

Desarrollo de un sistema de detección de la contaminación viral para el control de enfermedades virales transmitidas por el agua.

Melina E Barrios.; María Dolores Blanco Fernández; Robertina Cammarata; Carolina Torres; Viviana Mbayed

Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

E-mail: melina.e.barrios@gmail.com

Resumen

Los virus son reconocidos cada vez más como una causa importante de infecciones transmitidas por el consumo de agua y alimentos. Estos se encuentran en el ambiente y en los alimentos en bajos niveles, por lo que para su detección es necesario implementar un paso previo de concentración. En este trabajo se evaluaron distintos métodos de concentración viral para las diferentes matrices hídricas: ultracentrifugación, floculación (líquidos cloacales y residuos industriales) y ultrafiltración tangencial (aguas de consumo). Para el análisis de posibles indicadores de contaminación viral se evaluaron a los bacteriófagos (virus que infectan a bacterias) y a los poliomavirus humanos, implementando su búsqueda en las principales fuentes de contaminación de aguas. Los métodos de concentración viral, ultracentrifugación (para afluentes) y ultrafiltración, (para aguas de consumo) presentaron una recuperación viral de 20-50%, permitiendo la concentración del virus control en las distintas matrices. En los residuos industriales y en los líquidos cloacales los bacteriófagos actuaron como buenos indicadores de contaminación fecal y fueron capaces de medir la eficacia del tratamiento. Se demostró la alta circulación en la población de Poliomavirus humanos en muestras de afluentes cloacales, avalando su uso como indicador de contaminación.

Introducción

Los vertidos líquidos de origen industrial y líquidos cloacales humanos tienen incidencia significativa sobre la salud de las personas y la calidad ambiental. Desde el punto de vista microbiológico, podrían ser fuente de patógenos en el medio acuático, provenientes principalmente de desechos de materia fecal u orina de animales o del hombre. Entre estos patógenos se pueden encontrar distintas especies virales, bacterianas y parásitos entre otras. Los virus más frecuentemente involucrados en la transmisión fecal oral son norovirus (NoV), virus de hepatitis A (HAV), virus de hepatitis E (HEV), rotavirus (RV) y astrovirus (AstV) (Wilhelmi et al. 2003). Estos patógenos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta hepatitis (Arcos et al. n.d.).

Para evitar este tipo de problema es importante realizar controles virológicos en las distintas matrices hídricas tanto en las principales fuentes de contaminación: líquidos cloacales, residuos industriales y lodos provenientes del tratamiento de estos, como también en alimentos con riesgo de contaminación, agua de bebida, verduras de hojas verdes, frutas, carnes, mariscos.

Los virus se encuentran en el ambiente y en los alimentos en bajos niveles, las limitaciones que pueden mostrar los métodos de detección viral en estas matrices hