedrero, 2001).

En Panamá, la temporada seca es ventosa y muy caliente, opresivo durante todo el año. Durante el transcurso del año, la temperatura generalmente varía de 24°C a 32°C y rara vez, baja a menos de 23°C o sube a más de 34°C. Esto nos puede dar una idea que, en esta temporada, la actividad viral no es mayor que, en la temporada lluviosa, ya que en esta se da mayor actividad de enfermedades respiratorias provocadas por virus. Por ejemplo, brotes por el adenovirus (AdV) ocurren más frecuentemente al final del invierno, primavera y comienzos del verano, aunque pueden darse en cualquier época del año. El virus más común que podríamos encontrar en Panamá durante la temporada seca sería rotavirus (RoV), ya que las infecciones ocurren comúnmente de noviembre a marzo en países tropicales (Nieto *et al.*, 2008).

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

Los Virus

Los virus son partículas infecciosas muy pequeñas (de entre 20 y 300 nm de diámetro), que están constituidas por un solo ácido nucleico, ADN o ARN, poseen una organización estructural simple y se replican por un mecanismo particular dentro de una célula viva (Negroni y González, 2018).

Son parásitos intracelulares estrictos u obligados porque necesitan la maquinaria metabólica de una célula huésped para replicarse. Pueden infectar plantas, animales (incluido el hombre), y también, bacterias, hongos y parásitos (Negroni y González, 2018). Además, son muy pequeños para poder observarse en microscopio óptico, por lo que, se necesita un microscopio electrónico para poder visualizarlos y debido a esto, se consideran submicroscópicos (Flint *et al.*, 2000).

Los virus, según su morfología y estructura, se pueden clasificar en: desnudos o envueltos (esta envoltura vírica es una bicapa de naturaleza fosfolipídica que deriva de la membrana plasmática u otras membranas de la célula que infectan), una cápside de naturaleza icosaédrica o helicoidal, la cual, en conjunto con el genoma viral, constituyen la nucleoproteína. El genoma viral, es el material genético (la información hereditaria) que puede ser ADN o ARN (Flint *et al.*, 2000).

Distribución de los virus en el ambiente

Los virus llegan al ambiente y en especial, a las fuentes de agua cuando las personas o animales infectados depositan las heces en los mismos, dado que el agua es uno de los principales vehículos de transmisión masiva de agentes infecciosos (Peláez, *et al.*, 2016). La concentración de virus en aguas naturales no contaminadas (aguas marinas y lagos) se ha estimado entre 10^5 y 10^8 partículas virales por mL (Berg *et al.*, 1989; Pina *et al.*, 1998). Por esta razón, los ambientes acuáticos como lagos, cañadas y costas marinas son susceptibles a la contaminación fecal. Dicha contaminación tiene como origen una gran variedad de fuentes puntuales y no puntuales, entre las que se encuentra la contribución potencial de desechos de animales silvestres, domésticos y humanos (Gillman, 2016).

Estos desechos pueden entrar al ambiente mediante la combinación de derrame de aguas residuales (debido a la falta de saneamiento y cámaras sépticas) así como por derrame de las propias plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales (Gillman, 2016).

También, los virus pueden encontrarse en el aire y ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles, a través de grandes distancias con el movimiento del aire, el cual representa la mejor vía de dispersión. El número de microorganismos en el aire, en las zonas pobladas, depende de la actividad en esa zona, tanto industrial o agrícola, como de los seres vivos y la cantidad de polvo. El número de microorganismos es mayor en las zonas pobladas y después en el mar, cerca de las costas (De la Rosa *et al.*, 2002). En las zonas con clima seco, el aire contiene numerosos microorganismos y el número desciende después de la lluvia debido a que ésta los arrastra por lavado del aire (De la Rosa *et al.*, 2002).

Las infecciones humanas y animales se transmiten mayormente por el aire, y producen afecciones en el aparato respiratorio superior e inferior tales como: resfriado, laringitis, gripe, bronquitis, neumonía, etc. o también pueden afectar a órganos y tejidos (De la Rosa *et al.*, 2002).

Las enfermedades respiratorias tienen una gran importancia socioeconómica ya que se transmiten fácilmente a través de las actividades normales del hombre, son las más frecuentes en la comunidad y el motivo más importante de ausentismo laboral y escolar. No hay que olvidar que una persona, a lo largo de su vida, respira varios millones de m³ de aire, gran parte del cual contiene microorganismos. Además, estudios de algunos brotes de gastroenteritis producidas por Norovirus (NoV) y RoV, indican que, aparte de la transmisión oral-fecal, podría existir transmisión aérea, mediante los bioaerosoles formados durante el vómito (Chadwick *et al.*, 1994; De la Rosa *et al.*, 2002).

Las vías de transmisión de los virus en el ambiente son muy diversas. Su conocimiento ha provocado una creciente alarma al comprobarse que la población está expuesta a una gran variedad de posibilidades para adquirir una infección. Las distintas vías de transmisión incluyen (Schwatzbrod, 1995, Pedrero, 2001):

- Ingestión de agua contaminada.
- Ingestión de moluscos bivalvos o mariscos crudos o poco cocidos, que hayan crecido en aguas que reciben aporte de aguas residuales.
- Ingestión de vegetales que se han regado con aguas insuficientemente tratadas o que se han cultivado en terrenos abonados con lodos de depuradora que contenían virus infecciosos.

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

El ser humano realiza diversas actividades como la industria, agricultura y comercio para satisfacer sus necesidades, pero estas son principales generadoras de residuos los cuales causan daños crecientes a las diversas matrices ambientales como son el suelo, aire y agua (Gillman, 2016).

Virus entéricos

Los virus entéricos son agentes causales de numerosas enfermedades tales como hepatitis, gastroenteritis, meningitis, encefalitis, infecciones respiratorias y cutáneas, diabetes y conjuntivitis, entre otras. Además, se encuentran desprovistos de envoltura y presentan cápsides resistentes que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables y resistir a la acidez y la actividad proteolítica del estómago, así como infectar las células epiteliales vulnerables, replicándose eficientemente y excretándose en grandes cantidades en las heces (10^5 - 10^{11} partículas virales/g de heces) (Fong y Lipp, 2005; Bracho *et al.*, 2008; Ganesh y Lin, 2013; Peláez *et al.*, 2016).

La principal vía de transmisión es oro-fecal, a través del contacto humano-humano o indirectamente, a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados con virus. Los virus entéricos comúnmente asociados con enfermedad en humanos pertenecen a las familias de Adenoviridae (AdV), Caliciviridae (NoV, Sapovirus), Picornaviridae (enterovirus-EV, virus hepatitis A-VHA, Coxsakievirus y Echovirus-), Reoviridae (Reovirus y RoV), y Astroviridae (Astrovirus-AstV) (Saavedra *et al.*, 2012).

Los virus entéricos pueden ocasionar enfermedades cuando son ingeridos en dosis infecciosas bajas, de allí la relevancia que tienen para la salud pública (Roda y Bartram, 2007; Saavedra *et al.*, 2012). Se estima que la probabilidad de infección con RoV en humanos susceptibles (niños menores de 5 años) es del 31% y solo se requiere una partícula viral o unidad formadora de placa (1 PFU) para causar infección (Haas *et al.*, 1999; Mena, 2007; Saavedra *et al.*, 2012). Los virus entéricos han sido detectados e implicados como agentes causales de brotes epidémicos ocurridos por ingestión de aguas de distribución contaminadas, por contacto e ingestión de aguas contaminadas durante las actividades recreacionales (ríos,

lagos, ambientes marino-costeros) y por ingestión de invertebrados marinos cultivados en aguas contaminadas con virus entéricos (Fong y Lipp, 2005; Saavedra *et al.*, 2012).

Gastroenteritis vírica

La gastroenteritis viral es una enfermedad común que se observa en todo el mundo (Stuempfig y Seroy, 2023), y que afecta a personas de todas las edades, con complicaciones potencialmente graves en niños pequeños y ancianos que son vulnerables a la deshidratación (Blacklow y Greenberg., 1991; Glass *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2014; Oka *et al.*, 2015; Bányai *et al.*, 2018). Desde su identificación a principios de la década de 1970, los virus entéricos tales como: RoV, NoV, AdV y AstV, han sido reconocidos como una de las principales causas de gastroenteritis viral aguda (GEA) en todo el mundo (Bányai *et al.*, 2018; Stuempfig y Seroy, 2022). La mayoría se transmite por vía oro-fecal, incluidos los alimentos y el agua contaminados. Además, se ha demostrado que la transmisión ocurre a través de fómites, vómitos y posiblemente vía aérea (Stuempfig y Seroy, 2023). La GEA se caracteriza por manifestaciones respiratorias, vómitos más prolongados, diarrea acuosa a menudo acompañada de febrícula y calambres abdominales (Bányai *et al.*, 2018; Posovszky *et al.*, 2020). En cambio, la diarrea mucosa y sanguinolenta y con fiebre alta, tiende a asociarse con infecciones bacterianas (Glass *et al.*, 2009; Bányai *et al.*, 2018). A menudo es difícil diferenciar la gastroenteritis viral de la gastroenteritis bacteriana basándose únicamente en las manifestaciones clínicas, ya que se requieren pruebas de laboratorio para hacer un diagnóstico específico (Bányai *et al.*, 2018).

La gastroenteritis vírica son un problema clínico frecuente que está subdiagnosticado. Se calcula que los virus son el agente etiológico responsable de un 30 a 40% de los cuadros de diarrea, aunque en la mayoría de los casos no son diagnosticados (Valriberas *et al.*, 1999). Entre los microorganismos conocidos como causa de cuadros de GEA y cuya patogenia está mejor estudiada, se encuentran los RoV del grupo A, AdV entéricos (grupo F, serotipos 40 y 41), NoV, virus esféricos de pequeño tamaño (AstV, EV, virus semejantes a parvovirus), y otros menos comunes como Coronavirus-CoV, Torovirus-ToV, Reovirus (Valriberas *et al.*, 1999).

Dentro de los patógenos entéricos el RoV es la principal causa de gastroenteritis grave en niños menores de 5 años. Por lo tanto, la proporción de infecciones por RoV que se detectan

en los pacientes aumenta a medida que incrementa la gravedad de la gastroenteritis; estas proporciones oscilan entre el 8% y el 10% de los episodios de diarrea de cualquier gravedad hasta casi el 35% y el 40% de los episodios de diarrea que requieren ingreso hospitalario en todo el mundo (Tate *et al.*, 2012; Lanata *et al.*, 2013). Aunque la infección y las enfermedades graves por RoV prevalecen en todo el mundo con más del 90% de las aproximadamente 200,000 muertes anuales, ocurren principalmente en países en vías de desarrollo, donde el acceso a la terapia de rehidratación no es óptimo comparado con los países desarrollados. (Bányai *et al.*, 2018). RoV tiene una estacionalidad invernal prominente en muchos países de clima templado, y la prevalencia de la infección disminuye sustancialmente durante los meses de verano (Patel *et al.*, 2013). Sin embargo, en los países en vía de desarrollo la enfermedad por RoV es menos estacional que en los países de clima templado, lo que quizás refleja la mayor intensidad de exposición al RoV en estos entornos (Bányai *et al.*, 2018).

Los norovirus son la principal causa de gastroenteritis aguda en personas de todas las edades en todo el mundo y se estima que causan entre el 12 y 24% de los casos de GEA en la comunidad o en la clínica, entre el 11 y 17% de los casos en salas de emergencia o en hospitales, y aproximadamente, entre 70,000 y 200,000 de muertes al año (Patel *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2014; Bányai *et al.*, 2018). Estudios de caracterización molecular de NoV realizados a nivel mundial en los casos de GEA, han demostrado una frecuente cocirculación de diferentes genotipos de GII y GI, pero las cepas de GII son las que tienen mayor prevalencia, representando de un 75 a un 100% de las cepas caracterizadas, siendo GII.4 la más frecuente a nivel mundial. Debido a la rápida evolución de estos virus, nuevas variantes surgen con frecuencia reemplazando las variantes antiguas, diseminándose rápidamente en las diferentes regiones del mundo. Este fenómeno se ha evidenciado particularmente con las variantes de GII.4. La aparición de nuevas variantes se relaciona con un aumento considerable en el número de brotes notificados (Kroneman *et al.*, 2006; Siebenga *et al.*, 2007; Siebenga *et al.*, 2009; García, 2012).

Los AdV de los tipos 40 y 41, pertenecientes al subgénero F y ocasionalmente el 31, perteneciente al subgénero A, producen GEA. Afectan fundamentalmente a niños menores de 2 años en los que su frecuencia como causa de GEA clásicamente solo se ve superada por la de los RoV (Greenberg y Matsui, 1992; Domínguez *et al.*, 2009). La frecuencia con que

se identifican los AdV 40 y 41 como causa de GEA esporádica en la población infantil no inmunodeprimida oscila entre 0.7 y 31.5%, aunque probablemente haya sub-detección debido a que la sensibilidad de las técnicas convencionales es baja (Domínguez *et al.*, 2009).

Los AstV causan GEA a nivel mundial con una frecuencia que oscila entre un 2 y 9%, aunque algunos trabajos mencionan hasta un 26% (Matsui y Greenberg, 1996). Las gastroenteritis por AstV afecta principalmente a la población infantil, aunque se han asociado también con la población de más edad. Existen hasta la fecha 8 serotipos descritos, siendo el 1 el más abundante y el 7 el menos frecuente. La distribución de los serotipos es un tema de interés para el futuro desarrollo de una vacuna (Schnagl *et al.* 2002; Domínguez *et al.*, 2009).

Adenovirus

El AdV fue descrito por primera vez como agente viral en 1953 por Rowe *et al.*, mientras intentaban establecer cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo. Rowe reconoció que un agente transmisible estaba destruyendo las células epiteliales (Bernaola y Luque, 2002). En estos tejidos se observan cambios degenerativos resultantes de la replicación de un agente no identificado que se denominó *Adenoid Degeneration Agent*. Hilleman y Werner (1954), consiguieron aislar un agente infeccioso a partir de secreciones respiratorias, que inducía cambios citopáticos sobre líneas celulares de origen humano (Pedrero, 2001). En este estudio, los AdV fueron descritos como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas, infecciones gastrointestinales, urinarias y oculares. Actualmente, se reconoce que los AdV causan con más frecuencia enfermedades del tracto respiratorio. Sin embargo, dependiendo del serotipo infectante, pueden causar otras enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, hepatitis y exantema (Bernaola y Luque, 2002).

Estructura

El AdV es un virus de ADN de doble cadena lineal, protegido por una nucleocápside de simetría icosaédrica formada por 240 capsómeros hexagonales (hexones) que ocupan las caras y aristas, 12 pentagonales (pentones) que se sitúan en los vértices, y 60-90 nm de diámetro (Bernaola y Luque, 2002). De éstos parten unas prolongaciones o fibras en cuyo extremo se encuentran las glicoproteínas causantes de la adhesión a las células endoteliales de diversos tejidos, responsable en último término de los cuadros clínicos (Bosch, 2010).

El núcleo del virión está formado por un ADN lineal de doble cadena que tiene capacidad para codificar entre 30 a 40 genes. Además, en el núcleo tenemos las siguientes proteínas (Bernaola y Luque, 2002):

- Proteína terminal (TP), que se encuentra al final del genoma y sirve como primer estímulo para la replicación.
- Proteínas básicas V, VII; similares a las histonas y estabilizan el ADN.
- Proteína Mu, proteína pequeña transactivadora.

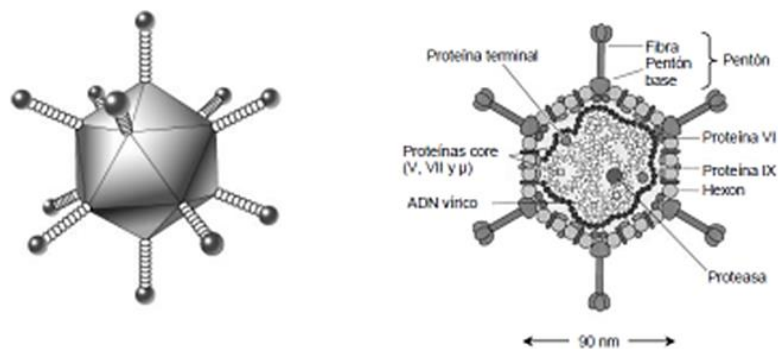


Figura 1. Diagrama de la partícula vírica de AdV, mostrando las proteínas mayoritarias de la cápside, proteínas estabilizadoras de la cápside y las proteínas core asociadas al ADN (Pedrero, 2001).

Los AdV carecen de envoltura lipídica, lo que les confiere la propiedad de ser resistentes a los agentes externos. Esta característica explica las diferentes vías de transmisión: por inhalación, próxima al paciente tosedor, o remota por vía oro-fecal. Esta resistencia permite que las muestras clínicas utilizadas para el aislamiento puedan conservarse durante algunos días, a diferencia de lo que suele ocurrir con otros virus que por lo general, son más sensibles a las condiciones ambientales (Bosch, 2010).

Patogénesis

Las vías de transmisión de AdV ocurren por medio de contacto directo, vía oro-fecal, y vía inhalatoria. Este virus tiene preferencia por las células epiteliales, llegando a afectar a casi

todas las células epiteliales de las mucosas. Se describen 3 tipos de interacciones entre el AdV y la célula huésped (Bernaola y Luque, 2002).

- a) **Infección lítica:** se da el ciclo replicativo completo en células epiteliales. Se producen entre 10,000 y 1 000 000 de virus por célula, de los cuales del 1 a 5% son infecciosos (Bernaola y Luque, 2002).

Infección latente: es una infección crónica y se da principalmente en células linfoides. Dicha infección puede reactivarse en pacientes inmunocomprometidos. La infección latente produce la transcripción de factores que favorecen la producción de citoquinas inflamatorias (IL 8, ICAM 1, FNT α), con la consiguiente amplificación del proceso inflamatorio a dicho nivel (Singh-Naz y Rodríguez, 1996; Keicho, 1997; Hogg, 2000; Teramoto y Kume, 2001; Bernaola y Luque, 2002). Además, se ha visto que los AdV inducen a células quiescentes entrar a la fase S del ciclo replicativo e inhibir la apoptosis de las células huésped (Hogg, 2000).

- b) **Transformación oncogénica.** Se dan sólo los pasos iniciales de la replicación viral. Algunos productos de los genes tempranos virales inhiben a los antioncogenes. El ADN viral es aparentemente integrado y replicado con el ADN celular, no se producen virones infecciosos. Se ha demostrado en modelos animales. La proteína E1A se une a proteínas celulares alterando sus funciones (p105-RB, p53) e inhibe apoptosis por alteraciones del bcl-2 (Hogg, 2000).

Manifestaciones clínicas

Los AdV afectan a numerosos y variados sistemas de nuestro organismo. Los síndromes más frecuentes y conocidos son:

Infecciones del tracto respiratorio: son muy frecuentes, sobre todo las infecciones de las vías altas, como las faringoamigdalitis, que se presentan a lo largo del año. Los AdV también producen infecciones de las vías bajas, como las tráqueobronquitis, donde la tos es un síntoma característico, hasta el punto de provocar síndromes pertusoides. Raramente puede ser responsables de cuadros de neumonía (Bosch, 2010).

- a) **Otras enfermedades del tracto respiratorias**

Los AdV provocan síntomas similares al resfriado, laringitis, laringotraqueobronquitis y bronquiolitis. También, pueden provocar una enfermedad semejante a la tosferina en niños y adultos que se caracteriza por una evolución clínica prolongada y una neumonía vírica verdadera. (Murray *et al.*, 2009).

- b) Infecciones del tracto digestivo:** deben distinguirse las producidas por los serotipos 40 y 41, que cursan con fiebre, gastroenteritis y un tiempo de evolución superior a los 8 días, de las más leves originadas por los otros serotipos (Bosch, 2010). Es común que las infecciones por AdV causen síntomas gastrointestinales, incluso cuando los síntomas principales son respiratorios (sobre todo en niños pequeños) (Peled *et al.*, 2004; López, 2017; Flomenberg; 2021). Complicaciones raras pueden ser la colitis hemorrágica, hepatitis, colecistitis y pancreatitis (Lynch y Kajon, 2016; López, 2017).
- c) Infecciones oculares:** aproximadamente entre el 20 y 70% de las conjuntivitis infecciosas son virales y entre el 60 y 95% de éstas, están causadas por AdV (Sambursky, 2013; López, 2017). Clásicamente, la infección conjuntival por AdV se ha clasificado en 4 presentaciones clínicas (Romero *et al.*, 2010; CDC, 2022):
- 1) Fiebre faringoconjuntival (FFC):** se caracteriza por la aparición súbita de fiebre alta, faringitis y conjuntivitis bilateral y por agrandamiento de los ganglios linfáticos periauriculares. Tiende a presentarse en brotes epidémicos que afecta en especial a los niños pequeños (Salgado, 2005).
 - 2) Queratoconjuntivitis epidémica (QCE):** el AdV es el principal causante de la queratoconjuntivitis. Este síndrome está caracterizado por dolor, inflamación ocular y linfadenopatía preauricular. Además, es una de las mayores causas de morbilidad ocular y puede llevar a la pérdida de visión. Si en la evolución se produce afectación corneal se desarrolla un infiltrado subepitelial, pudiendo tardar meses o incluso años en recuperar la visión. También, puede dar lugar a pseudomembranas que conllevan la cicatrización conjuntival con pérdida de células caliciformes y formación de simblefaron, produciendo un ojo seco permanente (Sambursky, 2013; López, 2017).

Su epidemiología varía según el serotipo, ya que todos son transmitidos por contacto directo y transmisión oro-fecal. Su incidencia se incrementa en los meses de verano, ya que el aumento de la temperatura y los niveles elevados de humedad prolongan la supervivencia de los virus (Romera, 2015).

- 3) **Conjuntivitis folicular aguda:** es la infección adenoviral más frecuente y benigna del ojo, es generalmente unilateral y se manifiesta por lesiones foliculares en la superficie conjuntival. Los síntomas se caracterizan por quemazón, sensación de cuerpo extraño y eritema conjuntival, resolviéndose en un plazo de 10 días a tres semanas (Bernaola y Luque, 2002).
- 4) **Conjuntivitis hemorrágica aguda:** es un tipo de conjuntivitis que frecuentemente se asocia con epidemias grandes en todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales. Los virus que con más frecuencia se asocian a este tipo de conjuntivitis incluyen los EV 70, los virus Coxsackie A24 y los AdV (CDC, 2022).

Aunque aproximadamente un tercio de los serotipos de AdV pueden causar manifestaciones oculares, los más comunes asociados con la queratoconjuntivitis epidémica son el 5, 8, 19, 37; con la fiebre faringoconjuntival los serotipos 3, 4 y 7; con la conjuntivitis hemorrágica aguda el serotipo 11 y con la conjuntivitis folicular el 1, 11 y 19 (Lynch *et al.*, 2011; Sambursky *et al.*, 2013; Lynch y Kajon, 2016; López, 2017).

Manifestaciones clínicas poco comunes

Incluyen miocarditis y cardiomiopatía, encefalitis, síndrome semejante a mononucleosis, displasia pulmonar, invaginación intestinal en niños y muerte súbita (Calvo y Del Castillo, 1992, Melón *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2011; López, 2017). Hay estudios que lo relacionan con disfunción del sistema nervioso central (SNC), sobre todo meningitis o encefalitis, en hasta 3,3% de niños menores de 5 años con infección con AdV, aunque el pronóstico en estos casos parece bueno (Huang *et al.*, 2013; López, 2017).

Cabe destacar que los pacientes inmunodeprimidos corren el riesgo de padecer infecciones graves por AdV, aunque no tanto como de padecer infecciones por virus del herpes. Entre las enfermedades producidas por los AdV en pacientes inmunodeprimidos cabe incluir la neumonía y la hepatitis (Murray *et al.*, 2009).

El AdV-F41 comúnmente causa gastroenteritis aguda pediátrica, que típicamente se presenta con diarrea, vómitos y fiebre y, a menudo puede ir acompañada de síntomas respiratorios (OMS, 2022). La prevalencia de diarrea aguda causada por este AdV, denominado entérico, oscila entre el 1.2 y 15% en varios países, y solo la superan en cifras Shigella y RoV (Rivas González, 2022). Además, es la causa más común de hospitalización y mortalidad asociada a gastroenteritis en niños pequeños (Lucio, 2022; Rivas González, 2022). Se han registrado raros casos de hepatitis por AdV en niños inmunocomprometidos (OMS, 2022).

El 29 de abril de 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reveló 169 casos detectados recientemente de hepatitis aguda infantil en el mundo entre niños de 1 mes a 16 años, en 12 países (Bélgica, Dinamarca, Francia, Irlanda, Israel, Italia, países Bajos, Noruega, Rumania, España, Reino Unido y los Estados Unidos). De los 169 casos notificados, en 85 de ellos se realizaron pruebas para la identificación de AdV, de los cuales 74 resultaron positivos, siendo el serotipo F41 el que se identificó en 18 casos (OMS, 2022). Actualmente, existen cerca de 621 casos pediátricos de hepatitis aguda infantil reportados en 34 países (Ferguson, 2022).

El 5 de mayo del 2022, se confirmó el primer caso de hepatitis aguda en Latinoamérica. Este fue reportado en Argentina en un niño de ocho años (Pinchao, 2022). Posteriormente el Ministerio de Salud de Panamá (MINSa), reportó el primer caso de hepatitis aguda infantil por AdV F40-41 en un menor de dos años (Panamá América, 2022). Hasta el momento se han registrado 2 casos en menores de 5 años durante el año 2022, el primero en la Provincia de Panamá Este y el segundo en el distrito de San Miguelito.

Epidemiología

Los brotes de AdV no son muy comunes. Sin embargo, debido a que el virus es capaz de extenderse muy rápidamente, los brotes pueden alcanzar proporciones grandes antes de ser contenidos. La época más común de un brote de infección por AdV es durante el invierno, el otoño y el comienzo del verano, pero las infecciones pueden ocurrir durante todo el año (Mandal, 2015).

Los tipos de AdV que se conectan comúnmente a los brotes son los que son más virulentos y probables de extenderse. Éstos incluyen los tipos 3, 4 y 7 que son comunes en las infecciones respiratorias agudas. Éstos pueden extenderse entre poblaciones dentro de algunas semanas. La extensión es común vía aerosoles a partir de tos o estornudo por una persona infectada. Estos aerosoles son minúsculos, casi invisibles al ojo humano y llevan la partícula viral. Estos entonces son inhalados por las personas sanas (Mandal, 2015).

Más del 80% de las infecciones por AdV ocurren en niños, sobre todo en menores de 4 años (debido a la falta de inmunidad humoral). La infección puede ser asintomática (más frecuentemente con el serotipo C en niños), y también es posible la reinfección (Bhumbra y Wroblewski, 2010; Wang *et al.*, 2016; López, 2017) Los AdV constituyen en nuestra población los terceros agentes etiológicos causantes de infecciones respiratorias virales pediátricas después del VRS y la gripe (Reina *et al.*, 2004; López, 2017).

Rotavirus

El RoV en humanos fue inicialmente descrito en 1973 por Ruth Bishop en Australia, quien describió “partículas virales” al observar al microscopio electrónico biopsias de intestino delgado de niños con diarrea severa de origen no bacteriano (Estes y Morris, 1999; Tamayo *et al.*, 2007). La australiana acuñó el término "duovirus", porque el virus fue encontrado en una porción del intestino llamada duodeno. En 1974, el doctor irlandés Thomas Henry Flewett sugirió el nombre rotavirus, utilizado en la actualidad. Flewett señaló que este virus parecía un círculo, por lo cual lo llamó "rotavirus", en relación con la palabra rotación de una rueda.

Estructura

El RoV constituye un género dentro de la familia Reoviridae, misma que tiene nueve géneros disímiles y comparte las siguientes características con los miembros de esta familia (Ericson *et al.*, 1983; Tamayo *et al.*, 2007). Las partículas virales tienen una simetría icosaédrica, no presentan envoltura lipídica y su genoma está compuesto por 11 segmentos de ARN bicatenario que no es infeccioso en ausencia de las proteínas virales. La partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para la producción de sus ARN mensajeros (ARNm) y la replicación viral se lleva a cabo exclusivamente en el citoplasma de la célula hospedera (enterocito). Además, este virus presenta tres tipos de partículas de distintos tamaños: partícula de triple, doble y simple, cubierta proteica en cuyo interior se halla su genoma y su tamaño varía entre 60-85 nm (Sulbarán *et al.* 2002).

Para la abreviación de las proteínas estructurales del virus, se utilizó el prefijo VP (Proteína Viral). El Genoma consta de 11 segmentos que codifican las proteínas estructurales (PE) que forman parte del virus (ej. VP1), y las proteínas no estructurales (PNE) las cuales no son parte de la estructura viral, pero participan en la formación de nuevos virus dentro del enterocito (ej. PNE2) (Tamayo *et al.*, 2007).

En su estructura se describen tres capas (Tamayo *et al.*, 2007):

1. La capa interna en su estructura presenta 60 dímeros de proteínas, dentro de las cuales se encuentra a la VP2 (102 kDa), que encierra 11 segmentos de ARN de doble cadena y dos proteínas minoritarias, VP1 y VP3.
2. La capa intermedia constituida por 260 trímeros de VP6 (41 kDa) ordenado como un enrejado que contactan con VP2 por su lado interno y con las proteínas externas VP4 y VP7.
3. La capa externa conformada por la VP7 (37 kDa) con 780 copias de glicoproteína y 60 picos o ganchos formados por dímeros de proteínas virales de adherencia VP4 (87 kDa).
4. En su superficie se hallan 132 canales acuosos que unen el medio externo con el core para la transcripción de partículas que es realizada por la ARN polimerasa, que puede ser expulsada por estos canales.

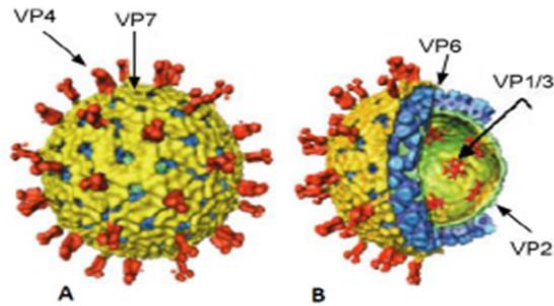


Figura 2. Características estructurales de RoV. A. Reconstrucción mediante la criomicroscopía electrónica de la partícula de RoV. Las espículas de la proteína VP4 se indican en rojo y la proteína que conforma la capa exterior, VP7 en amarillo. B. Un corte transversal de la partícula viral muestra las cubiertas internas, en azul VP6 y en verde VP2. Las enzimas VP1 y VP3 se muestran en rojo en la capa interna. Imagen extraída y modificada de Jayaram *et al.*, 2004 (Gillman, 2016).

El género Rotavirus incluye siete serogrupos (indicados con letras desde la A hasta la G), donde los RoV del grupo A, B y C, han sido identificados en humanos y animales, y los de grupo D, E, F y G, hasta el momento, solo en animales (Ávila, 2003; Vizzi, 2008). Son más frecuentes las infecciones por el grupo A, dentro del cual hay varios serotipos (Asociación Española de Vacunología, 2023).

Forma de transmisión

La forma de transmisión más común es por vía oro-fecal, porque el virus es estable en el ambiente. Es decir, la transmisión puede ocurrir a través de la ingestión de aguas o comidas contaminadas con heces, y mediante el contacto directo con superficies u objetos infectados (el RoV puede sobrevivir en ellos varios días). También, la infección se transmite por contacto de persona a persona (el RoV puede sobrevivir durante varias horas en las manos) (Asociación mexicana de vacunología, 2022). Las personas enfermas pueden excretar virus infecciosos hasta por una semana en la materia fecal y los pacientes inmunocomprometidos presentan excreción incluso pasado 30 días. El periodo de incubación es de unos 2 días hasta la aparición de los principales síntomas después de la infección (Asociación Española de Vacunología, 2023).

Patogénesis

El modelo de transmisión del RoV es poco conocido, aunque la diseminación ocurre a través del contacto directo, vía oro-fecal, fómites contaminados o a través de aerosoles respiratorios (vía inhalatoria). La replicación viral ocurre en el epitelio vellosos del intestino delgado, donde avanza de la parte proximal hacia la distal. A continuación, se describe paso a paso la patogenia de la infección por RoV (Tamayo *et al.*, 2007):

- **Primer paso:** contacto viral con el enterocito; se manejan dos teorías para el ingreso del virus al citoplasma: por endocitosis, en la que la VP 4 juega un rol muy importante ya que esta molécula, una vez activada, reconoce a un receptor específico de membrana (aún no ha sido determinado en los enterocitos humanos). La segunda teoría es la de penetración directa, con ingreso del virus hasta la capa interna, para liberar el core (Ramig, 1997; Tamayo *et al.*, 2007).
- **Segundo paso:** una vez dentro del citoplasma el endosoma que contiene al virus se fusiona con los lisosomas, los cuales con sus enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de la capa proteica (VP6), dejando libre en el citoplasma al core viral (Tamayo *et al.*, 2007).
- **Tercer paso:** una vez liberado el core viral es necesario que se active la ARN polimerasa viral (Transcriptasa o VP1 contenida en el core) que produce ARNm que realizan copias de los 11 segmentos del ARN viral. Éstos contienen los genes que van a codificar cada una de las PE y PNE (PNE1 y PNE3) que se acumulan en el citoesqueleto y ensamblan el precore. Todo lo anterior ocurre después de 8 h, en el citoplasma del enterocito, para formar en definitiva el viroplasma, mismo que se transforma en el core definitivo con intervención de la PNE2 y la PNE5 (Salim *et al.*, 1995; Mirazimi *et al.*, 1998; Tamayo *et al.*, 2007).
- **Cuarto paso:** posteriormente, la PNE4 provoca cambios en la permeabilidad de la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), marcando un incremento en la permeabilidad al calcio. Es así como termina el ciclo de replicación del virus, liberándose al lumen intestinal por lisis celular (Newton *et al.*, 1997; Tamayo *et al.*, 2007)

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas varían dependiendo del serotipo o subtipo, edad y también de si es la primera infección o si se trata de una reinfección. El RoV tiene un periodo de incubación de 1 a 3 días, provocando un síndrome clínico conocido como gastroenteritis viral que varía de una diarrea leve a severa que ocasiona deshidratación, a veces fatal. Cabe mencionar que puede existir una infección simultánea con dos o más cepas diferentes de RoV, tras la exposición de infantes a ambientes altamente contaminados (Tamayo *et al.*, 2007).

Los vómitos 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 (Newton *et al.*, 1997; Sulbarán *et al.*, 2002; Tamayo *et al.*, 2007)

La 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 (Sulbarán *et al.*, 2002), excepto en prematuros en los que puede tener carácter disentérico; en casos severos se presenta una deshidratación generalmente isotónica (Tamayo *et al.*, 2007). La fiebre usualmente es de corta duración (no más de dos días), y puede alcanzar más de 39°C. También podemos encontrar síntomas como dolor abdominal y manifestaciones respiratorias superiores y sistémicas como cefalea y mialgias en algunos niños (Tamayo *et al.*, 2007).

Epidemiología

Los RoV A son la causa más común de diarrea severa en niños menores de 5 años a nivel mundial. Se estima que produce cerca de 114 millones de episodios de gastroenteritis, 24 millones de visitas médicas, 2.4 millones de hospitalizaciones y es responsable de aproximadamente 611000 muertes cada año (Parashar *et al.*, 2006; Ortiz, 2012). Interesantemente, la tasa de morbilidad de RoV es similar tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo, a diferencia de la mortalidad atribuida a RoV, la cual está restringida básicamente a los países en vía de desarrollo donde ocurren más del 90% de las muertes (Parashar *et al.*, 2006; Chandran *et al.*, 2010; Ortiz, 2012). Específicamente en América Latina, el RoV provoca un estimado de 10 millones de casos de gastroenteritis, 2

millones de visitas médicas, 75000 hospitalizaciones y 15000 muertes anuales (Bryce *et al.*, 2005; Ortiz, 2012).

Enterovirus

Los EV se incluyen dentro de un subgrupo o género de la familia Picornaviridae (Pico: pequeño virus de ARN, como su nombre lo define). Es un virus que está conformado por un pequeño ARN con la capacidad para infectar los tejidos epiteliales y linfoides del tracto intestinal y excretarse en heces (Ryan y Ray, 2011). Además, este virus pertenece a una de las familias virales más importantes y de mayor tamaño, conformada por siete géneros. Dos de éstos afectan sólo a los animales (Cardiovirus y Aphthovirus), y los otros cinco son importantes patógenos humanos: Rhinovirus, Enterovirus, Hepatovirus, Parechovirus y Kobuvirus (Sánchez y Martí, 2000; Salvador, 2012), que en la actualidad se han fusionado en el género Enterovirus (Launes y Muñoz-Almagro, 2017; ICTV, 2021).

La clasificación taxonómica de los diferentes géneros de EV ha ido variando a lo largo de los últimos años. Si bien, anteriormente se describen 5 grupos o tipos (Coxsackie A, Coxsackie B, Poliovirus y Echovirus), actualmente, basándose en las propiedades genómicas, los diferentes tipos de EV quedan englobados dentro del nuevo género de enterovirus que incluye también a los rinovirus. En el género EV estos se agrupan en trece especies, once denominadas como enterovirus (EV-A, B, C, D, E, F, G y H), y tres especies de rinovirus (RV-A, RV-B y RV-C). De las 11 especies de enterovirus solo 4, EV-A, EV-B, EV-C y EV-D, producen infección en humanos (Launes y Muñoz-Almagro, 2017; ICTV, 2021).

Los EV comparten gran número de características clínicas, epidemiológicas y ecológicas, así como ciertas propiedades físicas y químicas. Difieren entre sí por el distinto comportamiento en cultivo, antigenicidad y ciclo replicativo, aunque, en todos los casos, el hábitat común y el lugar de replicación es el tracto intestinal humano (Sánchez y Martí, 2000).

Estructura

La partícula viral mide de 20 a 30 nm y presenta una cápside sin envoltura con simetría icosaédrica. Poseen un ARN de cadena simple de polaridad positiva, por lo que se replica utilizando su propio ARNm. Su genoma se divide en 4 regiones que codifican PE y 2 regiones no codificadoras, reguladoras. Posee una cápside formada por 60 copias de cuatro proteínas

no glicosiladas (VP1, VP2, VP3 y VP4), las cuales se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína VPg. Dentro de cada grupo, existe un número de serotipos definidos por los epítomos de la cápside que se deben a modificaciones estructurales de la superficie del virión. Los epítomos antigénicos, que definen a cada serotipo, estimulan la formación de anticuerpos específicos que se comportan como neutralizantes de la infección, ya que no permiten su unión al receptor celular (Sánchez y Martí, 2000).

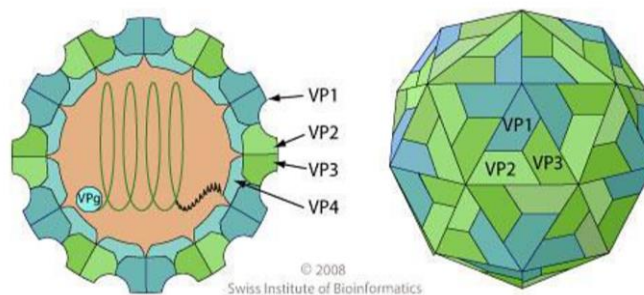


Figura 3. Ilustración de la estructura de la cápside de Enterovirus. Las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 se encuentran en la cara externa de la cápside, mientras que VP4 se halla en la cara interna de la misma. En el interior se encuentra un ARN+ monocatenario unido a la proteína viral VPg (Hernández, 2014).

El ciclo replicativo de los EV es lítico y su receptor celular es una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se presenta en distintos órganos diana, como el corazón (Coxsackievirus), el SNC (Poliovirus), el hígado o el intestino (Sánchez y Martí, 2000). Los EV son resistentes a un pH ácido (hasta de 3.0) y esta característica les garantiza su supervivencia durante su paso a través del estómago hacia los intestinos, y a su vez, también son resistentes a muchos desinfectantes comunes tales como alcohol al 70%, fenólicos sustituidos, éter y diversos detergentes que con facilidad inactivan a la mayoría de los virus con envoltura. (Ryan y Ray, 2011).

Forma de transmisión

El hombre es el único reservorio conocido y la forma de transmisión más común es por vía oro-fecal, debido a que este virus se mantiene estable en el ambiente. Los virus pueden ser

eliminados por medio de las heces y ser detectado en aguas residuales hasta unos 3 meses post-infección (Pallansch y Roos, 2007; Launes y Muñoz-Almagro, 2017). La transmisión también puede ocurrir por contacto directo de persona a persona, al toser o estornudar una persona infectada (Departamento de Salud de Nueva Jersey, 2014).

La larga diseminación asintomática del virus plantea una grave amenaza, ya que permite la aparición de brotes epidémicos repentinos de infecciones enterovirales en diferentes continentes y complica su predicción (Nikonov, 2017), siendo más frecuente en la estación de verano y otoño (en países templados), en niveles socioeconómicos bajos, en lactantes y niños (más frecuente en varones) (Sánchez y Martí, 2000).

Patogénesis

El virus ingresa al organismo por medio de la vía oral, con un periodo de incubación que oscila entre 3 a 6 días desde el momento en que una persona se expone hasta que comienzan los síntomas (Departamento de Salud Pública del Condado de Hennepin, 2015). Se multiplica localmente en el tejido linfoide de la faringe y las placas de Peyer, y después, se disemina por vía sanguínea en la primera viremia a otros tejidos diana, como la piel, miocardio, meninges, páncreas, y otros, en donde se replica. Los síntomas pueden ser el resultado directo de la destrucción de células diana en los tejidos (como ocurre en la poliomielitis), o puede deberse a la respuesta inmune frente al virus (Sánchez y Martí, 2000).

La mayoría de las infecciones son abortivas, debido a la existencia de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos IgM, IgG e IgA aparecen con bastante rapidez en el curso de la infección. La inmunidad es, predominantemente, humoral, específica de serotipo y duradera (los anticuerpos persisten durante toda la vida). Las personas con un déficit de la inmunidad humoral tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad paralítica cuando se utiliza para su vacunación la vacuna de antipolio oral con virus vivo-atenuado de Sabin (OPV), siendo recomendable en estas condiciones el uso de la vacuna de virus inactivados de Salk (IPV) (Sánchez y Martí, 2000)

Manifestaciones clínicas

Se estima que hasta el 50% de las infecciones por EV pueden ser asintomáticas y, en el 95% de los casos sintomáticos, las manifestaciones son benignas y principalmente se producen en

menores de 6 años (Launes y Muñoz-Almagro, 2017). Los síntomas más comunes son parecidos al resfriado, dolor de garganta, llagas en la boca, fiebre, sarpullido (exantema), vómitos y diarrea. Estos virus a menudo causan infecciones leves como resfriados, dolores de garganta y enfermedades gastrointestinales. Con menos frecuencia, los EV causan neumonía, meningitis o encefalitis (Departamento de Salud Pública del Condado de Hennepin, 2015).

Dentro de los EV-A encontramos diferentes genotipos causantes de la enfermedad boca-mano-pie, herpangina y cuadros catarrales (destacan CV-A6, CV-A16 y EV-A71). Entre los de la especie B destacan manifestaciones cutáneas (exantemas inespecíficos), así como faringoamigdalitis con exudados, meningitis aséptica y miocarditis (CV-B4, E6, EV-B5, CV-A9). Entre los de la especie C destacan los causantes de la conjuntivitis hemorrágica, meningitis y los poliovirus, causantes de la parálisis flácida aguda. Entre los de la familia D destacan los causantes de cuadros respiratorios y conjuntivitis hemorrágica (EV-68, EV-94). Aun así, no hay una asociación clara entre genotipos y clínica, y el mismo genotipo puede causar diferentes manifestaciones clínicas con frecuencia (Launes y Muñoz-Almagro, 2017).

Meningitis aséptica

La meningitis aséptica (MA) describe un síndrome clínico caracterizado por la inflamación de la meninge causada por un patógeno no bacteriano que no es identificable en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El número de casos de meningitis viral que ocurre anualmente excede el número total de casos causados por otras etiologías combinadas (Irani, 2008). Más del 90% de todas las meningitis virales son causadas por EV, que son los patógenos más comúnmente asociados con esta enfermedad en todo el mundo y pueden causar casos esporádicos, brotes y epidemias (Gómez *et al.*, 2019).

En el año 2015 el Ministerio de Salud de Panamá, informó de la existencia de 54 casos de meningitis viral en la región Metropolitana, Panamá Oeste y Chiriquí. La mayoría de los diagnósticos de la enfermedad corresponden a menores de 1 año, seguido por niños entre los 10 y 14 años. El 53% de los casos se reportaron en el Hospital del Niño, seguido por el Complejo Hospitalario de la Caja de Seguro Social, con 14.8% (Cerrud, 2015). En la actualidad, se ha observado el aumento en casos de meningitis bacteriana, lo cual ha afectado a más de 3 menores de edad en el país (Espinoza, 2022).

Faringoamigdalitis aguda

La Faringoamigdalitis aguda (FAA) es una de las enfermedades más comunes en la infancia. Se define como un proceso agudo febril, de origen generalmente infeccioso, que cursa con inflamación de las mucosas de la faringe y/o las amígdalas faríngeas, en las que se puede observar la presencia de eritema, edema, exudados, úlceras o vesículas (Piñeiro *et al.*, 2011). Puede ocurrir bien a través del aire (al toser o estornudar), o por contacto directo (Bercedo y Cortés, 2011). Las faringoamigdalitis suelen ser virales, con mayor frecuencia causadas por los virus del resfriado común (AdV, rinovirus, influenza, coronavirus, respiratorio sincitial), si bien en ocasiones pueden estar causadas por el virus de Epstein-Barr, el virus Herpes Simple, el Citomegalovirus o el VIH. Las faringitis víricas pueden cursar a cualquier edad, sobre todo en los menores de 3 años (Sasaki, 2020).

Epidemiología

Los EV tienen una distribución mundial y se encuentran comúnmente en lugares con clima templado durante el otoño y el verano, pero en los climas tropicales ocurre durante todo el año. Además, son comunes las infecciones asintomáticas. La proporción de personas infectadas que desarrollan una enfermedad varía entre el 2 y el 100%, dependiendo del serotipo o cepa implicada y de la edad del paciente. Son comunes las infecciones secundarias en el hogar alcanzando de un 40 a un 70% (Ryan y Ray, 2011), por medio de la transmisión oro-fecal de estos agentes, ya que estos dependen de factores tales como el tamaño de la familia, hacinamiento y condiciones sanitarias (Sandín y Rodríguez, 2006).

La transmisión por medio del agua está incluida como una vía indirecta de la transmisión oro-fecal, en la que el agua es el vector principal al contrario de las manos o fómites. Los registros de la epidemiología clínica indican que la transmisión respiratoria no es de suma importancia como lo es la transmisión oro-fecal (Sandín y Rodríguez, 2006).

Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales

Muestreo de virus transmitidos por el aire

El estudio de los microorganismos presentes en el aire depende de las técnicas desarrolladas para la toma de muestras. Desde que en el siglo XIX comenzaron las investigaciones sobre

los microorganismos en esta matriz ambiental, se han diseñado diversos aparatos, muchos de ellos con una aplicación limitada. Actualmente, existen una gran cantidad de métodos e instrumentos para detectar los microorganismos en el aire. Las técnicas utilizadas son diversas, de las cuales, la sedimentación, filtración, el impacto sobre distintas superficies sólidas y el borboteo en medios líquidos, son las más importantes (De la Rosa *et al.*, 2002).

Impactación en medio líquido

Este método consiste en que las partículas presentes en el aire pasan por una entrada curvada, y luego las partículas abandonan la corriente de aire impactando en un volumen conocido de líquido de captación, aplicándose normalmente agua desmineralizada, tampón fosfato salino o agua peptonada, en el cual quedan retenidas. El flujo de aire puede ser de 12,5 o 20 L/min (De la Rosa *et al.*, 2002).

Muestreo de virus transmitidos por agua

Las aguas residuales urbanas contienen concentraciones de virus suficientemente elevadas que permiten la detección directa, o tras una etapa sencilla de concentración. Pero en ocasiones los virus entéricos se encuentran en el medio acuático en cantidades muy pequeñas, lo que hace que sea necesario la concentración de grandes volúmenes de agua. La mayor parte de los métodos de recuperación de virus aprovechan las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Tienen, además, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo (Lucena *et al.*, 1991).

Se han propuesto más de 30 métodos de concentración, aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y a todo tipo de virus. La metodología debe escogerse en función de los diferentes factores (Lucena *et al.*, 1991):

- La concentración viral, variable según el tipo de agua, el virus de interés y la estación, a la vez que dependiente de factores geográficos y climáticos.
- El tipo de agua, ya que las variaciones en sus características fisicoquímicas y en la cantidad de materia orgánica afectan a la capacidad de agregación de los virus, así como a la eficiencia de algunos métodos.

- El tipo de virus, ya que ciertos métodos podrían provocar la inactivación de alguno de ellos.

Concentración de virus por Ultracentrifugación

La ultracentrifugación es otro método de concentración secundaria (Saavedra *et al.*, 2012), que permite concentrar los virus en un volumen de muestra apropiado (1-5 mL) para los pasos subsiguientes de detección por cultivo celular o por métodos moleculares. La ultracentrifugación es también ampliamente utilizada como método de concentración primaria para recuperar múltiples virus entéricos a partir de aguas muy contaminadas (Pina *et al.*, 1998; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2009; Alcalá *et al.*, 2010; Betancourt *et al.*, 2010; Fumian *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2012).

Métodos de detección y cuantificación de virus en agua

El estudio de los virus presentes en el agua, además de requerir un proceso de concentración, también incluye el análisis para la detección, cuantificación e identificación de los virus estudiados. Estos análisis se realizan principalmente a través de técnicas de cultivo celular o reacciones moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aunque la elección de la técnica depende de los requerimientos del estudio (Betancourt *et al.*, 2010).

Cultivo Celular para Aislamiento Viral

Es un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento. Además, permite detectar virus infecciosos en base a la expresión de efecto citopático viral (ECP) y permite cuantificar el número de partículas virales infecciosas siguiendo el método del número más probable de virus totales cultivables (TCVA-MPN, de total culturable virus assay-most-probable number). Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica huésped-virus, y es en función de los datos clínicos y del tipo de muestra que se elige el cultivo para inocular el material. (Saavedra *et al.*, 2012).

Luego de inocular el cultivo celular, se incuba a 35-37° C por un período de hasta 14 días promedio, esperando la aparición de ECP, toxicidad o degeneración celular, observando el cultivo al microscopio a las 24, 48, 72 h y luego, 2 veces por semana. Se usan cultivos celulares no inoculados para control y comparación con cualquier cambio morfológico

observado en los cultivos inoculados. El ECP es la visualización de cambios morfológicos más o menos característicos en las células inoculadas producidas por la acción del virus sobre el cultivo celular (Lee y Yeong, 2004; Saavedra *et al.*, 2012).

Los procedimientos integrados de cultivo celular con PCR y cultivo celular seguido de RT-PCR permiten además excluir la amplificación molecular de virus inactivos o no infecciosos. Sin embargo, la confiabilidad y capacidad de detección de virus entéricos depende del grupo de cebadores utilizados en la mezcla de reacción (Lee y Yeong, 2004; Saavedra *et al.*, 2012).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1997 (Madigan *et al.*, 2009), cuyo objetivo es la amplificación enzimática de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Este proceso utiliza múltiples ciclos de desnaturalización de plantillas de ADN, hibridación de cebadores y elongación para amplificar las secuencias de ADN diana. Es un proceso exponencial ya que los productos amplificados de cada ciclo anterior sirven como plantillas para el siguiente ciclo de amplificación, convirtiéndolo así en una técnica altamente sensible para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Por lo general, el producto amplificado se genera después de 20 a 40 ciclos de PCR, para posteriormente, ser visualizado en un gel de agarosa o poliacrilamida teñido con bromuro de etidio (Santos, 2004). En términos generales, la PCR se puede utilizar para detectar y amplificar el ácido nucleico desde cualquier lugar, independientemente de la cantidad y la combinación, ya que solo se necesita una cantidad inicial limitada para la amplificación (Santos, 2004).

Transcripción Inversa o Reversa (RT)-PCR

Esta técnica es una variante de la PCR convencional, comúnmente usada en laboratorios de biología molecular con la finalidad de generar un gran número de copias de ADN, este proceso es llamado "amplificación". En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es convertido en un ADN complementario o copia (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en una PCR tradicional, para proporcionar

un método rápido y sensible para analizar la expresión génica. La RT-PCR no debe ser confundida con la PCR en tiempo real, PCR cuantitativa o Q-PCR, la cual a veces de manera errónea se abrevia como RT-PCR (Sobsey *et al.*, 1998; Abbaszadegan *et al.*, 1999; Espinosa-García *et al.*, 2004).

La amplificación exponencial mediante la RT-PCR supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con el campo del diagnóstico molecular y con la investigación científica. La especificidad de las técnicas de PCR y RT-PCR radica en que se detectan secuencias de nucleótidos del genoma del virus de interés, aunque no es posible saber si los virus detectados son activos o infecciosos (Sobsey *et al.*, 1998; Abbaszadegan *et al.*, 1999; Espinosa-García *et al.*, 2004).

PCR anidada o nested

La PCR anidada es una variación de la PCR convencional cuya función es mejorar la especificidad y el rendimiento de los amplicones deseados. En este método, se suelen aplicar dos reacciones de amplificación secuenciales, cada una de las cuales utiliza un par diferente de cebadores de PCR: un conjunto (cebadores externos) flanquea una región de ADN que contiene el amplicón de interés, mientras que un segundo conjunto (cebadores anidados) corresponde a la región precisa de ADN que se amplificará (Thermo Fisher Scientific, 2022). Los cebadores externos se utilizan en una primera ronda de PCR para amplificar el objetivo con regiones flanqueantes extendidas. El producto de esta primera ronda luego sirve como molde en una segunda ronda de PCR con los cebadores anidados (Thermo Fisher Scientific, 2022).

El uso de dos pares de oligonucleótidos permite realizar un mayor número de ciclos, aumentando así la sensibilidad de la PCR. La especificidad mejorada de la reacción se deriva de la unión de dos conjuntos separados de cebadores a la misma plantilla diana (Green y Sambrook, 2019).

Electroforesis

La creación de la electroforesis como un método de separación de ADN bicatenario de cadenas simples se remonta al año 1962, elaborado por Matsubara y Takagi, donde se utilizaba el almidón como polímero. La necesidad de analizar moléculas de ADN de

longitudes variables propició el estudio de otros compuestos que pudieran utilizarse como soporte en las pruebas de electroforesis, surgiendo la agarosa en 1969 como un candidato adecuado debido a las características que posee. La agarosa es un polisacárido obtenido del aislado de agar de algas rojas marinas, el cual está constituido por unidades repetidas de agarobiosa, sustituida de manera extensa en grupo ésteres de sulfato, ácido pirúvico cetil y ésteres metálicos (Montalvo Navarro y Flores, 2016).

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar la presencia de adenovirus, enterovirus y rotavirus en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en la estación seca de 2021.

Objetivos específicos:

- Detectar la presencia de adenovirus, enterovirus y rotavirus por medio de análisis moleculares y cultivo celular en muestras de los 12 sitios de muestreo en la Bahía de Panamá, durante la temporada seca de 2021.
- Determinar en que sitios se detecta mayor incidencia viral en las muestras de agua y aire obtenidas en los 12 diferentes puntos de muestreo en la Bahía de Panamá, durante la temporada seca de 2021.

HIPÓTESIS

Ha: Se detecta virus en muestras de agua y aire, confirmando la presencia de virus entéricos en la Bahía de Panamá en la estación seca de 2021.

Ho: No se detecta virus en muestras de agua y aire, lo que no confirma la presencia de virus entéricos en la Bahía de Panamá en estación seca de 2021.

Hc: Se logra conocer la prevalencia de virus en los 12 diferentes puntos de la Bahía de Panamá en estación seca de 2021, por técnicas moleculares y efecto citopático en cultivo celular, confirmando a la Bahía de Panamá como posible foco de infección por la presencia de virus entéricos en aire y agua.

.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y
MÉTODOS

Área de estudio

La bahía de Panamá se encuentra en la República de Panamá con una superficie de 85.664,6 hectáreas (ha) y con las coordenadas 8°53'00.0"N y 78°56'00.0"O. El área de estudio se realizó a lo largo de la zona costera en donde se establecieron 12 puntos de muestreo, comprendidos en un tramo desde Costa del Este hasta Isla Flamenco (Calzada de Amador) (Figura 4).

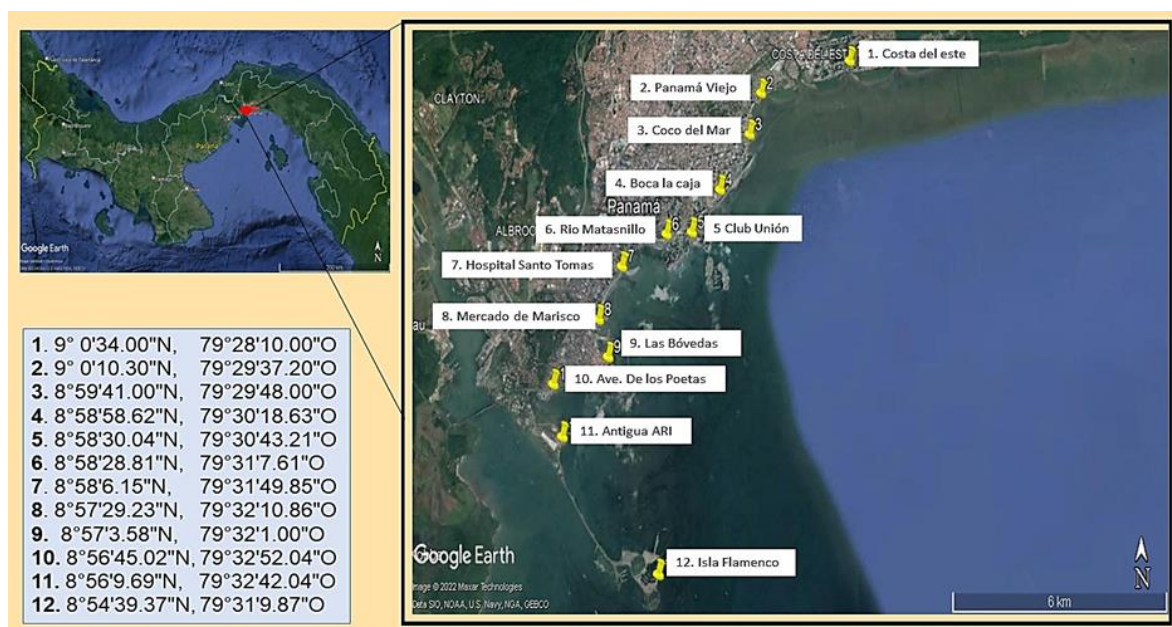


Figura 4. Vista panorámica de los sitios de muestreo a lo largo de la zona costera de la Bahía de Panamá (Realizada en este trabajo con Google Earth)..

Fase de campo

Sitios de muestreo

Para efecto del muestreo, se tomaron 12 muestras de aire y agua correspondiente a 12 estaciones a lo largo de la zona costera de la bahía de Panamá, cercanas a los colectores de aguas servidas de acuerdo con las horas establecidas en la tabla de mareas altas del Canal de Panamá en un tramo desde Costa del este hasta la Calzada de Amador (Tabla 1).

Tabla 1. Sitios de muestreo.

SITIOS DE MUESTREO	
Punto 1: Costa del Este	Punto 7: Hospital Santo Tomás
Punto 2: Panamá La Vieja	Punto 8: Mercado del Marisco
Punto 3: Coco del Mar	Punto 9: Las Bóvedas
Punto 4: Boca La Caja	Punto 10: Avenida de Los Poetas
Punto 5: Club Unión	Punto 11: Antigua Autoridad de la Región Interoceánica (ARI)
Punto 6: Río Matasnillo	Punto 12: Isla Flamenco

El muestreo se llevó a cabo durante tres meses de la temporada seca (marzo, abril y mayo) de 2021. Para la colecta se escogieron dos días aleatorios por cada mes y se dividieron los 12 puntos descritos anteriormente (6 puntos/día), hasta completar los tres meses.

Diseño experimental

Colecta de muestras

Aire

Las muestras de aire fueron tomadas por medio de un sistema de Impinger o borboteador (Impinger AGI-30, ACE Glass, EE. UU.), previamente esterilizado, el cual se colocó sobre una gradilla y conectó a una bomba de vacío con batería para la recolección de aerosoles a una velocidad de flujo entre 3 a 5 L/min, lo que daba como resultado 180 a 300 L de aire, que es depositado en 50 mL de solución salina tamponada fosfato-peptona (PBS-Peptona) estéril. Se colectó 1 muestra por punto de muestreo al mes, lo que hace un total de 36 muestras/temporada seca. Las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas en bolsas ziploc estériles para evitar contaminación cruzada, manteniendo la cadena de frío.

Agua

Las muestras de agua fueron tomadas con la ayuda de una barra de aproximadamente 10 metros (m), colectándose 1 litro (L) de agua en envases estériles. Se colectó 1 L

de muestra por punto de muestreo al mes, lo que hace un total de 36 muestras/temporada seca. Posteriormente, se almacenaron en bolsas ziploc para evitar la contaminación cruzada.

Para cada toma de muestra, se utilizaron guantes de látex y alcohol al 70% para evitar la contaminación cruzada entre puntos y se lavó el colector con hipoclorito sódico al 10% y agua destilada estéril. Las muestras recolectadas se guardaron en bolsas herméticas dentro de hieleras portátiles con hielo, para mantener la cadena de frío al ser trasladadas a los Laboratorios de Microbiología de Agua (LAMA), y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá, hasta su procesamiento y análisis correspondientes

Fase de laboratorio

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

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

Punto de muestreo	Codificación en matriz de aire (Ai)			Codificación en matriz de agua (Ag)		
	Marzo	Abril	Mayo	Marzo	Abril	Mayo
Costa del Este	Ai-1	Ai-13	Ai-25	Ag-37	Ag-49	Ag-61
Panamá Viejo	Ai-2	Ai-14	Ai-26	Ag-38	Ag-50	Ag-62
Coco del Mar	Ai-3	Ai-15	Ai-27	Ag-39	Ag-51	Ag-63
Boca la Caja	Ai-4	Ai-16	Ai-28	Ag-40	Ag-52	Ag-64
Club Unión	Ai-5	Ai-17	Ai-29	Ag-41	Ag-53	Ag-65
Río Matasnillo	Ai-6	Ai-18	Ai-30	Ag-42	Ag-54	Ag-66
Hospital Santo Tomas	Ai-7	Ai-19	Ai-31	Ag-43	Ag-55	Ag-67
Mercado del Marisco	Ai-8	Ai-20	Ai-32	Ag-44	Ag-56	Ag-68
Las Bóvedas	Ai-9	Ai-21	Ai-33	Ag-45	Ag-57	Ag-69

Av. Los Poetas	Ai-10	Ai-22	Ai-34	Ag-46	Ag-58	Ag-70
Antigua ARI	Ai-11	Ai-23	Ai-35	Ag-47	Ag-59	Ag-71
Isla Flamenco	Ai-12	Ai-24	Ai-36	Ag-48	Ag-60	Ag-72

Clarificación de las muestras de agua

Se vertió 210 mL de muestra de cada envase de 1 L en 4 botellas estériles de 250 mL, con la ayuda de una probeta estéril. Este proceso de división de la muestra se realizó dentro de una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación externa, luego se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 10 min. Después, se tomó 190 mL del sobrenadante de cada muestra y se colocaron en envases estériles nuevos de 250 mL y se refrigeraron a 4°C.

Concentración de ADN con Polietilenglicol (PEG)

Aire

De los 50 mL de muestra colectadas, se utilizaron 15 mL, se depositaron en tubos Falcon estériles de 50 mL, a los cuales se les añadieron 15 mL de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) al 16%. Las muestras se agitaron toda la noche a 4°C en un rodillo automatizado (roller), con una velocidad en el nivel 20, durante 24 h. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 250 µL de solución tamponada salina fosfato (PBS) estéril al 1X. Al finalizar la resuspensión de todas las botellas, se distribuyeron en tubos eppendorf estériles alícuotas de 250 µL y se conservaron a -80°C para ser utilizados posteriormente en la extracción de ácido nucleico total y aislamiento viral en cultivo celular.

Agua

A los cuatro envases estériles con 190 mL de muestra por punto, se le añadió 16.8 g de polietilenglicol 8000 (PGE 8000) para llegar a una concentración final de 8%. Las muestras se agitaron toda la noche a 4°C en un rodillo automatizado (roller), con una

velocidad en el nivel 20, durante 24 h. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 30 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 250 µL de solución tamponada salina fosfato (PBS) estéril al 1X. Al finalizar la resuspensión de todas las botellas, se distribuyeron en tubos eppendorf estériles alícuotas de 250 µL y se conservaron a -80°C para utilizarlo posteriormente en la extracción de ácido nucleico total y aislamiento viral en cultivo celular.

Filtrado de muestras

Para el filtrado de las muestras procesadas se utilizó jeringuillas de 10 mL para unificar las muestras que estaban distribuidas en diferentes tubos eppendorf. Luego, se retiró la aguja de la jeringuilla para colocar el filtro de membrana con poros de tamaño 0.22 µm a la parte posterior de la jeringuilla. Posteriormente, se traspasaron las muestras por el filtro de membrana y se colocaron en tubos eppendorf estériles rotulados con su respectivo código de identificación.

Cultivo celular

Para los procedimientos de preparación de medios de cultivos de crecimiento al 10% de suero fetal bovino (SFB) y de mantenimiento al 2% de SFB, para los pasos de crecimiento y mantenimiento de la línea celular, tripsinización o subpasajes, y la infección viral, se siguió los procedimientos del Manual de Virología Médica de la Universidad de Costa Rica (Herrero-Uribe *et al.*, 2004).

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

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), SFB inactivado (10% para crecimiento y 2% para mantenimiento), L-Glutamina al 100 X, Penicilina/Estreptomina al 100 X, NaHCO₃ al 7.5%, HEPES al 1 M y glucosa al 10%, todo en un volumen final de 500 mL (Tabla 3).

Crecimiento de cultivo celular

Para el crecimiento del cultivo celular se utilizó la línea celular Vero (Riñón de Mono Verde Africano), (Donación por el Departamento de Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud-ICGES). Una vez recibida la botella de cultivo de 75 cm² con la línea celular Vero, se limpió cuidadosamente con etanol al 70%, luego, se introdujo a la cámara de flujo laminar y se cambió el medio de mantenimiento al 2% por 10 mL de medio de crecimiento al 10% fresco, seguidamente se incubó a 37°C durante toda la noche.

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

Tripsinización y pasaje o sub-cultivo

Se eliminó el medio de cultivo de mantenimiento al 2% de la botella de 75 cm², seguidamente se lavó con 5 mL de solución salina tamponada (PBS) estéril y se descartó en un envase con hipoclorito sódico al 0.5%. Se agregaron 3 mL de tripsina precalentada a 35°C para cubrir la monocapa y se incubó a 37°C durante 15 min. Luego, de 3-5 min se observó al microscopio que las células estuvieran redondas o levantadas (en el caso de no observar ningún cambio se esperó hasta completar los 15 min o hasta observar cambios visibles en las células).

Cuando la mayoría de las células estaban redondas o levantadas se eliminó con cuidado 1 mL de tripsina y se incubó a 37°C por 5 min más. Para acelerar el proceso, se dieron pequeños golpecitos en el costado de la botella de cultivo para que las células se desprendieran por completo de la superficie. Finalmente, se agregaron 10 mL de medio de crecimiento 10%, subiendo y bajando suavemente el medio, asegurándonos que topará con la parte en donde las células estaban adheridas a la superficie.

Se traspasaron 9.5 mL del cultivo celular a un tubo cónico de 50 mL, se agregaron 40.5 mL de medio de crecimiento 10% y se homogeneizó. Al cultivo celular restante en la botella de

75 cm², se le agregaron 10 mL de medio de crecimiento al 10% de SFB, se rotuló con el siguiente pasaje y la fecha, posteriormente se incubaron a 37°C hasta realizar el siguiente pasaje.

Para la infección de 72 muestras de agua y aire, se utilizaron cuatro platos de 24 pocillos. Cada plato se rotuló en un extremo con la fecha, el pasaje correspondiente y los dos primeros pocillos como Control negativo (C-) y Control positivo (C+), seguido de la enumeración de las muestras. Se agitó el tubo cónico con cultivo celular previamente tripsinizado, de manera circular y a la vez se agregaron 500 µL a cada pocillo del primer plato. Al terminar, se volvió a colocar la tapa del plato y se agitó fuertemente unas 10 veces a la derecha, y unas 10 veces a la izquierda. Estos pasos se repitieron con los tres platos restantes.

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

Infección viral

Se sacaron los tubos eppendorf de muestras del congelador a -80°C hasta que se descongelara a TA. Una vez descongeladas, se limpió el exterior del vial con etanol al 70% y se introdujeron a la cámara de flujo laminar. Se observó en el microscopio que todos los platos que se iban a utilizar presentarán una confluencia del 70 - 80%. Una vez que se confirmó la confluencia del cultivo celular, se eliminó el medio de mantenimiento al 2% de SFB y se lavó cada pocillo con 250 µL de PBS estéril, y se descartó en un envase con hipoclorito de sodio al 0.5%.

Luego, se le agregó 150 μ L de medio sin SFB al C- y 100 μ L al resto de los pocillos de cada plato. Al C+ se le agregaron 50 μ L de una cepa de *Enterovirus* y *Adenovirus* previamente cultivados en una línea celular VERO. En el plato 1 y 2 se colocó como C+ a *Adenovirus* y en el plato 3 y 4 a *Enterovirus*. Posteriormente, a los pocillos rotulados con el número de muestra, se le agregaron 50 μ L de cada muestra correspondiente previamente descongelada, y después, se incubó a 37°C durante 1 h, realizando movimientos circulares a los platos cada 15 min. Después, se eliminó el medio en el envase de hipoclorito de sodio al 0.5% y se le agregaron 500 μ L de medio de mantenimiento al 2% de SFB a cada pocillo (Tabla 3). Los platos se incubaron a 37°C con revisiones cada día, hasta observar ECP o durante una semana. Se adoptó el criterio para valorar la sensibilidad en la línea celular según la proporción de las células que manifiestan ECP, dando como resultado positivo la presencia viral (Tabla 4) (Mcintosh, 1996).

Clarificación de muestras

Cada vez que una muestra presentaba ECP al 100%, se raspó el pocillo con una punta de 1000 mL estéril y se traspasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. Se congeló durante 10 min a -80°C y luego, se descongeló a 37°C en baño María, y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se colocó en tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, rotulado con el número de muestra y se almacenó a -80°C hasta realizar la extracción de ácidos nucleicos o un 2° pasaje y posteriormente, la detección molecular para confirmar la presencia de las partículas virales.

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

Solución	Medio de crecimiento 10%	Medio de mantenimiento 2%
DEMEM	401 mL	441 mL
Suero fetal bovino 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
Glucosa al 10%	22, 5 mL	22, 5mL

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

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

Extracción de ácidos nucleicos totales en muestras de cultivo celular y directas

Para la extracción de los ácidos nucleicos virales se utilizó el kit de extracción Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification (Promega, EE. UU.) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Lisis

Las muestras fueron colocadas en el vortex por 10 s para homogenizarlas. Luego, se mezclaron 300 µL de la muestra con 330 µL de la solución de lisis (300 µL Buffer de lisis y 30 µL de solución de proteínas K), en tubos eppendorf de 1.5 mL rotulados con el número de muestra y seguidamente, se mezcló en el vortex durante 10 s, y se incubó en un plato seco a 56°C por 10 min.

Extracción de ácidos nucleicos totales

Una vez terminada la lisis, se colocaron los cassette de extracción, LEV plungers y tubos de elución de 0.5 mL en el rack de cassettes de extracción Maxwell® 16 LEV (Cat.# AS1251) y se añadieron 300 µL de la muestra lisada en el pocillo 1 del cassette de extracción. A los tubos de elución se les añadieron 40 µL de agua libre de nucleasas. Por último, se introdujo el rack del Maxwell en el equipo para iniciar los 45 min del proceso de purificación.

Almacenamiento

La solución de ácidos nucleicos totales se almacenó en alícuotas de 10 µL a -80°C hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la RT-PCR y PCR anidada se siguió el protocolo estandarizado según las investigaciones realizadas anteriormente sobre detección molecular de *Adenovirus*, *Rotavirus* y *Enterovirus* (Casas *et al.*, 1997; Avellón, *et al.*, 2005; Ngaosuwankul *et al.*, 2013).

Detección molecular de AdV con la técnica de ICC-PCR anidada

La técnica de ICC-PCR anidada (cultivo celular integrado seguido por una PCR anidada) para la detección de AdV, se realizó según el protocolo de Avellón *et al.* (2005). En un volumen final de 25 µL de los cuales 20 µL eran de la Mezcla Maestra (Master Mix), que contenía: 12.5 µL Master Mix 2X (Taq ADN polimerasa, dNTPs, Sulfato de Magnesio), 0.5 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward (25 µM) y 0.5 µL de cebadores o primer hacia atrás o reverse (25 µM) (Tabla 5), 2.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 7.0 µL de agua libre de nucleasas, y los 5 µL restantes en la mezcla, fueron completados con el volumen de muestra (ácido nucleico) extraído.

Se utilizó el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA EE. UU.) con el siguiente programa: 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 30 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 7 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se

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

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

<i>Cebador</i>	Secuencia (5´- 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)	Referencia
<i>ADHEX1F</i>	5-AACACCTAYGASTACATGAAC-3	ORF2/3	475	Avellón <i>et al.</i> , 2005
<i>ADHEX1R</i>	5-KATGGGGTARAGCATGTT-3			
<i>ADHEX2F</i>	5-CCCMTTYAACCACCACCG-3		168	
<i>ADHEX2R</i>	5-ACATCCTTBCKGAAGTTCCA-3			

Detección molecular de EV con la técnica de ICC-RT-PCR anidada

La reacción de ICC-RT-PCR anidada (cultivo celular integrado seguido por una retrotranscripción y PCR anidada) para la detección de EV se realizó según el protocolo de Casas *et al.*, 1997 y se utilizó el Kit Access Quick™ RT-PCR System (Promega, EE. UU.). La reacción de RT-PCR tendrá un volumen final de 25 µL, de los cuales 20.0 µL serán de la Mezcla Maestra que contenía: 12.5 µL de Mix RT-PCR 2X (Tfl ADN polimerasa, dNTPs, Sulfato de Magnesio y buffer de reacción), 0.5 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward (25 µM), y 0.5 µL de cebadores o primer hacia atrás o reverse (25 µM) (Tabla 6), 2.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 3.5 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL de AMV Transcriptasa Reversa 5u/µL y los 5 µL faltantes en la mezcla, fueron completados con el volumen de muestra (ácido nucleico) extraído.

Se utilizó el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 45 min a 48°C para la retrotranscripción, 3 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 40 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 7 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta almacenar a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

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

Grupo	Cebador	Secuencia (5´- 3´)	Gen que franquea	Amplicon (pb)	Referencia
I	EV1+	5´-CGGTACCTTTGTRCGCCTGTTTTA-3´	ORF1/ ORF2	995	Casas <i>et al.</i> ,1997
	EV1-	5´-GAAACACGGACACCCAAAGTAGTCG-3´			
	EV2+	5´-CAAGCACTTCTGTTTCCCCG-3´		323	
	EV2-	5´-GGATTAGCCGCATTTCAGGG-3´			

Detección molecular de RoV con la técnica de RT-PCR anidada

La estandarización de los cebadores de RoV se realizó según protocolo de Ngaosuwankul *et al.* (2013), utilizando controles positivos de muestras de heces de niños con gastroenteritis provenientes del Hospital del Niño (HDN). El protocolo implementado utilizó un par de cebadores con secuencia de (5´- 3´) para la RT-PCR, y para la PCR anidada utilizó dos pares de cebadores o primer hacia atrás o reverse con diferentes secuencias, siendo la secuencia del cebador 2.1 la que amplificó los controles positivos (Tabla 7), obteniendo la banda esperada de 348 pb, implementando una RT-PCR que tendrá un volumen final de 25 µL, de los cuales 20.0 µL serán de la Mezcla Maestra que contenía: 12.5 µL de Mix RT-PCR 2X (Tfl ADN Polimerasa, dNTPs, Sulfato de Magnesio y buffer de reacción), 0.5 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward (25 µM), y 0.5 µL de cebadores o primer hacia atrás o reverse (25 µM), 2.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 3.5 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL de AMV Transcriptasa Reversa 5u/µL y los 5 µL faltantes en la mezcla maestra, fueron completados con el volumen de muestra (ácido nucleico) extraído.

Se utilizó el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA EEUU) con el siguiente programa: 1 ciclo de 45 min a 48°C para la retrotranscripción, 3 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 40 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 7 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta almacenar a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

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

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Gen que flanquea	Amplicón (pb)	Referencia
<i>RoV 1F</i>	GGTTTAAAACGAAGTCTTC	VP6	1128	Ngaosuwanukul <i>et al.</i> , (2013)
<i>RoV 1R</i>	CAGTCCAATCATGCCTGGTGGGA			
<i>RoV 2F</i>	GGATCAGAAATTCAGGTCGCTGGAT	VP6	381	
<i>RoV 2.1R</i>	CGCATTTGGAAATAATGCTGC			
<i>RoV 2.2R</i>	ACATTCGCCAATAGAGTCTCAT			

PCR anidada

La reacción de la PCR anidada se realizó en un volumen final de 25 µL, de los cuales 23 µL serán de la Mezcla Maestra que contenía: 12.5 µL Master Mix 2X (Taq ADN polimerasa, dNTPs, Sulfato de Magnesio), 0.5 µL de cebadores o primers hacia adelante o forward (25 µM), y 0.5 µL de cebadores o primer hacia atrás o reverse (25 µM) (Tabla 5), 2.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 7.0 µL de agua libre de nucleasas, y los 2.0 µL restantes serán el producto final de la ICC-PCR (para AdV), ICC-RT-PCR (para EV), y RT-PCR (para RoV).

Se utilizó el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA EE. UU.) con el siguiente programa: 1 ciclo de 3 min a 95°C para la desnaturalización del ADN complementario (ADNc), 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalización, 1 min a 59°C de hibridación, 1 min a 72°C de elongación, 1 ciclo de 7 min a 72°C de elongación final y al finalizar, se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta poder almacenar a 4°C por un día o -20°C para almacenamiento continuo.

Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis

Los productos obtenidos a partir de la PCR anidada fueron analizados mediante electroforesis con la finalidad de comprobar el tamaño del amplicón y así determinar si correspondía con lo esperado.

Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR, estos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X a 100 V por 45 min a 1 h. Se utilizó como agente intercalante el SYBR-Safe de Invitrogen, en una relación de 1 μ L de SYBR-Safe por cada 10 mL Buffer TBE. El marcador de peso molecular utilizado fue el de 100 pb DNA Ladder de Promega y los geles fueron visualizados en un fotodocumentador BioDoc-It® 220 Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido) bajo luz ultravioleta (UV).

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

Resultados

Aislamiento Viral

Las células vero son células hospederas utilizadas para el crecimiento viral debido a su alta permisibilidad para la infección de diversos virus de interés en salud pública. Por lo cual, se utilizaron para realizar una infección *in vitro* para saber la viabilidad de AdV y EV en las 36 muestras de aire y 36 muestras de agua de los tres meses de muestreo (marzo, abril y mayo) de la temporada seca del 2021, y a su vez, aumentar la sensibilidad en la detección de estos virus entéricos con la técnica de ICC-PCR e ICC-RT-PCR, respectivamente.

El ECP se clasificó en 3 niveles de acuerdo con los cambios morfológicos observados en las células, siendo el nivel uno (+) leve, el dos (++) moderado y (+++) alto o fuerte (Tabla 4). En las primeras 24 h post-infección, se observaron células redondeadas y algunas fusiformes en el 25% de los pocillos inoculados de las 36 muestras de aire, esto se determinó como ECP +. A partir de 48 h post-infección, en una muestra de aire del mes de mayo correspondiente al Hospital Santo Tomas (HST), se observó la pérdida de la arquitectura normal de la monocapa y su destrucción, esto se determinó como ECP +++.

El efecto progreso a las 72 h post-infección en las demás muestras, hasta llegar a una lisis o destrucción celular en el 75% de los pozos inoculados, en los cuales nueve muestras presentaron ECP +++, de las cuales 3 pertenecen a marzo, 5 a abril y 2 a mayo. Además, se observó que abril fue el mes que tuvo mayor cantidad de muestras con ECP +++ (Figura 5; Tabla 8).

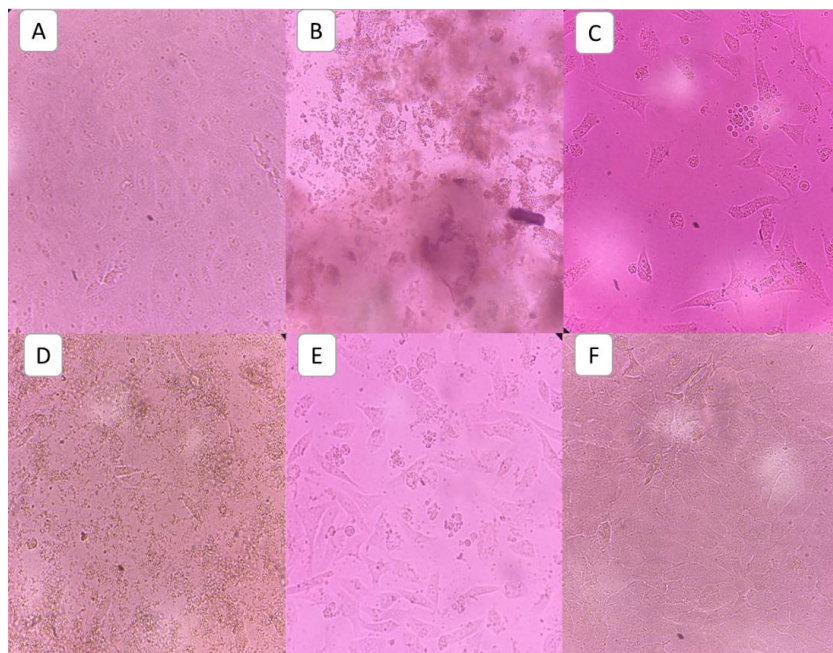


Figura 5. Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de aire. A). Células inoculadas con medio de mantenimiento (DMEM + 2% SFB) (control negativo). B). Células inoculadas con AdV (control positivo). C). Muestra río Matasnillo de marzo donde se evidencio ECP + 24 h post-infección. D). Muestra del HST de mayo donde se evidencio ECP +++ a las 24 h post-infección. E). Muestra del HST de marzo donde se evidencio ECP ++ a las 48h post-infección. F). Muestra del Club Unión de abril, segundo pasaje, donde se evidencio ECP ++ a las 96 h post-infección

Tabla 8. ECP de nivel dos (++) y tres (+++) en matriz de aire en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021.

MES	ECP ++	ECP +++
MARZO	Coco del Mar Boca la Caja Río Matasnillo HST Mercado de Marisco Las Bóvedas Av. de los Poetas Antigua ARI Isla Flamenco	Costa del Este Panamá La Vieja Club Unión
ABRIL	Costa del Este	Club Unión

	Panamá La Vieja Coco del Mar Boca la Caja Av. de los Poetas Antigua ARI Isla Flamenco	Río Matasnillo HST Mercado de Marisco Las Bóvedas
MAYO	Panamá La Vieja Boca la Caja Club Unión Río Matasnillo Mercado de Marisco Las Bóvedas Av. de los Poetas Antigua ARI Isla Flamenco	Costa del Este Coco del Mar HST

Particularmente, en las muestras de agua la infección viral fue muy agresiva, ya que en las primeras 24 h post-infección, las 31 muestras presentaron ECP. Se detectaron 19 muestras con ECP ++, observándose en estas muestras las células redondeadas y con lisis celular en el 50% de los pocillos inoculados. De estas 19 muestras, 8 pertenecen a marzo, 2 a abril y 10 a mayo. Además, en este periodo de tiempo, se observaron 12 muestras con células redondeadas, lisis celular, desprendimiento de células de la monocapa en el 50% de los pocillos inoculados, de las cuales 2 son de marzo, 8 de abril y 1 de mayo. En una segunda evaluación (48 h post-infección), se observó un avance en el ECP de un 75%, en el cual se denotaba desprendimiento celular y la formación de calvas en algunas muestras como: río Matasnillo de marzo y Boca la Caja de abril. La monocapa celular se levantó por completo en todas las muestras entre las 72 h y 96 h post-infección (Figura 6; Tabla 9).

Una vez obtenidos estos resultados se realizó un segundo pasaje adquiriendo resultados a las 96 h post-infección ECP + de las 36 muestras, observándose células redondeadas y multinucleadas en el 75% de los pocillos inoculados. No hubo cambio después de transcurridos los 3 días restantes de incubación.

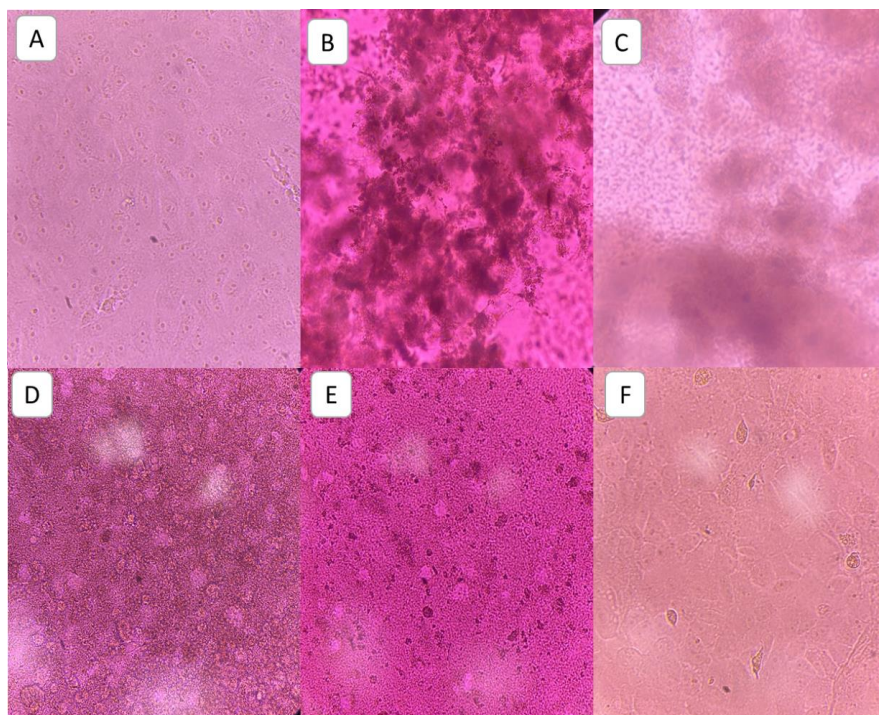


Figura 6. Cultivo celular en línea celular Vero en matriz de agua. A). Células inoculadas con medio de mantenimiento (DMEM + 2% SFB) (control negativo). B). Células inoculadas con EV (control positivo). C). Muestra de Costa del Este de marzo donde se evidencio ECP ++. D). Muestra del río Matasnillo de marzo donde se evidencio ECP +++ a las 48 h post-infección, E). Muestra de Boca la Caja de abril donde se evidencio ECP +++ a las 24h post-infección, F). Muestra de la Antigua ARI de mayo donde se evidencio ECP + a las 96 h post-infección.

Tabla 9. ECP de nivel uno (+), dos (++) y tres (+++) en la matriz de agua en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021.

MES	ECP +	ECP +++
MARZO	Antigua ARI	Costa del Este
	Isla Flamenco	Panamá La Vieja
		Coco del Mar
		Boca la Caja
		Club Unión
		Río Matasnillo
		HST
		Mercado de Marisco
		Las Bóvedas

		Av. de los Poetas
ABRIL	Club Unión Isla Flamenco	Costa del Este Panamá la Vieja Coco del Mar Boca la Caja Río Matasnillo HST Mercado de Marisco Las Bóvedas Av. de los Poetas Antigua ARI
MAYO	Costa del Este	Panamá La Vieja Coco del Mar Boca la Caja Club Unión Río Matasnillo HST Mercado de Marisco Las Bóvedas Av. de los Poetas Antigua ARI Isla Flamenco

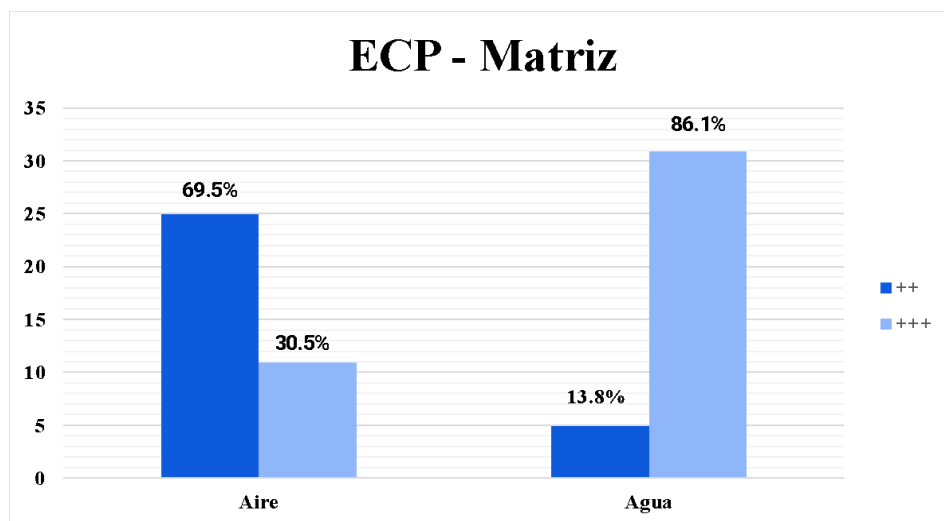


Figura 7. Efecto citopático en matriz de agua y aire de los doce puntos de muestreo de la Bahía de Panamá con respecto al nivel categorizado de ECP

Con respecto al porcentaje de positividad mensual de la matriz de agua y aire en la estación seca, se puede indicar que 11/36 (30.5%) demuestras en la matriz de aire que presentaron ECP +++, en comparación con la matriz de agua, en dónde se observó 31/36 (86.1%) que presentaron ECP +++ (Figura.7).

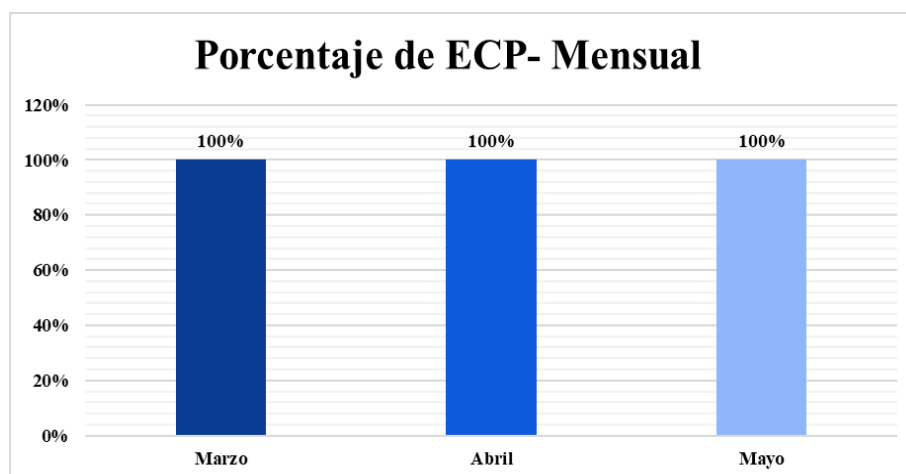


Figura 8. Porcentaje de ECP en los meses de marzo, abril y mayo de la estación seca del 2021 con respecto al ECP en cultivo celular por presencia viral.

Por otra parte, el porcentaje de positividad con respecto a los 12 puntos de muestreo indican que todas las muestras 24/24 de aire y agua por mes de muestreo presentaron un 100% de ECP (Figura 8).

Detección molecular en cultivo celular

Detección molecular de AdV en matriz de aire y agua

El primer grupo de virus evaluados en muestras de cultivo celular en este estudio fue AdV, del cual se cultivaron las 72 muestras en la línea celular Vero. A estas se le extrajeron los ácidos nucleicos totales del sobrenadante del cultivo celular con el kit Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification (EE.UU) y se realizó una PCR anidada utilizando los cebadores de la Tabla 5. Para la electroforesis en el gel de agarosa, se colocaron en cada carril

8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer, un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular de 100pb. En el caso de AdV, el tamaño de banda esperado para el producto amplificado es de 168 pb (Avellón *et al.* 2001), tal como se especifica en la Tabla 5. En todas las muestras de la matriz de aire y agua en los meses de marzo, abril y mayo solo se obtuvieron 2/72 muestras positivas, de las cuales 1 pertenece a abril de la matriz de aire (Isla Flamenco) y 1 a abril de la matriz de agua (Salida de río Matasnillo) (Figura 10).

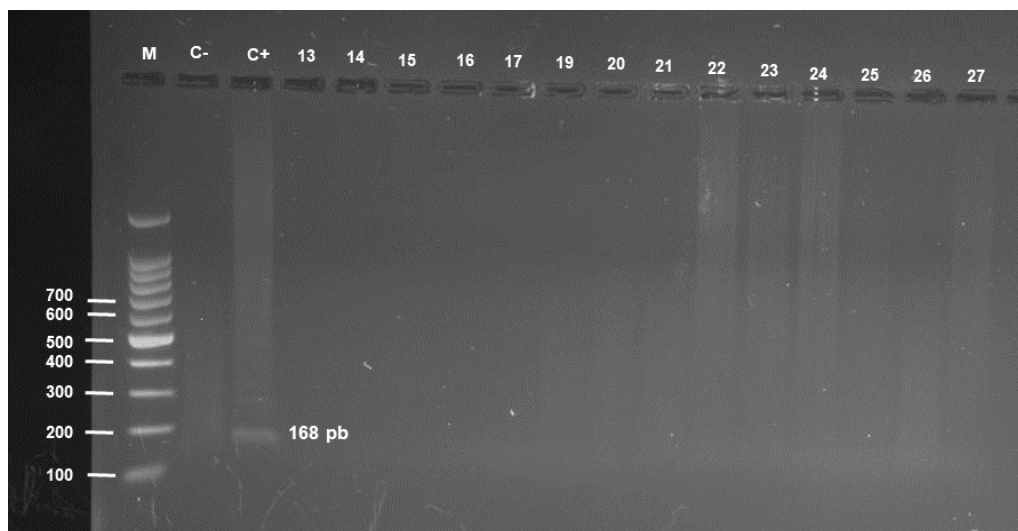


Figura 9. Detección de AdV en matriz de aire en cultivo celular del primer pasaje, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, y 8 μ L de producto de la PCR + 2 μ L de loading buffer. Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 13 – Ai 27. Código de muestras: Ai: aire. 13 a 27: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo el control positivo.

Se realizó nuevamente la electroforesis en gel de agarosa de las muestras presentadas en la Figura 9, debido a que como se muestra en la figura (9), se observó un arrastre o smear prolongado. Posteriormente, se visualizaron dos muestras positivas que anteriormente no habían amplificado como se demuestra en la Figura 10.

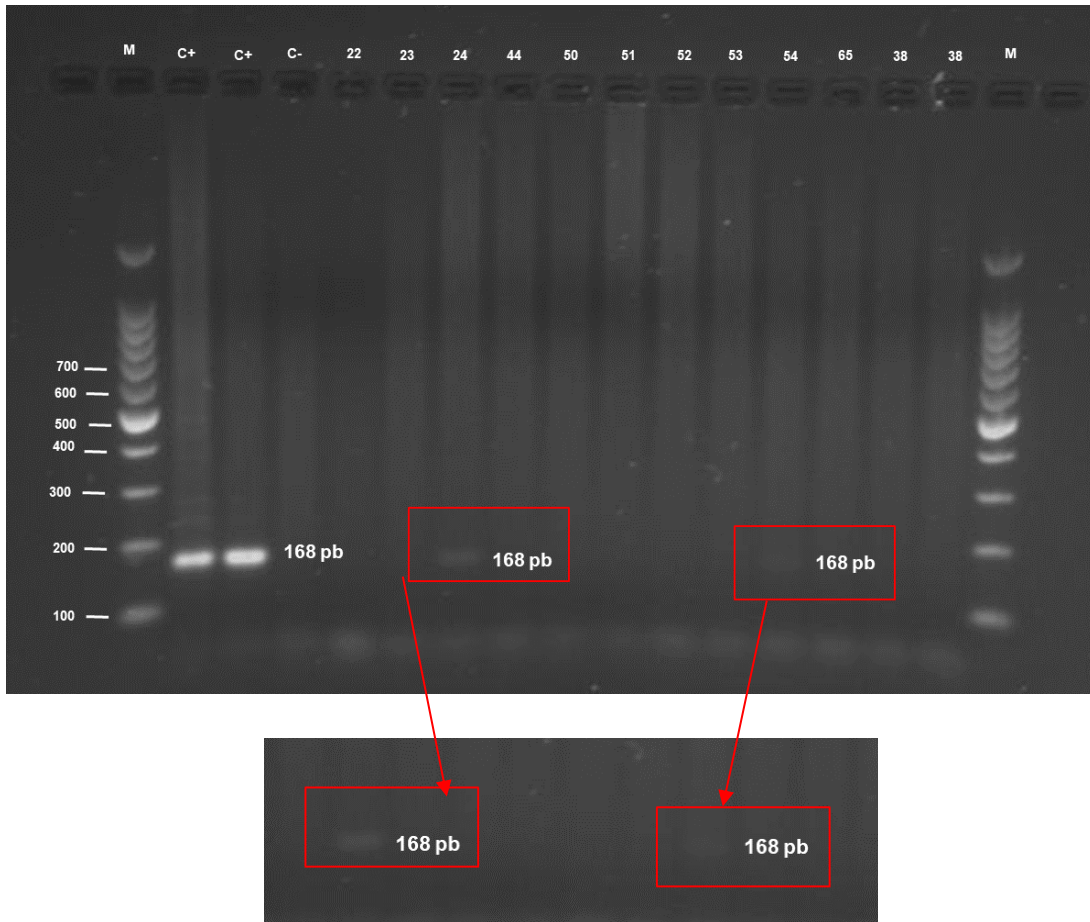


Figura 10. Repetición de la detección de AdV en matriz de aire y agua en cultivo celular del primer pasaje, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Controles positivos), Ai 22 a Ai 24, Ag 44, Ag 50 a Ag 54, Ag 65 y Ag 38. Código de muestras: Ag: agua y Ai: aire. 22-24, 44, 50-54, 65 y 38: número de muestra. Se amplificaron los controles positivos y la muestra 24 (Isla Flamenco, mes de abril en aire) y 54 (Salida de río Matasnillo, mes de abril en agua).

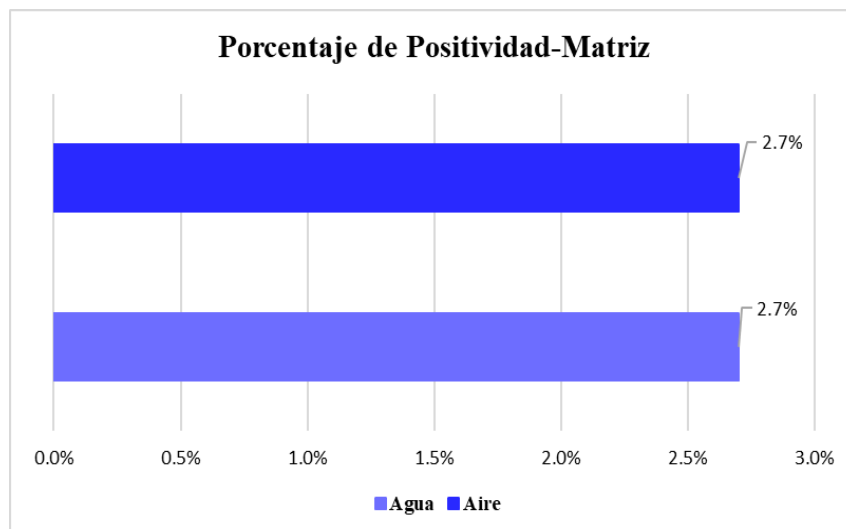


Figura 11. Porcentaje de Positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de cultivo celular por presencia de AdV.

En este gráfico se representa el porcentaje de muestras positivas en presencia de AdV. Se presentó el mismo porcentaje de muestras positivas 2.7% (1/36), ya que se observó la amplificación de solamente una muestra en ambas matrices: aire y agua (Figura 11).

Detección molecular de EV en matriz de aire y agua

El segundo grupo de virus evaluados en muestras de cultivo celular en este estudio fue EV, al cual se le realizó una RT-PCR anidada utilizando los cebadores de la Tabla 6. Para la electroforesis en gel de agarosa, se colocaron en cada carril 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer, un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular de 100 pb. Se realizó una prueba de controles positivos previamente utilizados como control positivo en cultivo celular. Se observó que los controles positivos se amplificaron para el tamaño esperado de 323 pb (Casas *et al.*, 1997) (Figura 12).

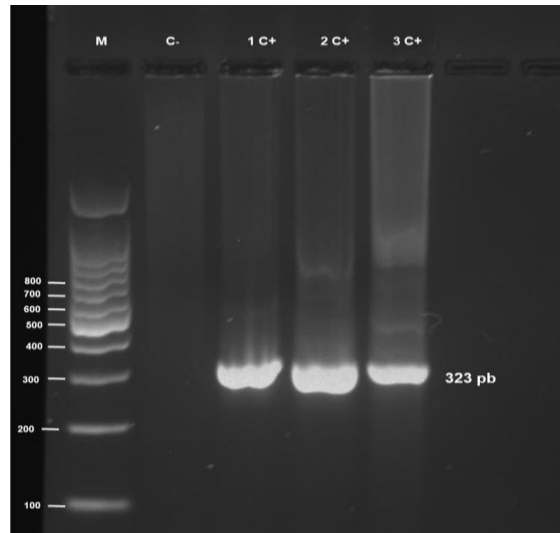


Figura 12. Prueba de controles positivos de EV, visualizados en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. Orden de muestra: M (marcador de peso molecular), C- (control negativo), 1C+, 2C+ y 3C+ (controles positivos). Los tres controles positivos amplificaron en el tamaño esperado.

Una vez realizada la prueba de controles positivos, se procedió a realizar la detección de EV en las muestras de cultivo celular previamente extraídas. En la matriz de aire no se detectó la presencia de EV a diferencia de la matriz de agua en la cual se pudo detectar 6 muestras positivas, 2 pertenecen a marzo (Antigua ARI e Isla Flamenco), 2 corresponden a abril (Club unión e Isla Flamenco) y las restantes 2, pertenecen a mayo (Costa del Este y Mercado de Marisco) (Figura 14).

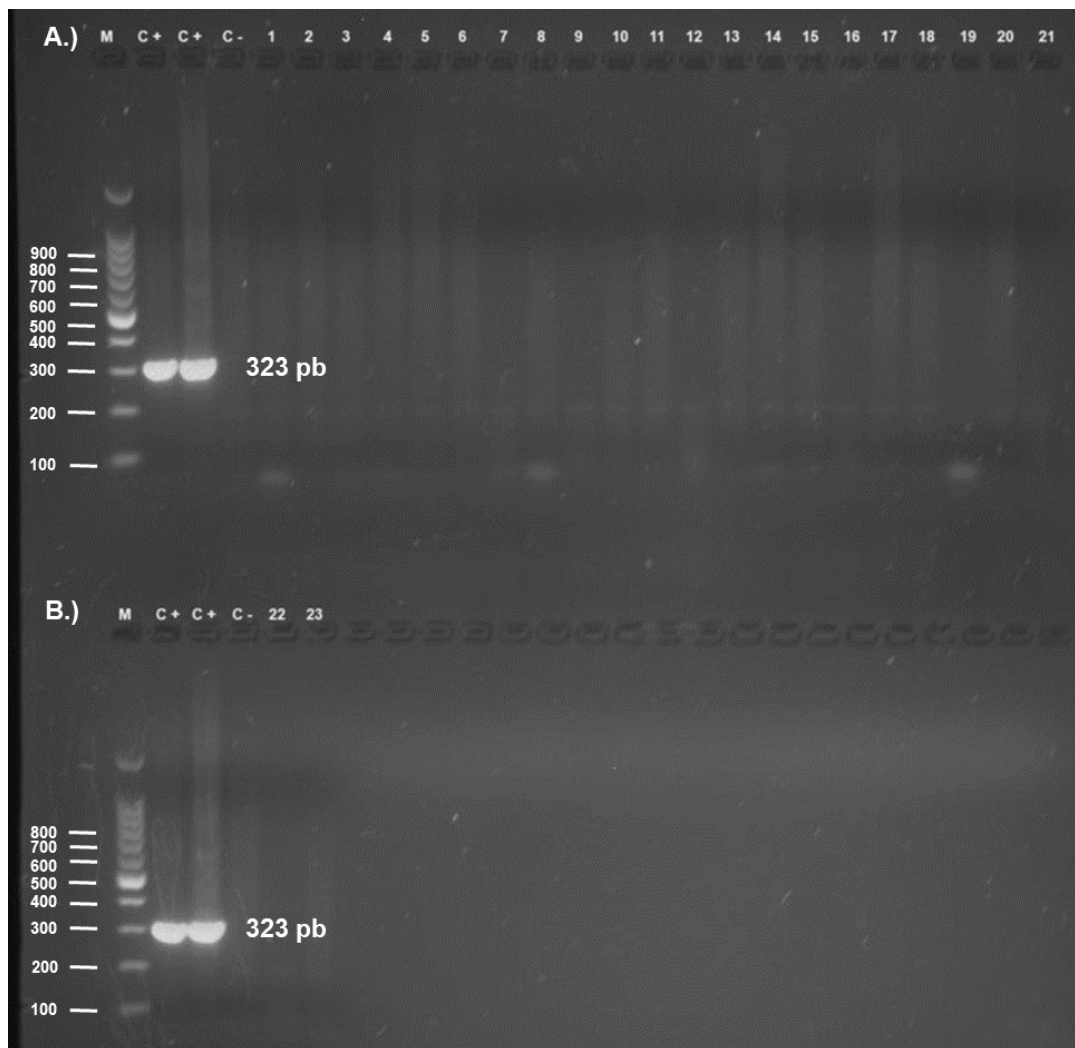


Figura 13. Detección de EV en matriz de aire del primer pasaje de cultivo celular, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a 21. B). Orden de muestras: M (Marcador de peso molecular 100 pb), 1C+, 2C+ (Control positivo), C- (Control negativo), Ai 22 y Ai 23. Código de muestras: Ai: aire. 1-21, 22-23: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo los controles positivos.

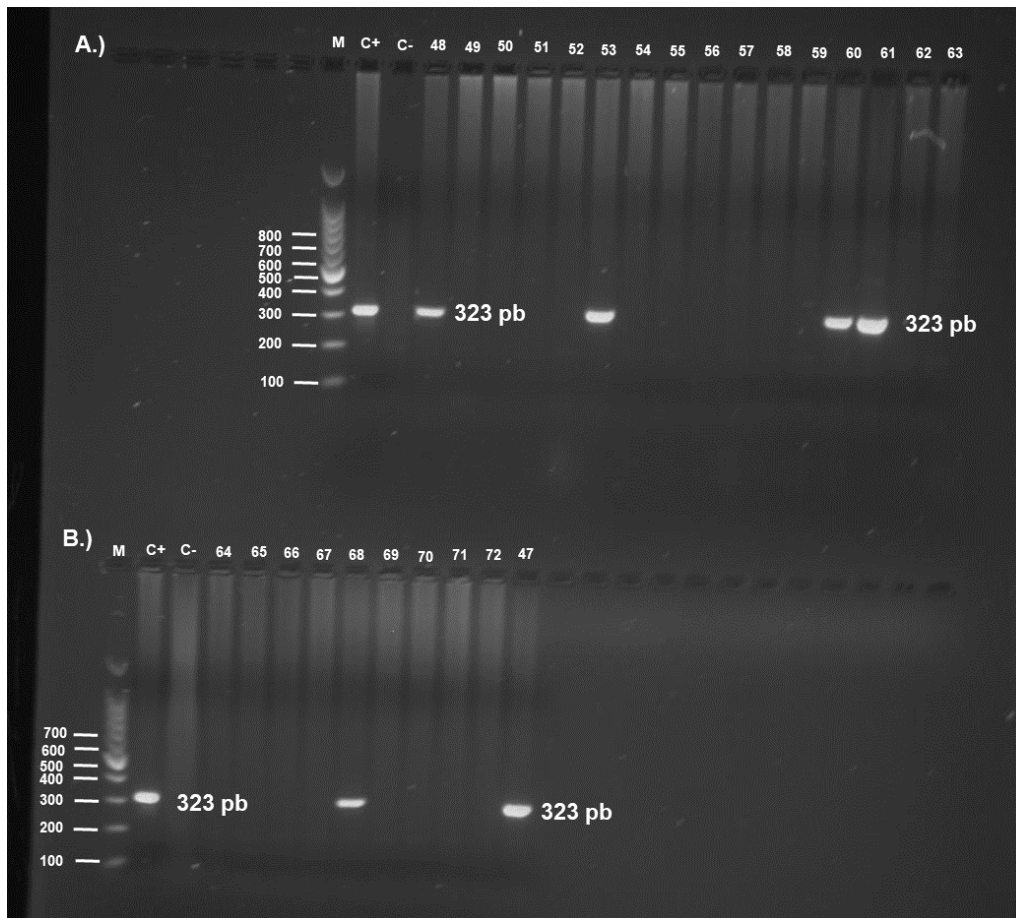


Figura 14. Detección de EV en matriz de agua del primer pasaje en cultivo celular, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (control positivo), C- (control negativo), Ag 48 a Ag 63. B). Orden de las muestras: M (marcador de peso molecular), C+ (control positivo), C- (control negativo), Ag 64 a Ag 72, Ag 47. C). Códigos de muestras: Ag: agua. 48 a 63, 64 a 72, 47: número de muestra. Amplificaron 6 muestras, dos pertenecen a marzo: 47 (Antigua ARI) y 48 (Isla Flamenco), 2 corresponden a abril 53 (Club Unión) y 60 (Isla Flamenco) y las 2 restantes corresponden a mayo 61 (Costa del Este) y 68 (Mercado de Mariscos).

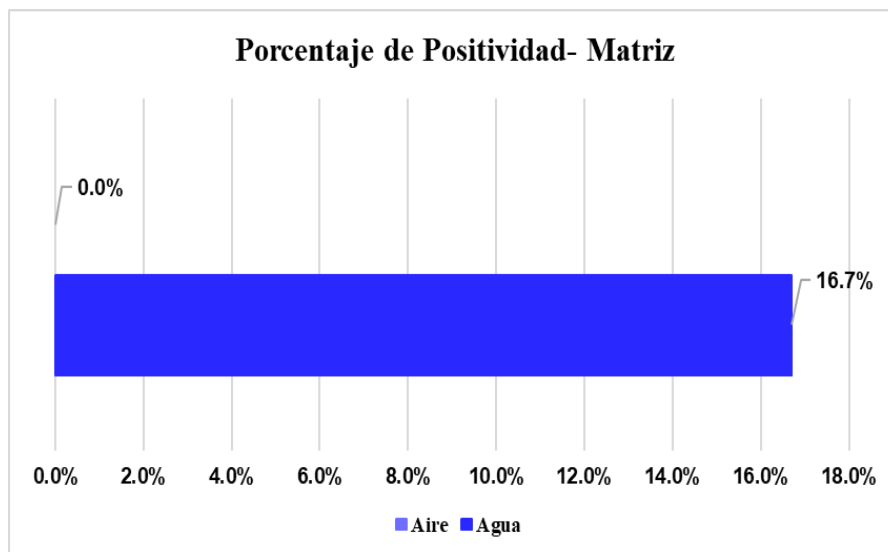


Figura 15. Porcentaje de positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de cultivo celular por presencia de EV.

En esta figura se observa que ninguna muestra de la matriz de aire amplificó para EV (0/36) muestras (0%), contrario a la matriz de agua que amplificaron 6/36 muestras (16.7%), (Figura 15).

Detección molecular en muestras directas

Detección molecular de AdV en matriz de aire y agua

El primer grupo de virus evaluados fue AdV en muestras directas extraídas con el kit Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification y se realizó una PCR anidada utilizando los cebadores de la Tabla 6. Para la electroforesis en el gel de agarosa, se colocaron en cada carril 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer, un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular de 100pb. En el caso de AdV el tamaño de banda esperado para el producto amplificado es de 168 pb, tal como se especifica en la Tabla 5. Se observó la amplificación de la muestra de Panamá La Vieja en matriz de agua de marzo (Figura 16). En las muestras restantes de la matriz de aire y agua de los meses de marzo, abril y mayo, no se registró la presencia de AdV (Figura 16).

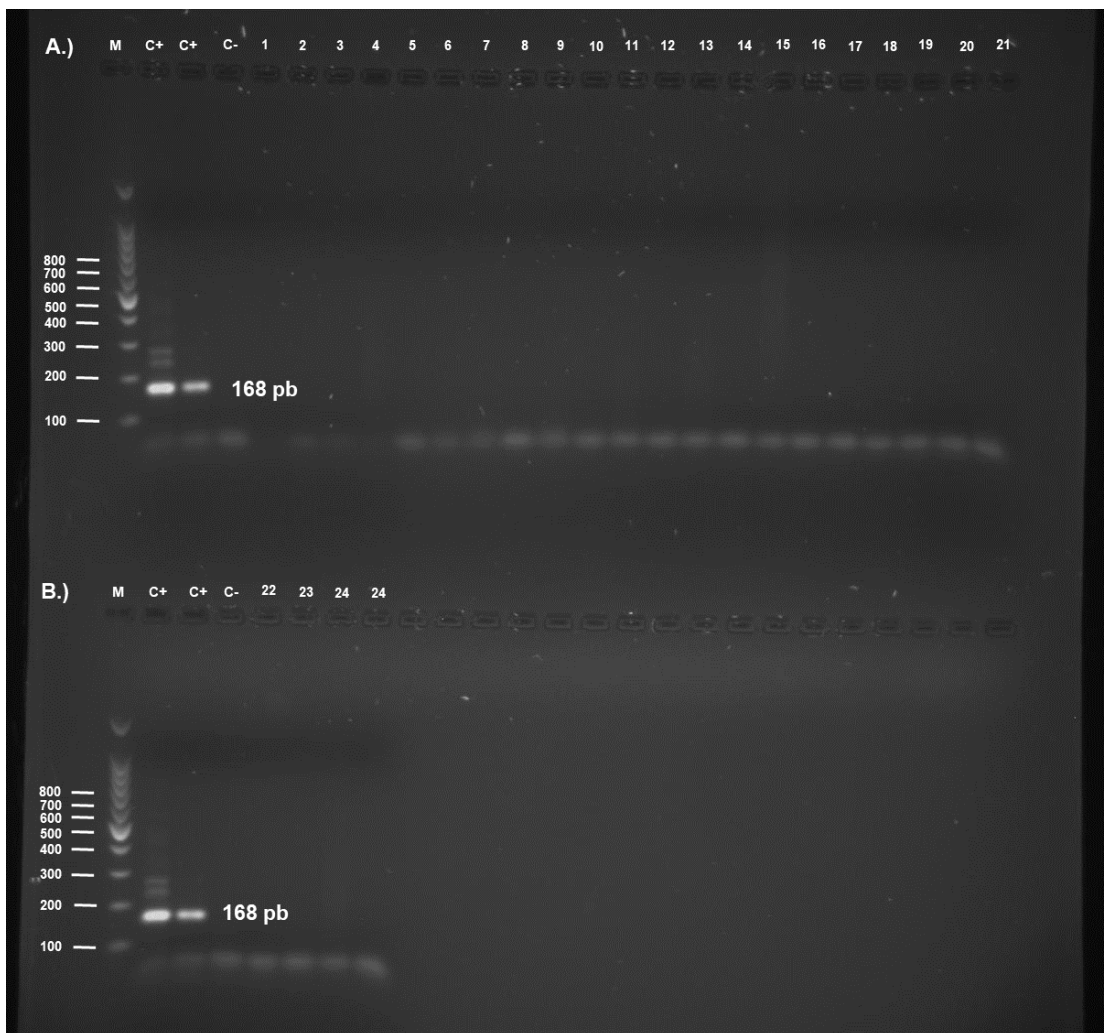


Figura 16. Detección de AdV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 1 a Ai 21. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 22 a Ai 24. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 21, 22 a 24: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo el control positivo.

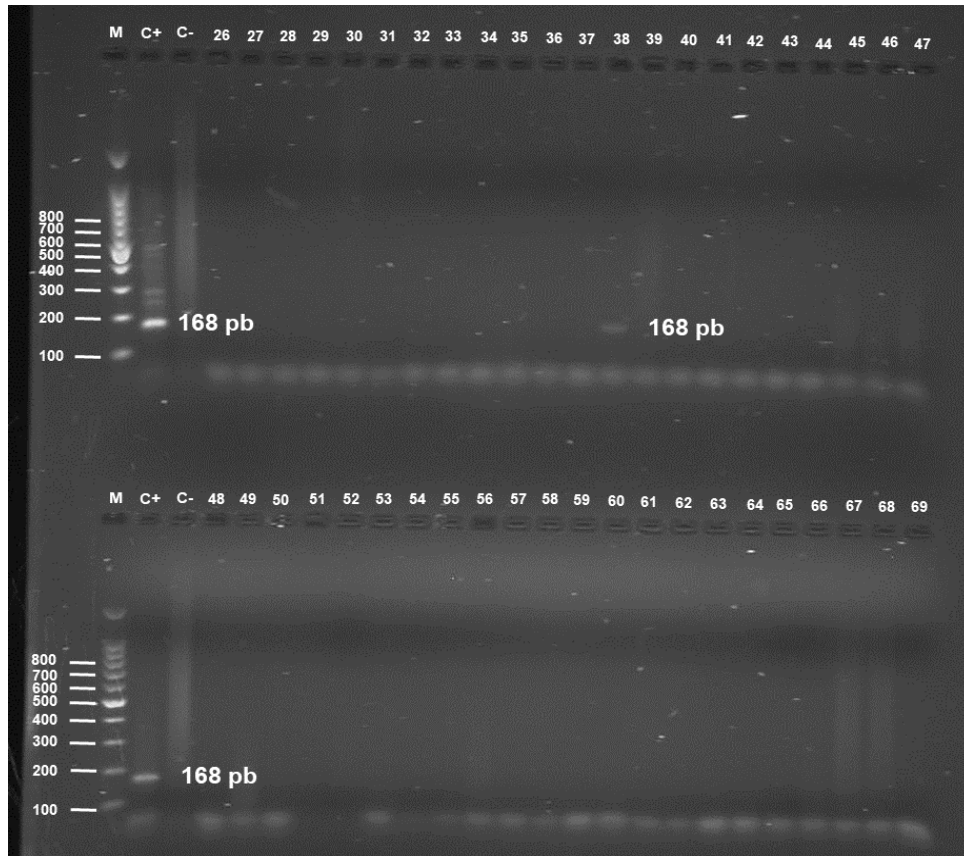


Figura 17. Detección de AdV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ai 26 a Ai 36, Ag 37 a Ag 47. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular), C- (Control negativo), C+ (Control positivo), Ag 48 a Ag 69. Código de muestras: Ai: aire. 26 a 36, 37 a 47 y 48 a 69: número de muestra. Se reportó solo 1 muestra positiva en la matriz de agua, correspondiente a la 38 (Panamá La Vieja de marzo).

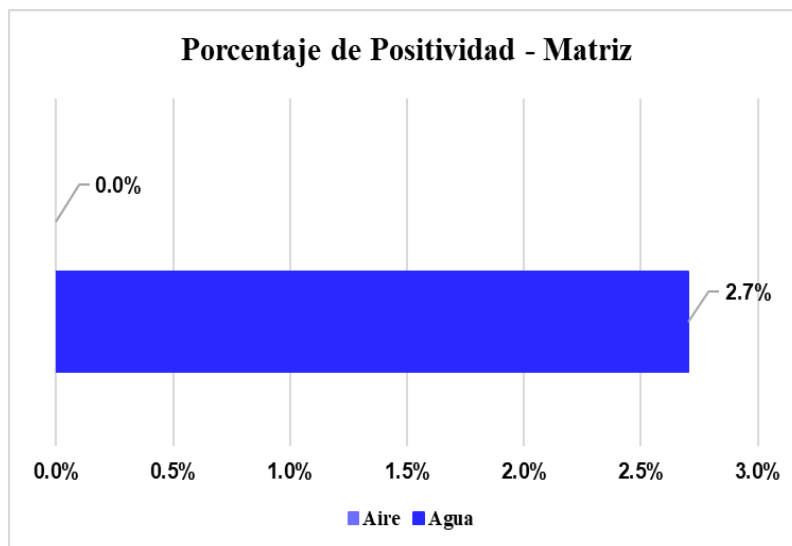


Figura 18. Porcentaje de Positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras positivas de muestras directas por presencia de AdV.

Con respecto al porcentaje de positividad en muestras directas en la matriz de agua y aire, se puede indicar que sólo 1/36 (2.7%) de las muestras amplificaron la banda esperada. En el caso de la matriz de aire ninguna muestra amplificó 0/36 (0%) (Figura 18).

Detección molecular de EV en matriz de aire y agua

El segundo grupo de virus evaluados fue EV en muestras directas extraídas, a las que se les realizó una RT-PCR anidada. Para la electroforesis en el gel de agarosa, se colocaron en cada carril 8 µL de producto de la PCR y 2 µL de loading buffer, un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular de 100 pb. En la matriz de aire no se detectó presencia del virus en las muestras 0/36 (0%) (Figura 20), a diferencia de la matriz de agua en la cual, la muestra del mes de abril (Costa del Este) amplificó el tamaño esperado de 323 pb (Figura 20). En las muestras restantes de agua en los meses de marzo, abril y mayo no se registró la presencia de EV (Figura 19).

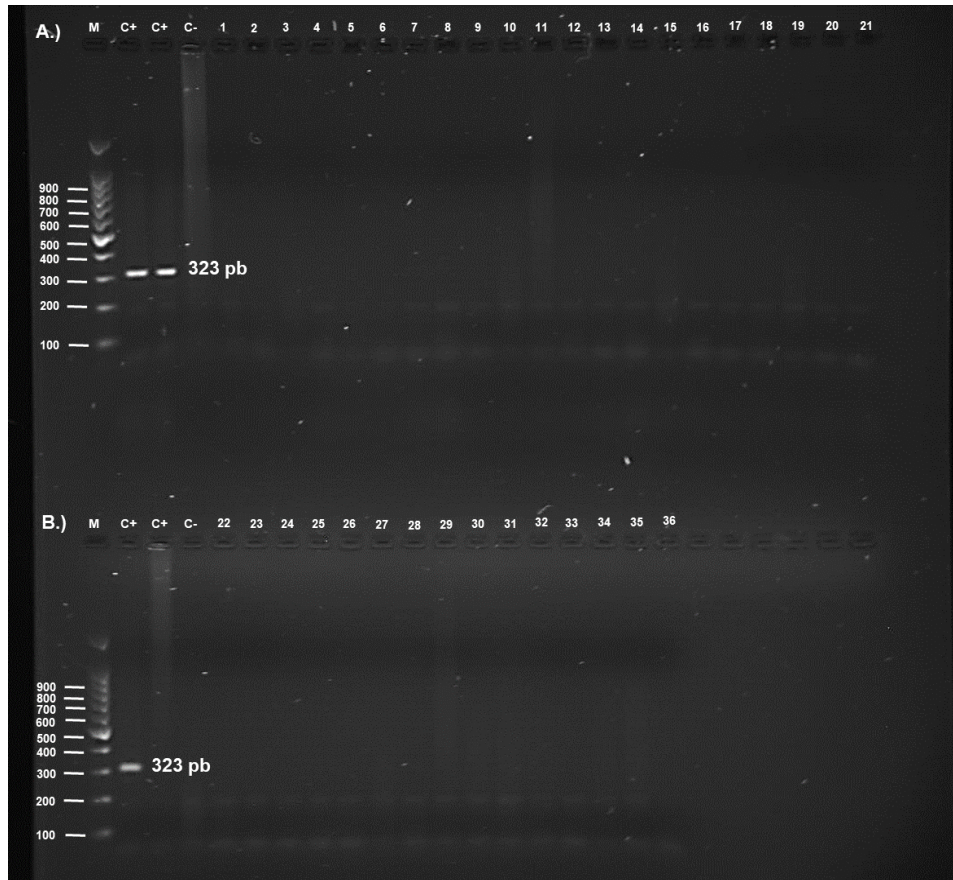


Figura 19. Detección de EV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a Ai 21. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+ y 2C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 22 a Ai 36. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 21, 22 a 36: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo los controles positivos a excepción del 2C+ de la segunda columna.

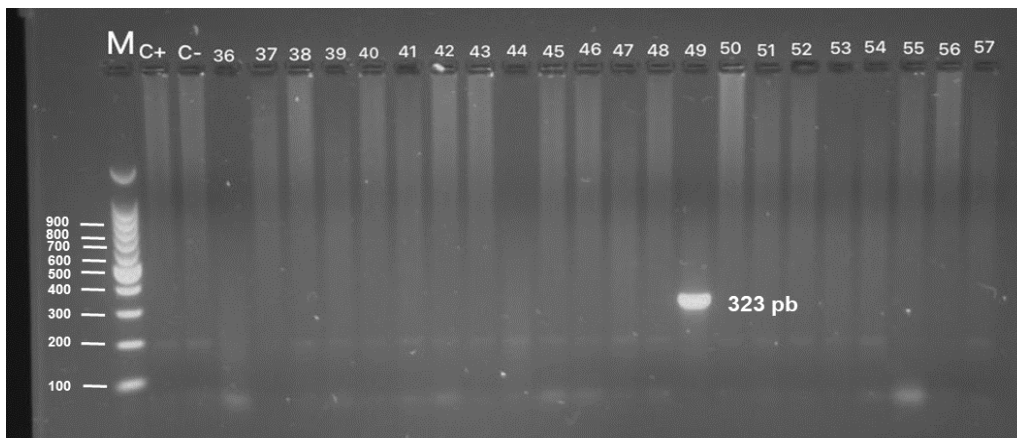


Figura 20. Detección de EV en muestras directas de aire y agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (Control positivo), C- (Control negativo), Ai 36, Ag 37 a Ag 57. Código de muestras: Ai: aire, Ag: agua. 36, 37 a 57: número de muestra. Solo amplificó una muestra la 49 correspondiente al mes de abril (Costa del este), al contrario del control positivo que no amplificó.

Se realizó la repetición en la detección de las muestras Ag 36 a Ag 57, debido a que en la electroforesis en gel de agarosa anterior no se observó la amplificación de los controles positivos. En este caso la muestra 49 (Costa del Este), del mes de abril en la matriz de agua no amplificó. En ambos casos hubo degradación del ARN.

La muestra 49 de abril (Costa del Este) correspondiente a cultivo celular del segundo pasaje (Figura 21), se le realizó una segunda detección ya que esta muestra había amplificado en muestras directas (Figura 20). Con la electroforesis se pudo observar que la muestra resultó negativa, por ende, pudo haber una degradación del ARN o la carga viral en la muestra era muy baja para ser detectado con el método de RT-PCR anidada en tiempo final y electroforesis.

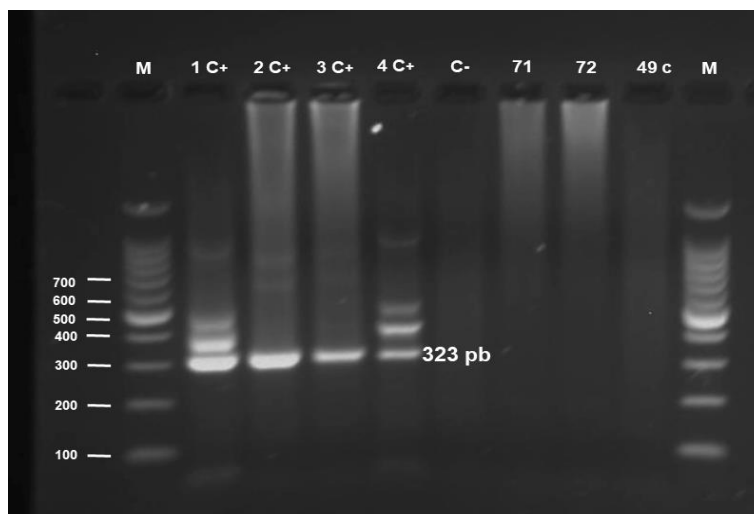


Figura 21. Prueba de controles positivos de EV, detección de muestras directas de agua y repetición de la detección de muestras de cultivo de agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L del producto de PCR y 2 μ L de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+, 2C+, 3C+ y 4C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ag 71 a Ag 72 y Ag 49c, M (marcador de peso molecular de

100pb). Código de muestras: Ag: agua, c: cultivo. 71 a 72 y 49: número de muestra. Ninguna muestra amplificó, solo los controles positivos.

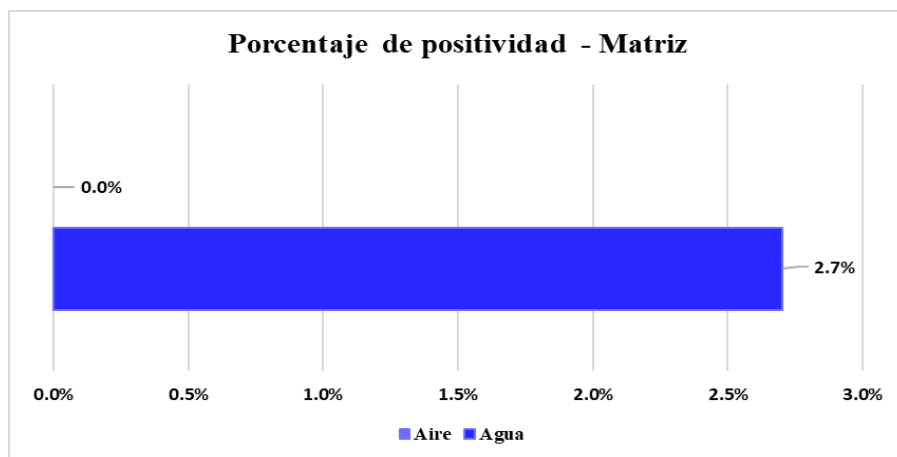


Figura 22. Porcentaje de positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras directas positivas por presencia de EV.

En este gráfico se observa que ninguna muestra de la matriz de aire amplificó para la presencia de EV 0/36 (0%) muestras, contrario a las matriz de agua en el cual amplificó 1/36 (2.7%) muestras. (Figura 22).

Detección molecular de RoV en matriz de aire y agua

El último grupo de virus evaluados en muestras directas extraídas en este estudio fue RoV, al cual se le realizó una RT-PCR anidada utilizando los cebadores de la Tabla 7. Para la electroforesis en el gel de agarosa, se colocaron en cada carril 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer, un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular de 100 pb.

Se realizó una prueba de controles positivos utilizando muestras de heces de niños con gastroenteritis provenientes del HDN. Se logró la amplificación de 8/11 controles positivos con el tamaño requerido de 381 pb (Ngaosuwankul *et al*, 2013) con el cebador RoV 2.1 R- (Figura 23).

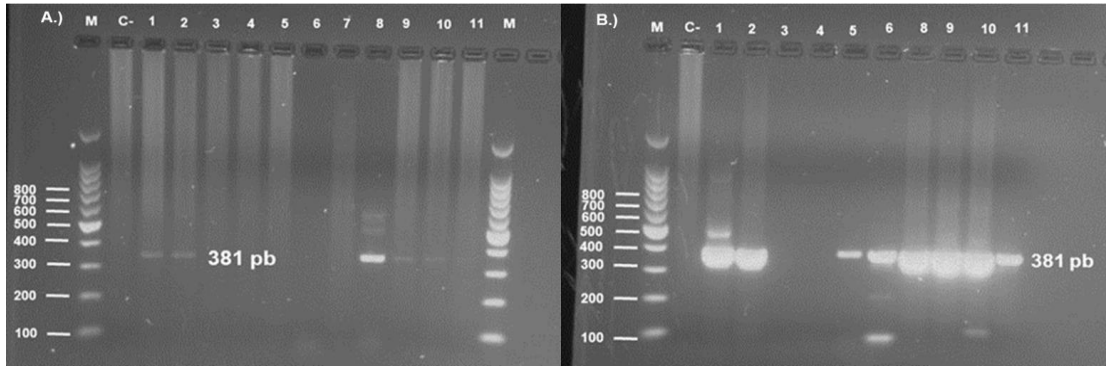


Figura 23. Prueba de controles positivos y cebadores de PCR anidada de RoV, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C- (Control negativo), 1 a 11 (Controles positivos) con el cebador RoV 2.2 R-. B). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular de 100 pb), C- (Control negativo), 1 a 11 (Controles positivos) con el cebador RoV 2.1R-. El cebador RoV 2.1 R- fue el que mejor amplificó a 8/11 controles positivos con el tamaño de banda esperado de 381 pb.

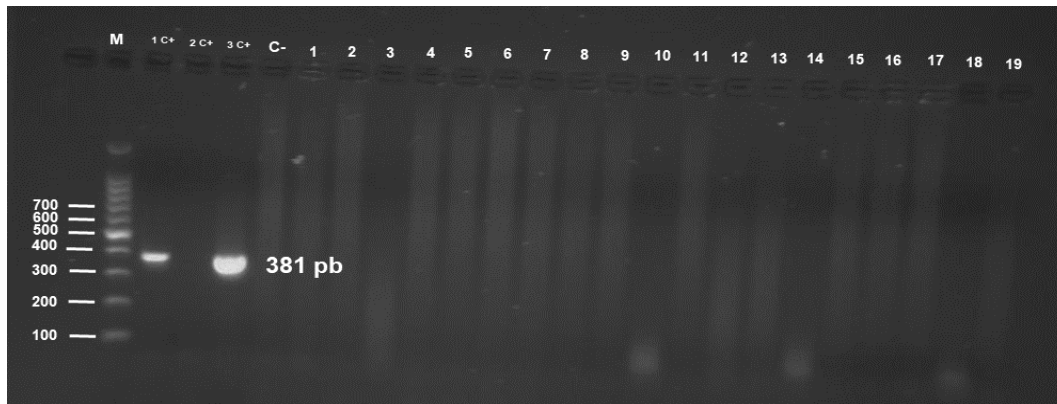


Figura 24. Detección de RoV en muestras directas de aire, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), 1C+, 2C+, 3C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 1 a Ai 19. Código de muestras: Ai: aire. 1 a 19 número de muestras. Solo amplificó 2/3 de los controles positivos y no hubo amplificación en ninguna de las muestras directas.

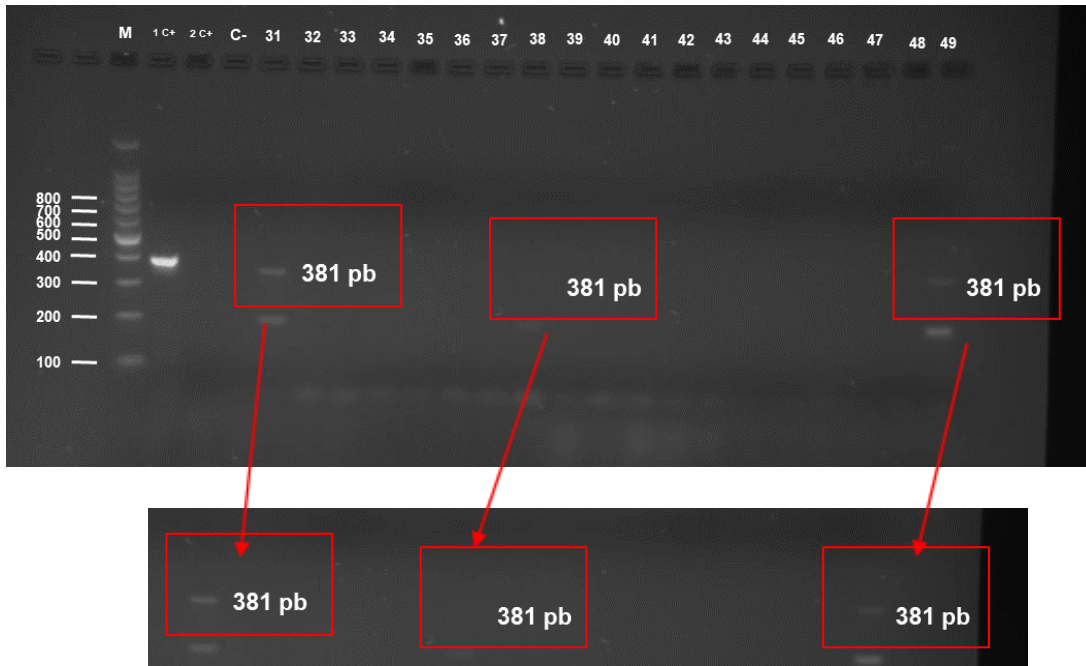


Figura 25. Detección de RoV en muestras directas de aire y agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular de 100 pb), C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 31 a Ai 36, Ag 37 a Ag 49. Código de muestras: Ai: aire, Ag: agua. 31 a 49: número de muestras. Amplifico 1/2 controles positivos y las muestra 31 (HST de mayo en matriz de aire), 38 (Panamá La Vieja de marzo en matriz de agua), y 49 (Costa del Este de abril en matriz de agua).

En el caso de RoV se obtuvieron 3 muestras positivas, una correspondiente a la matriz de aire, muestra 31 del mes de mayo (HST) y dos de la la matriz de agua, muestras 38 del mes de marzo (Panamá La Vieja), y muestra 49 del mes de abril (Costa del Este) (Figura 25), debido a que las bandas que se observaron fueron tenues se repitió la electroforesis (Figura 26).

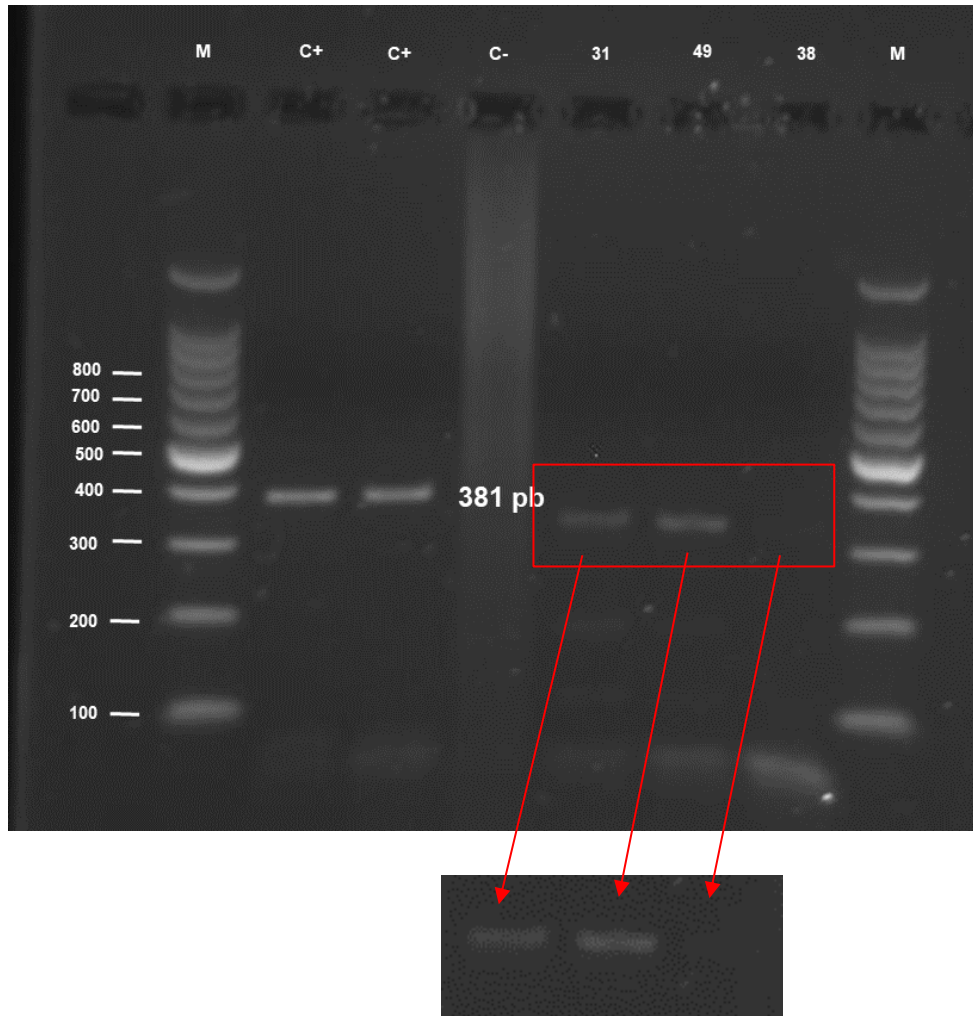


Figura 26. Detección de RoV en muestras directas de agua, visualizadas en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5X, 8 μ L de producto de la PCR y 2 μ L de loading buffer. A). Orden de muestras: M (marcador de peso molecular 100 pb), C+ (Controles positivos), C- (Control negativo), Ai 31, Ag 38 y Ag 49. Código de muestras: Ai: Aire, Ag: agua. 31, 38 y 49: número de muestras. Amplificaron las tres muestras.

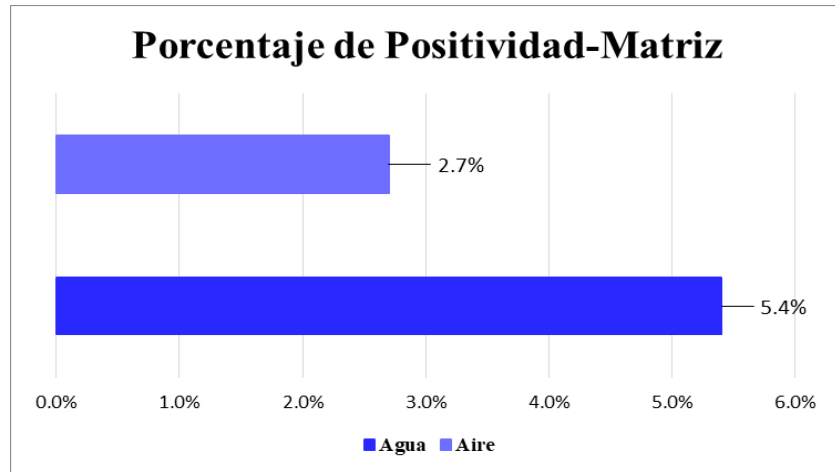


Figura 27. Porcentaje de positividad en matriz de agua y aire con respecto a la amplificación de muestras directas positivas por presencia de RoV.

Con respecto al porcentaje de positividad en muestras directas en la matriz de agua y aire, podemos indicar que sólo 1/36 (2.7%) muestras amplificó en la matriz de aire. En el caso de la matriz de agua amplificaron 2/36 (5.4%) de porcentaje de positividad (Figura 27).

Discusión

El agua y el aire son recursos naturales, únicos y escasos, esenciales para la vida e indispensables para el hombre. La calidad de estos tiene directa relación con la salud de las personas. Su mal o indiscriminado uso puede provocar la contaminación del recurso con el consecuente deterioro de la calidad de los demás recursos naturales (Soler *et al.*, 2009).

Los virus llegan al ambiente y en especial, a las fuentes de agua cuando las personas o animales infectados depositan las heces en los mismos, dado que el agua es uno de los principales vehículos de transmisión masiva de agentes infecciosos (Peláez, *et al.*, 2016). Por esta razón, los ambientes acuáticos como lagos, cañadas y costas marinas son susceptibles a la contaminación fecal, ya que estos desechos pueden entrar al ambiente mediante la combinación de derrame de aguas residuales (debido a la falta de saneamiento y cámaras sépticas), así como también, por derrame de las propias plantas de tratamiento de aguas residuales, domésticas e industriales (Gillman, 2016). Además, estos pueden encontrarse en el aire y ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles, a través de grandes distancias con el movimiento del aire, el cual representa la mejor vía de dispersión (De la Rosa *et al.*, 2002).

En el estudio de muestras ambientales, es necesaria la aplicación de metodologías de concentración, debido a que en muchos ambientes la cantidad de partículas virales es muy baja o se encuentran muy diluidas en el cuerpo de agua. Para aumentar la sensibilidad de la metodología y poder realizar una mejor detección viral en las muestras analizadas, se realizó una PCR anidada y una RT-PCR anidada (Galeano, 2022). La detección de virus entéricos en muestras de agua y aire es esencial para establecer las acciones adecuadas de control y prevención de las enfermedades asociadas.

El área metropolitana de la Ciudad de Panamá produce diariamente más de 140 millones de galones de aguas residuales contaminantes (casi el equivalente a la producción diaria de agua potable de la planta potabilizadora de Chilibre), (Panamá América, 2006), los cuales han provocado la situación actual de descargas de aguas residuales domésticas, urbanas e industriales sin tratamiento alguno (Pinto y Yee, 2011; ARAP, 2010), ya que son vertidas al sistema de recolección del alcantarillado sanitario, al sistema de drenaje pluvial o a las quebradas (Panama América, 2006), y ríos cercanos como: el Matasnillo, Matías Hernández

y Pacora, entre otros, los cuales son residuos que desembocan en la Bahía de Panamá, y traen como consecuencia, la contaminación del agua (Pinto y Yee, 2011; ARAP, 2010) y el aire en la bahía (González y González, 2015).

Actualmente se está intentando llevar a cabo el proyecto de recuperación de las playas de la Bahía de Panamá para fines recreacionales, específicamente en las zonas de Paitilla, San Francisco y el Mercado de Marisco, en paralelo al plan de saneamiento de la Bahía de Panamá mediante las operaciones de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) en Juan Díaz (Arcia, 2019; Capital-Financiero, 2019)

Por esta razón, este estudio tiene como objetivo la detección molecular de distintos virus entéricos de importancia en salud pública como Adenovirus, Enterovirus y Rotavirus en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en la estación seca de los meses de marzo, abril y mayo del 2021. Los 12 puntos de muestreo seleccionados específicamente a lo largo de la Bahía de Panamá con el propósito de determinar cómo se encuentran, cuál es su estado porque están fuertemente influenciados por una amplia gama de actividades: parques industriales, urbanizaciones, autopistas, pesca a menor escala, extracción de almejas y agricultura (Pinto y Yee, 2011).

Los virus entéricos humanos representan un excelente indicador de contaminación fecal en agua (Lambertini, *et al.*, 2008; Albinana-Giménez, 2009), ya que los estándares regulatorios como el recuento de coliformes termotolerantes o fecales para evaluar la calidad microbiológica del agua, muchas veces no coinciden con la presencia de patógenos como bacterias, parásitos y virus (Poma *et al.* 2012). Por lo cual, se está prestando cada vez más atención a la contaminación de las aguas por virus a escala global (Lin y Ganesh 2013; Lin y Singh, 2015).

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 la actividad del ECP con la línea celular Vero, que ha demostrado ser eficiente tanto para detectar la presencia de estos virus como para su propagación (Dilnessa y Zeleke, 2017; Ponce *et al.*, 2021). Los resultados observados en este estudio, muestran que las células Vero infectadas en el primer pasaje con las muestras de agua, presentaron una gran actividad de ECP durante las primeras 24 h en todas las muestras, en cambio con las muestras de aire el ECP fue más lento, siendo

estos datos similares a los reportados en la temporada lluviosa por Cortez y Martínez (2021), dónde reportaron que hubo ECP en todas las muestras de agua (100% de positividad) y en la mayoría de las muestras de aire (69.44% de positividad). También Lin y Singh. (2015), obtuvieron el 100 % de ECP en las muestras de agua del río Umgeni, en Durban, Sudáfrica utilizando varias líneas celulares (HEK 293, Vero, HeLa, PLC/PRF/5 y Hep G2). En cambio, al realizarse el segundo pasaje en ambas matrices el ECP fue mínimo, esto puede deberse a la degradación de los ácidos nucleicos virales (particularmente el ARN) el cual está correlacionada con la pérdida de infectividad (basada en la pérdida de ECP en cultivos celulares), incluso cuando el genoma viral es más persistente que los virus infecciosos (Tsai *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1997; Skraber *et al.*, 2004; Wetz *et al.*, 2004; Fong y Lipp, 2005). Además, algunos autores sugieren que se puede utilizar un período de incubación mucho más largo para demostrar que las muestras que resultaron negativas en ensayos estándar son realmente positivas. (Abbaszadegan *et al.*, 1999). Sin embargo, la línea celular Vero en otros estudios se considera una línea con una sensibilidad muy baja en comparación con otras (Reina *et al.*, 2000; She *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2021).

La técnica de cultivo celular es el “estándar de oro” para la virología, es costosa (Saavedra *et al.*, 2012; Peláez *et al.*, 2010), laboriosa y requiere mucho tiempo para confirmar los resultados tanto positivos como negativos. Además, algunas muestras pueden ser citotóxicas y aparecen como ECP en las células. No se ha establecido una línea celular universal que pueda usarse para cultivar todos los virus entéricos y hay muchos virus que no pueden detectarse mediante ensayos de cultivo celular porque no producen ECP, tienen un crecimiento extremadamente lento o no crecen en condiciones establecidas (Pommepuy y Le Guyader, 1998; Chapron *et al.*, 2000; Lipp *et al.*, 2001). Por ejemplo, los AdV, que son uno de los patógenos humanos más importantes y a menudo se detectan en mayor número que los enterovirus en las aguas residuales, crecen lentamente, a menudo no producen ECP y se subestiman constantemente cuando están presentes enterovirus de rápido crecimiento (Irving y Smith, 1981; Tani, *et al.*, 1995). Es por eso, que varios autores recomiendan realizar una confirmación por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y/o técnicas moleculares como la PCR (González, 2007; Corvalán *et al.*, 2018).

La detección de virus es más compleja que la de otros microorganismos, por las dificultades que entraña la concentración y detección, ya sea mediante cultivo o técnicas de biología molecular. Antes de la década de 1980, la técnica de cultivo celular era la forma más común de evaluar si había virus entéricos infecciosos en muestras ambientales. Esta técnica implicaba cultivar las muestras en células y observar si los virus infectaban esas células. Sin embargo, con el desarrollo de los métodos moleculares como la PCR a finales de la década de 1980, se cuenta con herramientas más avanzadas para detectar directamente la presencia de material genético viral. A pesar de estos avances, el cultivo celular sigue siendo el método preferido para aislar y confirmar la capacidad infecciosa de los virus en muestras ambientales (Fong y Lipp, 2005). En este estudio, se realizaron ambos procedimientos debido a que al combinar ambas metodologías, se obtiene una evaluación más completa. El cultivo celular brinda información sobre la capacidad infecciosa y la replicación viral, mientras que las pruebas moleculares ofrecen sensibilidad y especificidad para detectar y caracterizar el material genético viral directamente en muestras ambientales. Este enfoque dual mejora la capacidad de comprender la presencia, la infectividad y la diversidad genética de los virus ambientales (Galeano *et al.*, 2022)

En investigaciones más recientes realizadas por Ko *et al.* (2003), se plantea la posibilidad de obtener resultados falsos positivos al detectar ácidos nucleicos de virus inactivados que fueron inoculados en células cultivadas. Esto significa que, en algunas situaciones, podríamos obtener señales de presencia de virus incluso cuando no hay virus infecciosos en la muestra. Para abordar este problema, Ko *et al.* (2003), desarrollaron un nuevo método de prueba basado en ICC-RT-PCR que se centra en detectar ARNm viral en lugar de ADN, especialmente cuando se trata de AdV. El ARNm sólo se produce cuando los adenovirus están activos y se están replicando (Ko *et al.*, 2003).

Las muestras positivas obtenidas a través del cultivo celular y confirmadas la presencia de virus específicos en las matrices de agua y aire mediante la técnica de PCR (ICC-PCR e ICC-RT-PCR), fueron las técnicas utilizadas en este estudio para la detección de virus entéricos. Los resultados del cultivo celular revelaron la capacidad de los virus para infectar y replicarse en las células cultivadas, manifestándose a través de ECP característicos. Posteriormente, la aplicación de la PCR permitió la identificación específica del material genético viral,

confirmándose la presencia de 8 muestras positivas, 2 de AdV (Isla Flamenco en aire de abril y salida de río Matasnillo en agua de abril), siendo este virus el responsable de afecciones respiratorias más comunes en Panamá (Capital-Financiero, 2022), y 6 de EV en agua (Antigua Ari de marzo, Isla Flamenco de marzo, Club Unión de abril, Isla Flamenco de abril, Costa del Este de mayo y Mercado de Marisco de mayo). Todos los controles positivos que causaron ECP en células Vero fueron detectados por ICC-PCR e ICC-RT-PCR, directamente de las muestras. En comparación con los resultados del estudio realizado por Cortez y Martínez (2021), donde solo se obtuvo 1 muestra positiva en la PCR de cultivo celular, HST en aire de octubre. Estas al igual que las que salieron positivas en este estudio, corroboraron con los resultados obtenidos en cultivo celular. Estos resultados permiten una comprensión más precisa y detallada de la presencia, la identidad y la carga viral en las muestras analizadas. Es importante destacar que no todas las muestras que salieron positivas en muestras directas se pudieron detectar en cultivo celular. Esto se explica con varios estudios recientes que han demostrado que cuando los ácidos nucleicos virales, especialmente el ARN, se degrada, hay una fuerte correspondencia con la pérdida de capacidad infecciosa del virus, lo cual se evalúa por la pérdida de ECP en cultivos celulares (Fong y Lipp, 2005). Esto es cierto incluso cuando el material genético del virus permanece en el ambiente más tiempo que la capacidad del virus para infectar. Sin embargo, dado que el ARN se degrada rápidamente en comparación con el ADN, los virus que ya no son infecciosos debido al daño en su cubierta exterior también experimentan daño en su ARN en el mismo periodo de tiempo. Esto hace que estos virus sean indetectables tanto en cultivos celulares como en pruebas de PCR (Fong y Lipp, 2005).

En un estudio de Sudáfrica realizado por Lin y Singh (2015), se detectó la presencia de AdV y EV en aguas del río Umgeni de Durban, Sudáfrica por el método de ICC-PCR anidada e ICC-RT-PCR para determinar la presencia y la cantidad, siendo estos virus los más reportados con mayor frecuencia en aguas contaminadas con heces.

Los virus también pueden encontrarse en el aire y ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles (De la Rosa *et al.*, 2002), y estos pueden formarse a través de sucesos naturales, por ejemplo, el estornudo de una persona que alberga una infección por virus respiratorio o mediante medios mecánicos como aerosoles generados en las plantas de

tratamiento de aguas residuales (PTAR) (Bitton y Gerba, 1984; Yates, *et al.*, 1985; Sobsey, *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1987; Lee y Kim, 2002; Lipp *et al.*, 2002; Fong y Lipp, 2005; Verreault *et al.*, 2008; Pan, *et al.*, 2019), llegando a afectar a humanos, animales y plantas (Pan *et al.*, 2019). Debido a las deficiencias tecnológicas actuales, la determinación precisa de la presencia de virus en aire es un desafío. Esta deficiencia limita nuestra capacidad para evaluar la amenaza real que surge de la inhalación u otro contacto relevante con virus en aerosol (Pan *et al.*, 2019). Comúnmente, los impingers de base líquida son los muestreadores más utilizados para recolectar virus, ya que el medio de recolección líquido ayuda a mantener la viabilidad viral (Xu *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2019), estos son utilizados en conjunto con la PCR anidada ya que esta aumenta el rendimiento y la especificidad de la amplificación del ADN blanco, mediante el uso de dos juegos secuenciales de cebadores (Dongdem *et al.*, 2009; Symonds *et al.*, 2009).

En este estudio, no se observó la presencia de AdV y EV en muestras directas de aire, al contrario, con los datos reportados por González y González (2015), en los cuales detectaron la presencia de AdV en 8 puntos (Costa del Este, Boca la Caja, Coco del Mar, Mercado de Marisco, Las Bóvedas, Ave. de Los Poetas, Hospital Santo Tomas e Isla Flamenco). En cambio, para EV, Cortés y Martínez (2021), reportaron la presencia de EV en 9 puntos (Panamá Viejo, Club Unión, Hospital Santo Tomás, Mercado del Marisco, Las Bóvedas, Av. de Los Poetas, Isla Flamenco, Costa del este y río Matasnillo). Por lo cual, al ser ambos virus pequeños se pueden aerosolizar más fácilmente, debido a su tamaño y su posible unión a partículas de tamaño más fino, pero también, son muy sensibles a las condiciones adversas (UV y deshidratación), durante el transporte (Griffin, *et al.*, 2011), en cambio cuando se transmite a través de agua contaminada, suelen ser estables porque carecen de las envolturas lipídicas que hacen que otros virus sean más susceptibles a los cambios ambientales (Girones, *et al.*, 2010), teniendo en cuenta esto, se esperaría encontrar menor presencia de estos virus en la matriz de aire que en agua. Además, debido a la baja concentración de virus en el aire y la inactivación de virus infecciosos debido a los procesos de muestreo, se necesitan métodos para equilibrar la necesidad de un gran volumen de muestreo de aire y mantener la viabilidad de los virus durante su recolección (Pan *et al.*, 2019).

La mayoría de las revisiones publicadas sobre la detección de bioaerosoles mediante muestreo de aire se han centrado en alérgenos, bacterias y hongos (Huffman *et al.*, 2019; King *et al.*, 2020; Kabir *et al.*, 2020; Šantl-Temkiv *et al.*, 2020;), existen muy pocas revisiones sobre la medición de aerosoles virales. Además, las revisiones recientes sobre virus transmitidos por el aire han discutido principalmente las técnicas de muestreo de aire y sus limitaciones (Pan *et al.*, 2019). La mayoría de las revisiones sobre sensores virales se han centrado en virus transmitidos por líquidos en lugar de virus transmitidos por el aire (Guliy *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2020; Bhardwaj, *et al.*, 2021).

Con respecto a los puntos de muestreo positivos para AdV en muestras directas de agua, Panamá la Vieja (marzo), fue el único punto en el cual se detectó AdV, datos que contrastan con los obtenidos por Garibaldo y Samudio (2017), ya que reportaron la presencia de AdV en los puntos de Av. de Los Poetas, Boca La Caja y HST. Además, Pina *et al.* (2001), detectó la presencia de AdV en un 95% de las muestras de agua residual, un 87% de las muestras del río Llobregat, un 60% de las muestras del río Ter y un 77% de las muestras de agua de mar recogidas en puntos con elevados niveles de contaminación fecal. En un estudio realizado en Sudáfrica, Van Heerden *et al.* (2005), han detectado AdV en aproximadamente el 22% de las muestras de agua de río y aproximadamente el 6% de las muestras de agua tratada en áreas seleccionadas de Sudáfrica.

La RT-PCR es potencialmente una prueba mucho más sensible para detectar la presencia de virus, ya que es posible detectar tan solo una molécula de ARN. Sin embargo, la RT-PCR no puede distinguir virus infecciosos de virus no infecciosos, ni detectar la presencia de partículas virales intactas (es posible que se pueda detectar ARN o ADN "desnudos" en un ensayo) (Abbaszadegan *et al.*, 1999). Los resultados de este estudio en muestras directas mostraron la detección de EV en Costa del Este (abril), datos similares a los obtenidos por Cortes y Martínez (2021) en donde se reportó la presencia EV en Club Unión, río Matasnillo, HST, Mercado del Marisco, Av. de Los Poetas, Antigua ARI, Isla Flamenco, Costa del Este, y Panamá Viejo, considerándose a Costa del Este un punto recurrente. Un estudio realizado de muestras ambientales de tres lagos en Wuhan, provincia de Hubei, China, mostró hallazgos similares, siendo el enterovirus el virus más comúnmente detectado, seguido de norovirus genogrupo 1 (Allman *et al.*, 2013). Anteriormente, Fong *et al.* (2005), evaluaron

la presencia de EV, AdV y EV bovino (BEV) en muestras de agua obtenidas de Georgia, detectando EV en 48.42% de las muestras, mientras que sólo el 9.47% de las muestras dieron positivo para RoV. También, se obtuvieron resultados similares en Seúl, Corea, donde el 33.3% de las muestras del río Han, fueron positivas para EV (Chapron *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2016). Además, EV fue detectado en el 55% de las muestras de playas en España por Mocé-Llivina *et al.* (2005).

En los climas templados, el RoV se detecta con más frecuencia en invierno y rara vez en los meses de verano. En contraste, en las zonas tropicales se encuentra durante todo el año y las tendencias estacionales son menos definidas. Se ha intentado explicar esas observaciones vinculando la incidencia de la enfermedad con factores climáticos tales como las lluvias, la humedad y la temperatura, pero no se ha podido llegar a conclusiones claras (Cook *et al.*, 1990). En áreas donde las condiciones de saneamiento son deficientes, el riesgo de propagación del RoV es mayor, independientemente de la temporada. En este estudio, se realizó la detección de RoV en muestras directas de aire y agua durante la temporada seca, y se logró detectar 3 muestras positivas, 1 de aire del HST de mayo. Por ende, al ser RoV un virus grande y sin envoltura, lo hace menos resistente y más vulnerable al estrés ambiental (Bhardwaj *et al.*, 2021). Aunque RoV no es conocido por transmitirse a través del aire como algunos virus respiratorios, las partículas en el aire pueden contribuir indirectamente a la propagación si entran en contacto con superficies u objetos contaminados (Cook *et al.*, 1990). Las otras 2 muestras de agua que dieron positivas para RoV, corresponden a Panamá La Vieja (marzo) y Costa del Este (abril), si las aguas residuales o las fuentes de agua no tratadas están contaminadas con el virus, existe el riesgo de que el RoV llegue al suministro de agua potable y causen infecciones si no se trata adecuadamente. En Panamá, la tasa más alta de enfermedad por RoV la tienen los lactantes y la mayoría de los niños se infectan antes de los 5 años (Rodríguez, 2021). Los datos de este estudio difieren con los de García (2014), donde el RoV fue el más prevalente en el río Uruguay, con 48.5%. Además, los resultados de Borgues (2012), mostraron un 33% de positividad de RoV por RT-PCR, un 41.6% en aguas residuales tratadas, un 19% en aguas ambientales y un 8.3% en muestras de ostras. Prado *et al.* (2014), detectaron RoV en aguas ambientales con una frecuencia del 95% en muestras de río de Janeiro, Brasil entre el 2005 y 2008. Peláez *et al.* (2016), durante el período de 2010 a 2014 en Colombia, procesaron 288 muestras provenientes de agua tratadas y no tratadas de 102

municipios de 24 departamentos, de las cuales 50.7 % (146) fueron positivas para virus entéricos, siendo el 20.48% para RoV y EV.

En un estudio en Kenia, Kiulia *et al.* (2010), detectaron RoV del grupo A en el 100% de las muestras recolectadas de un río ubicado en un área urbana y en tres (25%) de las muestras de agua de un río rural. Sibanda y Okoh (2013), detectaron RoV en el 13.9 % de las muestras con concentraciones que oscilan entre 2.5×10^1 y 2.1×10^3 GC/L en el río Tyume en la provincia del Cabo Oriental de Sudáfrica. De manera similar, al estudio realizado por Lin y Singh (2015), detectaron RoV en el 25% de las muestras de agua del río Umgeni con concentraciones que oscilaban entre 5.81×10^1 y 4.15×10^2 GC/L. Pero no en todos los países se ha encontrado tal distribución (García, 2012).

Los resultados negativos de este estudio podrían deberse a los efectos de dilución en la zona de mezcla del área de descarga. Además, factores ambientales como la temperatura y la radiación UV, que pueden afectar la estabilidad de estos virus en el agua de mar al dañar el ácido nucleico y las proteínas virales. Además, la salinidad del agua, que es bastante alta en la región, puede provocar agregación viral y, por tanto, títulos virales más bajos (Wetz *et al.*, 2004). Además, el área de estudio se caracteriza por una alta contaminación de materia orgánica debido a la eliminación continua de desecho industriales, ya que González y González (2015) en su estudio, mencionaron que cerca de los puntos de muestreo se encuentran algunas industrias como Aceti-Oxígeno S.A. y Boston S.A., las cuales descargan sus desechos industriales de manera directa en la Bahía de Panamá, este tipo de contaminación industrial aunado a la contaminación orgánica (fecal) proveniente de los edificios familiares, las residencias, hospitales y centro comerciales, por lo que es muy probable que altas concentraciones de proteasas extracelulares, nucleasas y otras enzimas, puedan dañar la cápside del virus y provocar la degradación del genoma (Wetz *et al.*, 2004). Los resultados negativos, también podrían ser consecuencia de la presencia de altas concentraciones de sustancias inhibidoras de la PCR o RT en el agua de mar (Vecchia *et al.*, 2012). El agua de mar altamente contaminada con desechos municipales está llena de compuestos húmicos, cationes divalentes, sales y otras sustancias inhibidoras, que podrían afectar la eficiencia de la PCR y dar resultados falsos negativos. Kopečka *et al.* (1993),

sugirieron que los pasos de concentración del virus también conducen al enriquecimiento de impurezas.

En esta comparación, examinaremos las condiciones de saneamiento en Panamá y Brasil, centrándonos en el impacto de ciertos agentes virales en la salud pública. Según un estudio realizado por Prado y Miagostovich (2014), entre los agentes virales con mayor impacto en la salud pública, se destacan los virus de la hepatitis A, NoV, AdV, EV y RoV, responsables de la contaminación de varios ecosistemas acuáticos brasileños. El saneamiento básico juega un papel fundamental en el control de la propagación de estos virus en el ambiente, reduciendo los riesgos de transmisión. Al observar las condiciones en la Ciudad de Panamá, son evidentes las malas condiciones de saneamiento que impactan la Ciudad de Panamá, ya que no se cuenta con sistemas adecuados para la recolección y tratamiento de las aguas residuales, que son la principal fuente de contaminación de los cuerpos de agua de toda la ciudad que afectan no sólo a la Bahía de Panamá, sino a los nueve ríos que desembocan en la misma, lo que implica la existencia de áreas malsanas y negativas para el desarrollo urbano de sus habitantes. La carga de patógenos que circulan en los ríos y quebradas, procedentes de diferentes fuentes de aguas residuales que se vierten en la Bahía de Panamá y que se constituye en un importante factor de riesgo para la salud pública, generando enfermedades transmisibles. Con todo lo analizado, es evidente que Brasil y Panamá continúan enfrentando un desafío histórico en cuanto a la distribución y acceso a servicios básicos de saneamiento, especialmente en lo que respecta a la eliminación de aguas residuales.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Entre los puntos con más prevalencia de muestras positivas por virus entéricos tenemos a Isla Flamenco, Costa del Este y Panamá La Vieja, siendo estos puntos zonas de recreación donde suelen concurrir más los turistas.
- Se observó que el mes con más prevalencia viral fue abril, seguido de marzo y de último mayo.
- Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de la ICC-PCR anidada y ICC-RT-PCR anidada en la identificación precisa y rápida de virus específicos, lo cual tiene implicaciones significativas para la salud pública y la medicina.
- En el primer pasaje en la matriz de agua en cultivo celular, se logró observar una gran actividad de ECP durante las primeras 24 h en todas las muestras, en cambio con las muestras de aire el ECP fue más lento y en el segundo pasaje se observó un valor mínimo de ECP.
- Se detectó por primera vez RoV en muestras directas de aire.
- Se confirman la consecución de los objetivos planteados al inicio de este estudio.
- Esta tesis ha contribuido significativamente al campo de la detección de virus, proporcionando conocimientos valiosos y perspectivas que pueden tener un impacto duradero en la salud pública del país.

Recomendaciones

- Se deben realizar estudios que exploren la diversidad genética de los virus entéricos presentes en muestras ambientales, lo que podrá contribuir a comprender mejor su epidemiología.
- Se deben realizar investigaciones a largo plazo en el tiempo, para comprender mejor las variaciones estacionales y la prevalencia de virus entéricos en el ambiente.
- Utilizar otras líneas celulares que sean más específicas para cada virus entérico para el aislamiento y las técnicas de ICC-PCR e ICC-RT-PCR. .
- Proponer la implementación de programas de monitoreo continuo de virus entéricos en entornos específicos, especialmente aquellos que están en contacto directo con fuentes de agua potencialmente contaminadas.
- Monitorear a largo plazo el saneamiento de la Bahía de Panamá.
- Comprender cómo optimizar los recursos y reducir los costos asociados con la detección y estudio de virus entéricos, lo que podría incluir también la eficiencia en los métodos de muestreo y análisis.
- Añadir inhibidor de ARNasa a las muestras para minimizar la degradación del ARN.
- Validación de métodos mejorados de purificación y concentración de virus en muestras ambientales, lo que podría aumentar la sensibilidad de detección.
- Comparar diferentes métodos de análisis de virus entéricos en muestras ambientales para evaluar su eficacia y fiabilidad.
- Asegurarse que todos los equipos y contenedores utilizados estén limpios y desinfectados antes de trabajar con las muestras, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.
- No obstante, es importante destacar que esta investigación tiene limitaciones, como la contaminación y degradación del ARN en las muestras. Estas limitaciones sugieren

áreas para futuras investigaciones, como la detección de otros virus entéricos no antes detectados en la Bahía de Panamá. A medida que avanzamos, es crucial seguir explorando. Utilizar nuevas tecnologías como la PCR y RT-PCR en tiempo real, para mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos existentes, y adaptarse a la evolución constante de los virus.

- Secuenciar los virus detectados para ver los genotipos circulantes en el ambiente y asociarlos con posibles patologías

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Abbaszadegan, M., Stewart P., y Lechevallier, M. (1999). A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):444-449.
- Ahmad, T., Arshad, N., Adnan, F., Sadaf Zaidi, N. U., Shahid, M. T., Zahoor, U., Afzal, M. S., y Anjum, S. (2016). Prevalence of rotavirus, adenovirus, hepatitis A virus and enterovirus in water samples collected from different region of Peshawar, Pakistan. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 23(4), 576–580. <https://doi.org/10.5604/12321966.1226849>
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., y Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 14(8), 725–730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
- Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M. P., Calgua, B., Huguet, J. M., Matia, L. y Girones, R. (2009). Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 43 (7), 2011–2019.
- Alcalá, A., Vizzi, E., Rodríguez-Díaz, J., Zambrano, J. L., Betancourt, W., y Liprandi, F. (2010). Molecular detection and characterization of Aichi viruses in sewage-polluted waters of Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 76:4113-4115.
- Allmann, E., Pan, L., Li, L., Li, D., Wang, S. y Lu, Y. (2013). Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. *J Virol Methods.* 193(2): 327–31.
- Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP). (2010). Documento de referencia para la elaboración de estudios de impacto ambiental (EsIA) en zonas marino costeras y aguas continentales, Panamá: Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá para el Manejo Costero Integrado.
- Arcia, O. (2019). Aguas de la bahía mejora, Aún hay riesgo para la salud. *La Prensa*, 12 de agosto.
- Asociación Española de Vacunología. (2023). Rotavirus. Página web; <https://vacunas.org/rotavirus-2/>

- Asociación Mexicana de Vacunología A.C. (2022). Rotavirus: enfermedad. Página web: <https://vacunacion.org/rotavirus-enfermedad.html>
- Avellón, A. y otros. (2001). Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 92 (2001) 113–120, Issue 92. p. 113–120.
- Ávila, L. (2003). Rotavirus y adenovirus en niños menores de 5 años como agente etiológico de enfermedad diarreica aguda en el barrio Pasallal Cantón Calvas. (Tesis de Licenciatura).
- Bányai, K., Estes, M. K., Martella, V., y Parashar, U. D. (2018). Viral gastroenteritis. *Lancet* (London, England), 392(10142), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0)
- Bejarano, R. (2019). Diarrea aguda, principal causa de desnutrición y muerte. La Estrella de Panamá: <https://www.laestrella.com.pa/cafe-estrella/salud/190417/aguda-causa-diarrea-principal-desnutricion>
- Benjamín, A. T. (2006). Llega a Panamá vacuna contra el rotavirus. La prensa. Retrieved, Agosto 8, 2021. https://www.prensa.com/politica/Llega-Panama-vacuna-rotavirus_0_1694080593.htm
- Bercedo, A., y Cortés, O. (2011). Faringoamigdalitis aguda, ¿tratamos con antibióticos o no?. Página web: <https://www.familiaysalud.es/sintomas-y-enfermedades/infecciones/de-la-la-g/faringoamigdalitis-aguda-tratamos-con-antibioticos-o>
- Berg, O., Børsheim, K. Y., Bratbak, G., y Hending, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. 340:467-468.
- Bernaola, G. y Luque, W. (2002). Fisiopatología de las Infecciones por Adenovirus.
- Betancourt, W. Q., Querales, L., Sulbaran, Y. F., Rodríguez- Díaz, J., Caraballo, L., y Pujol, F. H. (2010). Molecular characterization of sewage-borne pathogens and detection of sewage markers in an urban stream in Caracas, Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 73:2023-2026.

- Bhardwaj, J., Hong, S., Jang, J., Han, C. H., Lee, J., y Jang, J. (2021). Recent advancements in the measurement of pathogenic airborne viruses. *Journal of hazardous materials*, 420, 126574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126574>
- Bhumbra, N., y Wroblewski, M. E. (2010). Adenovirus. *Pediatrics in review*, 31(4):173–174. <https://doi.org/10.1542/pir.31-4-173>.
- Bitton, G. y Gerba, C. P. (1984). Groundwater pollution. *Microbiology: the emerging issue* p. 65-88. In G. Bitton and C. P. Gerba (ed.), *Groundwater pollution microbiology*. John Wiley y Sons, Inc., New York.
- Blacklow, N. R., y Greenberg, H. B. (1991). Viral gastroenteritis. *The New England journal of medicine*, 325(4), 252–264. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107253250406>
- Borges, C. R. (2012). Aplicação de métodos moleculares e de cultivo celular no monitoramento de vírus entéricos no ambiente aquático. (Tesis de Doctorado)
- Bosch, A., Pintó, R. M., y Guix, S. (2014). Human astroviruses. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 1048–1074. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>
- Bosch, I. C. (2010). Diagnóstico de las infecciones por adenovirus. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 6:120–135. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viromicromol/adenovirus.pdf>
- Bracho, M., Morón, V., Luzardo, M., y Montiel, M. (2008). Detección del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41 y bacteriófagos en agua para consumo humano. 271–278.
- Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K. y Black, R. E. (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 365(9465):1147-1152.
- Calvo, C., y Del Castillo, F. (1992). Síndrome mononucleósido por adenovirus con características analíticas típicamente bacterianas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 10:24–6.

- Capital-Financiero. (2019). Proyecto de recuperación de las playas de la Bahía irá de la mano del saneamiento. El Capital Financiero, 7 Agosto, p. 1.
- Capital-Financiero. (2022). Panamá en Alerta verde por casos de virus respiratorios en Costa Rica. Pagina web: <https://elcapitalfinanciero.com/panama-en-alerta-verde-por-casos-de-virus-respiratorios-en-costa-rica/>
- Carrera, J. P., Rogers, M., Fitch, A., DePasse, J., Díaz, Y., Beltran, D., Weaver, S., Vasilakis, N., Sosa, N., Tesh, R. y Ghedin, E. (2012). Caracterización De Un Nuevo Enterovirus Humano. Disponible en: <http://www.gorgas.gob.pa/wp-content/uploads/2014/04/Caracterizaci%C3%B3n-de-un-Nuevo-Enterovirus-Humano-en-Panam%C3%A1-Jean-Paul-Carrera.pdf>
- Casas, I., Tenorio, A. y Echevarria, J. (1997). Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. Journal of Virological Methods, Issue 66, 39-50.
- Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC). (2022). Página web: <https://www.cdc.gov/conjunctivitis/clinical-sp.html#:~:text=Fiebre%20faringoconjuntival%2C%20que%20es%20un,serotipos%203%2C%204%20y%207.>
- Cerrud, D. (2015). Reportan 54 casos de meningitis. La estrella Panamá: <https://www.laestrella.com.pa/nacional/150617/54-casos-reportan-meningitis>
- Certests Biotec IVD Diagnostic. (2019). Rotavirus + Adenovirus + Norovirus. Página web: <https://www.certest.es/es/products/crypto-giardia-entamoeba-2/#:%7E:text=Rotavirus%2C%20Adenovirus%20y%20Astrovirus%20son,son%20diarrea%20acuosa%20y%20v%C3%B3mitos>
- Chadwick, P. K., Walker, M., y Rees, A. E. (1994). «Airborne transmission of a small round structured virus». Lancet. 343-171.
- Chandran, A., Fitzwater, S., Zhen, A., y Santosham, M. (2010). Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. Biologics 4:213-229.

- Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N., y Margolin, A. B. (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2520–2525. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2520-2525.2000>
- Chauhan, T. (2020). What are the different components used in the PCR reaction buffer?. *Genetic Education*. <https://geneticeducation.co.in/what-are-the-different-components-used-in-the-pcr-reaction-buffer/#MgCl2>
- Cook, S. M., Glass, R. I., LeBaron, C. W., y Mei-Shang, Ho. (1990). Variabilidad estacional mundial de las infecciones por rotavirus. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/16712>
- Cortes, L. y Martínez, E. (2021). Detección molecular de virus entéricos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá en estación lluviosa del 2019. (Tesis de Licenciatura).
- Corvalán, P. y otros. (2018). Inmunofluorescencia indirecta versus reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico de virus respiratorios en niños ingresados en un hospital de la Región Metropolitana. *Rev Chilena Infectol*, 36(1), pp. :26-31.
- De la Rosa, M. C., Mosso, M. A., y Ullán, C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*. 5:375-402.
- Departamento de Salud de Nueva Jersey (NJDH). (2014). Pagina web: https://www.nj.gov/health/cd/documents/faq/ev_faq_sp.pdf
- Departamento de Salud Pública del Condado de Hennepin. (2015). Disponible en: <https://www.hennepin.us/-/media/hennepinus/residents/health-medical/infectious-diseases-fact-sheets/enterovirus-provider.pdf>
- Dilnessa, T. y Zeleke, H. (2017). Cell Culture, Cytopathic Effect, and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*, 2(1):102.

- Domínguez, A., Godoy, P., Torner, N., Cardeñosa, N. y Martínez, A. (2009). Las gastroenteritis víricas: Un problema de salud pública. *Rev Esp Salud Pública* 2009; 83: 679-687.
- Dongdem, J. T., Soyiri, I. y Ocloo, A. (2009). Public health significance of viral contamination of drinking water. *Afr. J. Microbiol.* 3, 856–861.
- Dubois, E., LeGuyader, F., Haugarreau, L., Kopecka, H., Cormier, M. y Pommepuy, M. (1997). Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1794–1800.
- Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., Hanssen, H. H., y Estes, M. K. (1983). Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology.* 127(2):320–332.
- Espinosa-García, A., Arias-Ortíz, C., y Mazari-Hiriart, M. (2004). Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica.* 14(2):166-178. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972004000200011&lng=es&tlng=es.
- Espinoza, T. (2022). Aumento de meningitis bacteriana en niños preocupa a los pediatras. Página web: https://www.tvn-2.com/nacionales/Aumento-meningitis-bacteriana-preocupa-pediatras-video_0_6113388614.html
- Estes, M. K., y Morris, A. P. (1999). A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Avances en Medicina Experimental y Biología.* 473:73–82.
- Ferguson, A. (2022). Investigadores intentan descifrar los misteriosos casos de hepatitis en niños, mientras aumentan los casos en el mundo. CNN. <https://cnn.espanol.cnn.com/2022/05/20/hepatitis-infantil-incrementan-casos-trax/amp/>
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racanello, V. R., y Skalka, A. M. (2000). *Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control.* ASM Press American Society for Microbiology.

- Flomenberg, P. y Kojaoghlanian, (2021). T. Pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of adenovirus infection. Página web: <https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-epidemiology-and-clinical-manifestationsof-adenovirus-infection>
- Fong, T. T., Griffin, D. W. y Lipp, E. K. (2005). Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 2070–8.
- Fong, T., y Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. 69(2):357–371. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>
- Fumian, T. M., Leite, J. P. G., Castello, A. A., Gaggeroc, A., Cailloud, M. L. S., y Miagostovich, M. P. (2010). Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J. Virol. Meth.* 170:42-46.
- Galeano, M., Franco, L., Gabaglio, S., Zarza, N., Muñoz, M., Ramírez, D., y Martínez, M. (2022). Eventos de precipitación extrema aumentan la circulación de patógenos infecciosos: detección de rotavirus, norovirus, astrovirus, adenovirus entérico y micobacterias no tuberculosas en agua de las inundaciones en Asunción, Paraguay, año 2014. Epub August 00, 2022. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.02.29>
- Ganesh, A., y Lin, J. (2013). Waterborne Human Pathogenic Viruses of Public Health Concern International Journal of Environmental Health Research Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.769205>
- García, M. (2012). Identificación e Investigación de virus gastroentéricos en la cuenca del Rio Uruguay. (Tesis de Licenciatura)
- Garibaldo, A., y Samudio, S. (2017). Detección Molecular de Adenovirus en Muestras de Agua Provenientes de La Bahía de Panamá. Universidad De Panamá.

- Gillman, L. L. (2016). “Virus entéricos en aguas de uso recreacional en un contexto de escasa cobertura de saneamiento en Barros.
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. de A., Hundesa, A., Carratala, A., y Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water research*, 44(15), 4325–4339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>
- Glass, R. I., Parashar, U. D., y Estes, M. K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *The New England journal of medicine*, 361(18), 1776–1785. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804575>
- Gómez, C., Zapata, J., y García, A. (2019). Meningitis por enterovirus: un reporte de casos en la región del Oriente de Antioquia, Colombia. *Pediatría*, 52(2):52–55. <https://doi.org/10.14295/p.v52i2.125>
- Gonzales, G. (2007). Estudio clínico-epidemiológico de enterovirus nopolio y optimización del cultivo celular. *Fundación Dialnet*, falta vol:89-140.
- González, M. y González, E. (2015). Detección molecular de Rotavirus y Adenovirus en muestras de aire provenientes de la Bahía de Panamá, Panamá: s.n. (Tesis de Licenciatura).
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(2), 10.1101/pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- Greenberg, H. B., y Matsui, S. M. (1992). Astroviruses and caliciviruses: emerging enteric pathogens. *Infectious agents and disease*, 1(2), 71–91.
- Griffin, D. y otros. (2011). Observations on the use of membrane filtration and liquid impingement to collect airbe microorganisms in various atmospheric environments. *Aerobiologia*, 27:25-35.
- Guliy, O. I., Zaitsev, B. D., Larionova, O. S. y Borodina, I. A. (2019). Virus detection methods and biosensor technologies. *Biophys*. doi: 10.1134/S0006350919060095.

- Haas, C. N., Rose, J. B., y Gerba, C. (1999). Microbial agents and their transmission. En Haas CN, Rose JB, Gerba C (Eds.) *Quantitative Microbial Risk Assessment*. Wiley. Nueva York, EE. UU. pp. 18-85.
- Hernández, E. (2014). Tipificación de enterovirus no-polio comunitarios causantes de neurovirosis en niños uruguayos. (Tesis de Licenciatura)
- Herrero-Uribe, L., Ávila-Arias, R., Corrales-Aguilar, E. y Hun-Opfer, L. (2004). *Procedimientos en virología médica*. Primera ed. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Hilleman, M. R., y Werner J. H. (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc Exp Biol Med*. 85:183-188.
- Hogg, J. (2000). Latent Adenoviral Infection in the Pathogenesis of Emphysema. *Chest*. 117:282S-285S.
- Huang, Y. C., Huang, S. L., Chen, S. P., Huang, Y. L., Huang, C. G., Tsao, K. C., y Lin, T. Y. (2013). Adenovirus infection is associated with central nervous system dysfunction in children. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 57(4):300–304. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.03.017>
- Huffman J. A. y otros. (2019). Real-time sensing of bioaerosols: review and current perspectives. *Aerosol Sci. Technol.* 1–31. Doi: 10.1080/02786826.2019.1664724
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2021). Página web: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Iraní, D. N. (2008). Meningitis aséptica y mielitis viral. *Clínicas neurológicas*, 26(3):635–viii. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2008.03.003>
- Irving, L. G. y Smith, F. A. (1981). One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:51–59.

- Janahi, E. M., Mustafa, S., Parkar, S. F. D., Naser, H. A., y Eisa, Z. M. (2020). Detection of Enteric Viruses and Bacterial Indicators in a Sewage Treatment Center and Shallow Water Bay, *International journal of environmental research and public health*, 17(18), 6483. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186483>
- Jayaram, H., Estes, M. K., y Prasad, V. V. (2004). “Emerging themes in rotavirus cell entry, genoma organization, transcription and replication,” *Virus Res.* 101(1):67-81.
- Ji, T., Liu, Z., Wang, G., Guo, X., Akbar Khan, S., Lai, C., Chen, H., Huang, S., Xia, S., Chen, B., Jia, H., Chen, Y., y Zhou, Q. (2020). Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosensors y bioelectronics*, 166, 112455. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112455>
- Kabir E., Azzouz A., Raza N., Bhardwaj S.K., Kim K. H., Tabatabaei, M., Kukkar, D. (2020). Recent advances in monitoring, sampling, and sensing techniques for bioaerosols in the atmosphere. *ACS Sens.* 5:1254–1267. Doi: 10.1021/acssensors.9b02585.
- Keicho, N. (1997). Adenovirus E1A gene dysregulates ICAM-1 expression in transformed pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 16:23-30.
- King, M. D., Lacey, R. E., Pak H., Fearing A., Ramos G., Baig T., Smith B. y Koustova A. (2020). Assays and enumeration of bioaerosols-traditional approaches to modern practices. *Aerosol Sci. Technol.* 54:611–633. Doi: 10.1080/02786826.2020.1723789.
- Kiulia, N. M., Netshikweta, R., Page, N. A., Van Zyl, W. B., Kiraithe, M. M., Nyachio, A., Mwenda, J. M., y Taylor, M. B. (2010). The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *Journal of applied microbiology*, 109(3), 818–828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04710.x>
- Ko, G., T. L., Cromeans, y Sobsey, M. D. (2003). Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7377–7384.

- Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J., y López-Pila, J. M. (1993). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 1213–1219. <https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1213-1219.1993>
- Kroneman, A., Vennema, H., Harris, J., Reuter, G., von Bonsdorff, C. H., Hedlund, K. O., Vainio, K., Jackson, V., Pothier, P., Koch, J., Schreier, E., Böttiger, B. E., Koopmans, M. (2006). Food-borne viruses in Europe network. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 11(12).
- La bahía de Panamá es un gran vertedero urbano. (2006). Panamá América. <https://www.panamaamerica.com.pa/mundo/la-bahia-de-panama-es-un-gran-vertedero-urbano-237572>
- Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. J., Kieke, B. A., y Borchardt, M. A. (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 2990–2996. <https://doi.org/10.1128/AEM.02246-07>
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., y Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS one*, 8(9), e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>
- Launes, C., y Muñoz-Almagro, C. (2017). Viejas y nuevas enfermedades virales en la UCI pediátrica: Enterovirus. *Revista española de pediatría.* 73:88.
- Lee, H. K., y Yeong, Y. S. (2004). Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl. Env. Microbiol.* 70:3632-3636.
- Lee, S. H. y Kim, S. J. (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res.* 36:248–256.

- Lee, S. H., Lee, C., Lee, K., Cho, H. y Kim, S. J. (2005). The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture–multiplex-nested PCR procedure. *J Appl Microbiol.* 98(5): 1020–9.
- Lin, J. y Ganesh, A. (2013) Water quality indicators: Bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int. J. Environ. Health Res.* 23 (6), 484–506.
- Lin, J. y Singh, A. (2015). Detection of human enteric viruses in Umgeni River, Durban, South Africa. *J Water Health.* 13 (4): 1098–1112. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2015.238>
- Lipp, E. K., Jarrell, J. L., Griffin, W., Lukasik, J., Jacukiewicz, J. y Rose, J. B. (2002). Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA. *Mar. Poll. Bull.* 44:666–67
- Lipp, E. K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, C. R. y Rose, J. B. (2001). The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries* 24:266-276
- Logan, C., O 'Leary, J. J., y O 'Sullivan, N. (2006). Transcripción inversa en tiempo real-PCR para la detección de rotavirus y adenovirus como agentes causantes de gastroenteritis viral aguda en niños. *Revista de microbiología clínica*, 44(9):3189–3195. <https://doi.org/10.1128/JCM.00915-06>
- López, M. (2017). El adenovirus en urgencias pediátricas. Detección y análisis de las coinfecciones. (Tesis Doctoral)
- Lucena F., Divizia M., Biziagos E., Crance J.M., y Deloince R. (1991). Extraction et concentration des virus des milieux hydriques. In: *Virologie des milieux hydriques*. Ed.: Tec y Doc Lavoisier, Paris.
- Lucio, C. G. (2022). Adenovirus F41, el principal sospechoso de los casos de hepatitis infantil. ELMUNDO. Página web: <https://amp.elmundo.es/ciencia-y-salud/salud/2022/04/26/62666b64fc6c832b3d8b4580.html>

- Lynch, J. P., Fishbein, M., y Echavarría, M. (2011). *Semin Respir Crit Care Med.* 32(4):494-511. doi: 10.1055/s-0031-1283287.
- Lynch, J. P., y Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 37:586–602.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clark, D. (2009). *Biology of Microorganisms.* Brock. 12th Edition. Pearson Education, S.A.
- Mandal, A. (2015). Qué es una infección por adenovirus. Página web: <http://www.news-medical.net/health/Adenovirus-Infection-Epidemiology.aspx>
- Martínez, R. (2016). Enterovirus: ¿qué infecciones provoca?. Hospital HM Nens. Página web: <https://hospitaldenens.com/es/guia-de-salud-y-enfermedades/las-infecciones-per-enterovirus/>
- Matsui, S. M., y Greenberg, H. B. (1996). Astroviruses. En: Knipe DM, Howley PM (editors). *Fields virology.* Lippincott-Raven, Philadelphia, 811-824.
- Mcintosh, K. (1996). *Diagnostic Virology.* 1 ed. Philadelphia: Fields Virology, Lippincott-Raven Publishers.
- Mejía-López, H., y López-Martínez, I. (2007). Adenovirus aislados de pacientes mexicanos con infección respiratoria aguda. *Rev. Biomed.*18(3):146-152.
- Melón, S., Méndez, S., Iglesias, B., Boga, J. A., Rodríguez, M., Fanjul, J. L., y otros. (2005). Involvement of adenovirus in clinical mononucleosis-like syndromes in young children. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 24(5):314-8. doi: 10.1007/s10096-005-1333-7.
- Mena, K. D. (2007). Waterborne viruses: assessing the risks. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water.* Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp.163-175.
- Merck. (2016). *Viral RNA Purification Protocol Using GenElute™ Spin Prep Kits,* Germany: Sigma-Aldrich.

- Mirazimi, A., Nilsson, M., y Svensson, L. (1998). The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J Virol.* 72(11):8705–8709. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8705-8709.1998>
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., y Jofre, J. (2005). Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6838–6844. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6838-6844.2005>
- Montalvo, C., y Flores, M. (2016). Electroforesis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus*, 26:48–54. <https://epistemus.unison.mx/index.php/epistemus/article/download/96/70/149>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2009). *Medical Microbiology*. 6th ed. St. Louis: Mosby.
- Negrón, M., y González, I. (2018). Virus: Generalidades. *Microbiología Estomatológica Parte I*. 69–80.
- Newton, K., Meyer, J. C., Bellamy, A. R., y Taylor, J. A. (1997). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *J Virol.* 71(12):9458–9465. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9458-9465.1997>
- Ngaosuwanikul, N., Thippornchai, N. y Yamashita, A. (2013). Detection and Characterization of Enteric Viruses in Flood Water from the 2011 Thai Flood. *Jpn. J. Infect. Dis.*, Issue 66, 398-403.
- Nieto Guevara J., López, O., y González, G. (2008). Impacto de la introducción de la vacuna contra el rotavirus en la hospitalización por gastroenteritis aguda grave en el Hospital del Niño de la Ciudad de Panamá. *Rev Panam Salud Publica.* 24(3):189–94.
- Nikonov, O. S., Chernykh, E. S., Garber, M. B., y Nikonova, E. Y. (2017). Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs. 82(13).

- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., y Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 32–53. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Agua para consumo humano. Página web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- Organización de las Naciones Unidas-Agua (ONU-Agua). (2021). Resumen actualizado de 2021 sobre los progresos en el ODS 6: agua y saneamiento para todos. Página web: https://www.unwater.org/sites/default/files/app/uploads/2021/12/SDG-6-Summary-Progress-Update-2021_Version-July-2021_SP.pdf .
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Hepatitis aguda grave de causa desconocida en niños.
- Ortiz, J. (2012). Epidemiología molecular de virus entéricos asociados con gastroenteritis en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras. (Tesis de maestría).
- Pallansch, M. y Roos, R. (2007). Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., *et al.*, *Fields Virology*. ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. (4): 839-894.
- Pan, M., Lednicky, J. A., y Wu, C. Y. (2019). Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *Journal of applied microbiology*, 127(6), [1596–1611](https://doi.org/10.1111/jam.14278). <https://doi.org/10.1111/jam.14278>
- Panamá América. (2006). La bahía de Panamá es un gran vertedero urbano. Página web: <https://www.panamaamerica.com.pa/mundo/la-bahia-de-panama-es-un-gran-vertedero-urbano-237572>
- Panamá América. (2022). Panamá, con altas posibilidades de registrar su segundo caso de hepatitis aguda grave infantil. Página web: <https://www.panamaamerica.com.pa/sociedad/panama-con-altas-posibilidades-de-registrar-su-segundo-caso-de-hepatitis-aguda-grave/amp>

- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., y Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2):304-306.
- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., y Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 44(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
- Patel, M. M., Pitzer, V. E., Alonso, W. J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., Viboud, C., y Parashar, U. D. (2013). Global seasonality of rotavirus disease. *The Pediatric infectious disease journal*, 32(4), e134–e147. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31827d3b68>
- Pedrero, S. P. (2001). Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos.
- Peláez, D., Guzmán, B. L., Rodríguez, J., Acero, F., y Nava, G. (2016). Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica*. 36(2):169-178. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>
- Peláez, D., Rodríguez, J. A., Rocha, E. L., y Rey, G. J. (2010). Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica*, 30, 276-282.
- Peled, N., Nakar, C., Huberman, H., Scherf, E., Samra, Z., Finkelstein, Y., y otros. (2004). Adenovirus infection in hospitalized immunocompetent children. *Clin Pediatr (Phila)*. 43(3):223–9.
- Pietrangelo, A. (2021). Enfermedades Transmitidas por el aire: Tipos, prevención y más. Healthline. Retrieved January 25, 2022. <https://www.healthline.com/health/es/enfermedades-transmitidas-por-el-aire>
- Pina, S., Creus, A., González, N., Girones, R., Felip, M., y Sommaruga, R. (1998). Abundance, morphology, and distribution of planktonic virus-like particles in two high-mountain lakes. *J. Plank. Res.* 20(12):2413-2421.

- Pinchao, J. (2022). Los países con casos de hepatitis aguda infantil. El Comercio. <https://www.elcomercio.com/tendencias/salud/paises-reportes-hepatitis-aguda-infantil.html>
- Piñeiro, R., Banderab, F., Álvez, F., Fernández, A., Silva, J. C., Pérez, C., Calvo C., y Cilleruelo M. J. (2011). Documento de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis aguda. Asociación Española De Pediatría: DOI: 10.1016/j.anpedi.2011.07.015
- Pinto, I. y Yee, J., (2011). Diagnóstico de las áreas marinas protegidas y de las áreas marinas para la pesca responsable en el Pacífico panameño. Fundación Marviva, Panamá, p. 215.
- Poma, H. R., Gutiérrez Cacciabue, D., Garcé, B., Gonzo, E. E. y Rajal, V. B. (2012). Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Sci. Total Environ.* 433,98–109.
- Pommeuy, M., y Le Guyader, F. (1998). Molecular approaches to measuring microbial marine pollution. *Current opinion in biotechnology*, 9(3), 292–299. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(98\)80062-1](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(98)80062-1)
- Ponce, L. y otros. (2021). Aislamiento y diagnóstico de cepas clínicas de enterovirus. *Rev Cubana de Ciencias Biológicas*, 9(1):1-8.
- Posovszky, C., Buderus, S., Classen, M., Lawrenz, B., Keller, K. M., y Koletzko, S. (2020). Acute Infectious Gastroenteritis in Infancy and Childhood. *Deutsches Arzteblatt international*, 117(37), 615–624. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0615>
- Prado, T., y Miagostovich, M. P. (2014). Virología ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão. *Narrativa. Cadernos De Saúde Pública*, 30(7), 1367–1378. <https://doi.org/10.1590/0102311X00109213>
- Protoc, L. M. (1997). Advances in study of marine viruses. *Microscopy Research and Technique* 37(2): 136-161.
- Ramig, R. (1997). Genetics of the Rotaviruses. *Annu Rev Microbiol*; 51:225-55.

- Reina, J. y otros. (2000). Evaluation of different clinical samples and cell lines in the insolation of enterovirus in pediatric patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(3):116-119.
- Reina, J., Ferres, F., Gutiérrez, O., De Gopegui, R., y Gonzáles-Cárdenas, M. (2004). Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). 61(2):137–142.
- Ribeiro, B. V., Cordeiro, T. A. R., Oliveira E Freitas, G. R., Ferreira, L. F., y Franco, D. L. (2020). Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta open*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100007>
- Ríos, M., Norero Vega, X., Villegas, J., Estripeaut C, D., De Juanes, M. E. (2014). Enterovirus Como Agente Causal de Hepatitis Fulminante Neonatal. *Pediátr. Panamá*. 43(3):30-33.
- Rivas González, R. (2022). ¿Qué es el adenovirus 41, posible causa de hepatitis infantil grave?. *The Conversation*. Página web: <https://theconversation.com/esta-el-adenovirus-41-detras-de-los-brotes-de-hepatitis-infantil-que-tanto-preocupan-a-la-oms-181842>
- Roda Husman A. M., y Bartram, J. (2007) Global supply of virus-safe drinking water. En Bosh A (Ed.) *Human Viruses in Water*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 127-162.
- Rodríguez, R. (2021). Rotavirus afecta en mayor número a los niños pequeños. <https://prensa.css.gob.pa/2021/08/27/rotavirus-afecta-en-mayor-numero-a-los-ninos-pequenos/>
- Rodríguez, Y. (2007). Adenovirus mortal. *Panamá América*. Retrieved Agosto 13, 2021, from <https://www.panamaamerica.com.pa/nacion/adenovirus-mortal-296864>.
- Rodríguez-Díaz, J., Querales, L., Caraballo, L., Vizzi, E., Liprandi, F., Takiff, H., y Betancourt, W. Q. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl. Env. Microbiol.* 75:387-394.

- Romera, A. (2015). Revisión bibliográfica de la conjuntivitis y queratoconjuntivitis vírica. 48. <http://uvadoc.uva.es:80/handle/10324/12151>
- Romero, P., Vogel, M., Solanes, F., y Luchsinger, V. (2010). Queratoconjuntivitis por adenovirus generadas a partir de una consulta oftalmológica. *Revista Chilena de Infectología*, 27(2):148–152. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182010000200009>
- Rose, J. B., Mullinax, R. L., Singh, S. N., Yates, M. V. y Gerba, C. P. (1987). Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Water Res.* 21:1375–1381.
- Ryan K. J., y Ray, C. (2011) Sherris. *Microbiología médica*, 6th Ed. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169ysectionid=162980676>.
- Saavedra, M. C., Tovar, C., y Betancourt, W. Q. (2012). Virus entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. *Interciencia*, 37(4):260-265. ISSN: 0378-1844. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33922748004>
- Salgado, S. (2005). Infecciones por adenovirus. *Medwave*. 5(4):e2385 doi: 10.5867/medwave.2005.04.2385.
- Salim A., Philips A., y otros. (1995). Sequential changes in small intestinal structure and function during rotavirus infection in neonatal rats. *Gut*. 36:231-8.
- Salvador, R. (2012). Picornavirus. Página: web: <https://epidemiologiamolecular.com/picornavirus/>
- Sambursky, R., Trattler, W., Tauber, S., Starr, C., Friedberg, M., Boland, T., McDonald, M., Dellavecchia, M., y Luchs, J. (2013). Sensitivity and Specificity of the AdenoPlus Test for Diagnosing Adenoviral Conjunctivitis. 131(1):17–22. DOI: 10.1001/2013.jamaophthalmol.513
- Samudio, S. y Garibaldo, A. (2017). Detección molecular de Rotavirus y Adenovirus en muestras de agua provenientes de la Bahía de Panamá, Panamá: Universidad de Panamá (Tesis de Licenciatura).

- Sánchez, M. L., y Martí, A. F. (2000). Enterovirus: Características y diagnóstico. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Sandín, D. y Rodríguez, G. (2006). Enterovirus. Temas de bacteriología y virología médica. Facultad de medicina, Instituto de higiene: Oficina del libro-fefmur. 2,515-518
- Šantl-Temkiv T., Sikoparija B., Maki T., Carotenuto F., Amato P., Yao M., Morris C. E., Schnell R., Jaenicke R., Pöhlker C., DeMott P. J., Hill T. C. J. y Huffman J.A. (2020). Bioaerosol field measurements: challenges and perspectives in outdoor studies. *Aerosol Sci. Technol.* 54:520–546. Doi: 10.1080/02786826.2019.1676395
- Santos, C. F., Sakai, V. T., Machado, M. A., Schippers, D. N., y Greene, A. S. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal of applied oral science: revista FOB* 12(1): 1–11. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572004000100002>
- Sasaki, Clarence. (2020). Faringoamigdalitis. MD, Yale University School of Medicine. Página web: <https://www.msmanuals.com/es/professional/trastornos-otorrinolaringol%C3%B3gicos/trastornos-bucal-y-far%C3%ADngeos/faringoamigdalitis#:~:text=La%20faringoamigdalitis%20es%20la%20infecci%C3%B3n,o%20la%20prueba%20antig%C3%A9nica%20r%C3%A1pida>
- Schnagl, R. D., Belfrage, K., Farrington, R., Hutchinson, K., Lewis, V., Erlich, J., y Morey, F. (2002). Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4114–4120. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4114-4120.2002>
- Schwartzbrod L. (1995). Level of viral contamination in aquatic environments. In: Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization. Geneva.
- She, R. y otros. (2006). Comparison of multiple shell vial cell lines for insolation of enteroviruses: A national perspective. *Journal of Clinical Virology*, 37(3):151-155.

- Sherlock, S., y Dooley, J. (2008). Diseases of the liver and biliary system. Chichester: John Wiley y Sons, Ltd. p. 724.
- Sibanda, T. y Okoh, A. I. (2012). Assessment of the incidence of enteric adenovirus species and serotypes in surface waters in the Eastern Cape province of South Africa: Tyume River as a case study. *Scientific World J.* 2012, Article ID 949216; doi:10.1100/2012/949216.
- Siebenga, J. J. y otros. (2009). Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, [2001-2007](#). *J Infect Dis.* (5):802-12.
- Singh-Naz, N., y Rodríguez, W. (1996). Adenoviral infections in children. *Adv Pediatr Infect Dis*; 11:365-88.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. y Gantzer, C. (2004). Survival of infectious poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and poliovirus-1 genome. *Water Res.* 38:2927.
- Sobsey, M. D., Battigelli, D. A., Shin, G. A. y Newland, S. (1998). RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology* 38(12):91-94.
- Sobsey, M. D., Shields, P. A., Hauchman, F. S., Hazard, R. L. y Caton, L. W. (1986). Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater and wastewater. *Water Sci. Technol.* 18:97-106.
- Soler, M., Lobos, S., Lorca, M., y Navarrete, E. (2009). Enterovirus en aguas naturales de Valparaíso: una propuesta metodológica para su análisis. *Biología Marina y Oceanografía*, 44(2), 511-516.
- Stuempfig, N. D., y Seroy, J. (2023). Viral Gastroenteritis. In StatPearls. StatPearls Publishing Gastroenteritis infecciosa aguda en la infancia y la niñez. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518995/>
- Sulbarán, M., Maldonado, A., Rojas, Y., y Bastardo, J. (2002). Características clínicas de la gastroenteritis por rotavirus y su asociación con distintos electroferotipos *Clinical*

- Features of Rotavirus Gastroenteritis and Their Association with Different Electropherotypes. 30(2):126–136.
- Symonds, E. M., Griffin, D. W., y Breitbart, M. (2009). Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Applied and environmental microbiology*, 75(5), 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>
- Tamayo, L., Berti, M., y Moreno, O. (2007). Rotavirus Actualización. *Revista Boliviana*, 52(1). <https://docplayer.es/7033078-ROTAVIRUS-actualizacion.html>
- Tani, N., Dohi, Y., Jurumatani, N. y Yonemasu, K. (1995). Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in urban river water. *Microbiol. Immunol.* 39:577–580.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., Parashar, U. D., y WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. (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)
- Teramoto S., y Kume, H. (2001). Adenovirus E1A gene product upregulates TNF-alpha gene. *Chest*; 119:1294-5.
- Tesini, B. L. (2021). Infecciones por adenovirus. Manual MSD. Página web: . <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/virus-respiratorios/infecciones-por-adenovirus>
- Theoklis, Z., Klein, J. (1998). Infecciones por enterovirus. *Rev Pediatría*. 19(6):183–191. <https://doi.org/10.1542/pir.19-6-183>
- Thermo Fisher Scientific. (2022). PCR Setup—Six Critical Components to Consider | Thermo Fisher Scientific. Pagina web: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>

- Toranzos, G. (1997) Environmental applications of nucleic acid amplification techniques. Technomic Publishing Company, Inc.
- Tsai, Y. L., Tran, B. y Palmer, C. J. (1995). Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:363–366.
- Valriberas, R. G., Prezzi, G. H., Muñoz, L.V., Portero, R. C. Portero y Anchuela, O. T. (1999). Infecciones gastrointestinales víricas notificadas al Sistema de Información Microbiológica. España, 1989-1999. 1999. *Boletín Epidemiológico; Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.*7
- Van Hannen, E. J., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J., y Laanbroek, H. J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 795–801. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.795-801.1999>
- van Heerden, J., Ehlers, M. M., y Grabow, W. O. (2005). Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *Journal of applied microbiology*, 99(5), [1256–1264](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02607.x). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02607.x>
- Vecchia, A. D., Fleck, J. D., Kluge, M., Comerlato, J., Bergamaschi, B., Luz, R. B., Arantes, T. S., Silva, J. V., Thewes, M. R., y Spilki, F. R. (2012). Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 72(4), 839–846. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000500009>
- Verreault, D., Moineau, S., y Duchaine, C. (2008). Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(3), 413–444. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-08>
- Vizzi, E. (2008). Rotavirus consideraciones biológicas, epidemiológicas e inmunológicas de la Infección en humanos, (IVIC), Volumen 12. Disponible en <https://biblat.unam.mx/es/revista/salus/articulo/rotavirus-consideraciones-biologicas-epidemiologicas-e-inmunologicas-de-la-infeccion-en-humanos>
- Wang, Y. F., Shen, F. C., Wang, S. L., Kuo, P. H., Tsai, H. P., Liu, C. C., Wang, J. R. y Chi, C. Y. (2016). *Molecular Epidemiology and Clinical Manifestations of*

- Adenovirus Respiratory Infections in Taiwanese Children. *Medicine*. 95(18):e3577.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000357>.
- Weinbauer, M. G., y Höfle, M. G. (1998). Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 431–438.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.431-438.1998>
- Wetz, J. J., Lipp, E. K., Griffin, D. W., Lukasik, J., Wait, D., Sobsey, M. D., Scott, T. M., y Rose, J. B. (2004). Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Marine pollution bulletin*, 48(7-8), 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.09.008>
- Xu, Z.Q., Wu, Y., Shen, F.X., Tan, M. y Yao, M. (2011) *Bioaerosol science, technology, and engineering: past, present, and future*. *Aerosol Sci Technol* 45, 1337–1349.
- Yard, Y., Núñez, J., y Correoso, J. (2021). Factores de riesgo de enfermedad diarreica aguda en menores de 5 años. *Revista Médico Científica*, 34. Retrieved Agosto 8, 2021.
- Yates, M. V., Gerba, C. P. y Kelley, L. M. (1985). Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:778–788
- Sobsey, M. D., P. A. Shields, F. S. Hauchman, R. L. Hazard, and L. W. Caton. 1986. Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater, and wastewater. *Water Sci. Technol.* 18:97–106.

ANEXO



Figura 28. Punto de muestreo y colecta de muestras de aire y agua en la Bahía de Panamá.

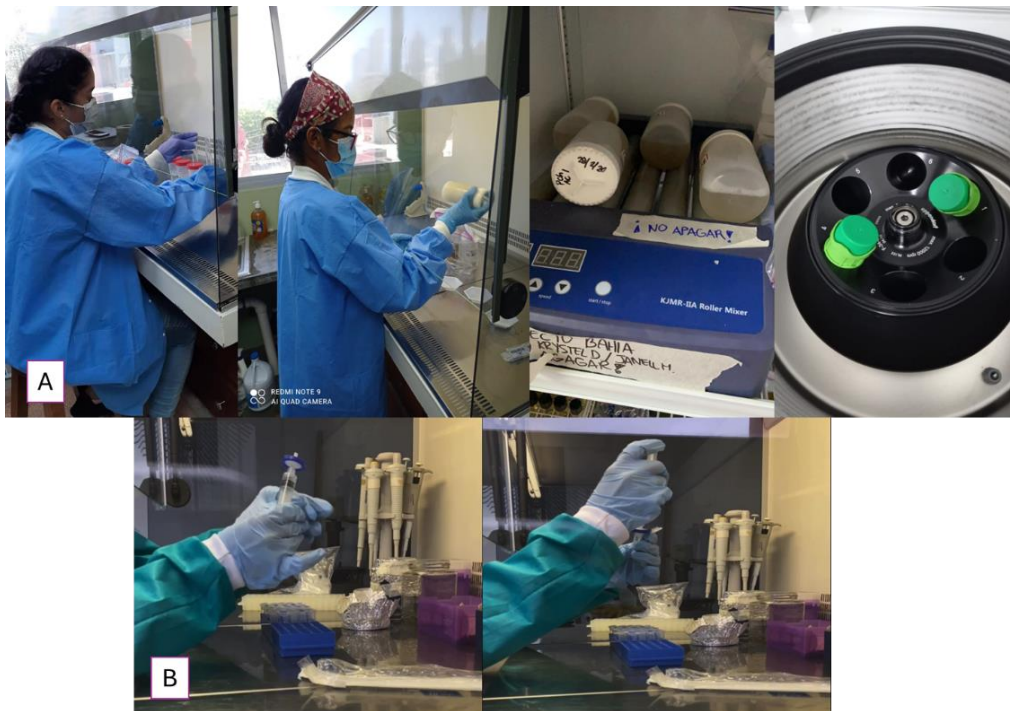


Figura 29. A. Procesamiento de muestras de aire y agua dentro de la cámara de flujo laminar. B. Filtrado de muestras.

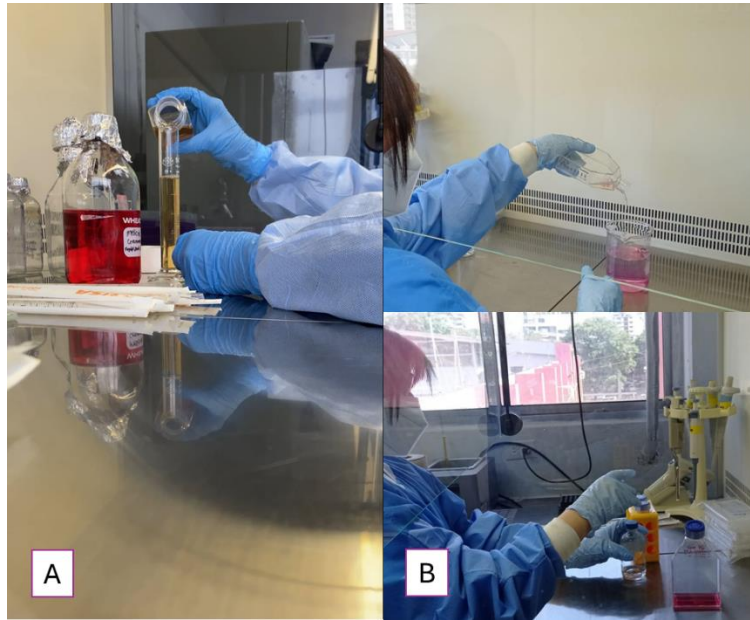


Figura 30. A. Preparación de medios de crecimiento 10%. B. Cambio de medio a células en botella de 75 cm²



Figura 31. A. Preparación de platos de 24 pocillos. B. Infección viral



Figura 32. Revisión de ECP en células Vero en microscopio invertido, luego de infección viral con muestras de aire y agua de la Bahía de Panamá.



Figura 33. Clarificación de muestras de cultivo celular, después de la semana de incubación.



Figura 34. A. Extracción de los ácidos nucleicos virales se utilizó el kit de extracción Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification (Promega, EE.UU). B. Cuantificación de muestras con Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

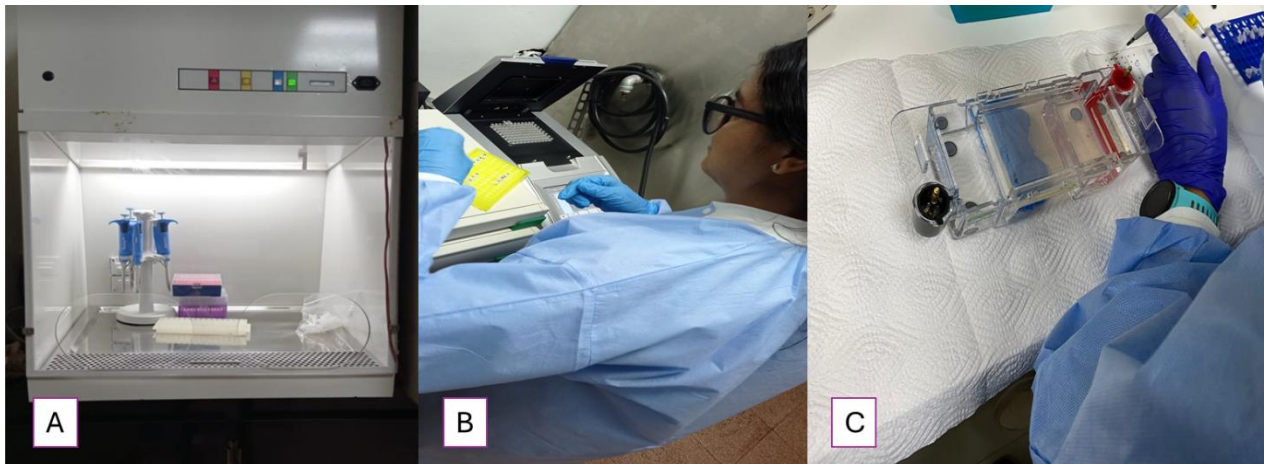


Figura 35. A. Preparación de la mezcla maestra para PCR en cámara de flujo laminar. B. Montaje de muestras en termociclador. C. Montaje de muestras en gel de agarosa al 2% con TBE 0.5x.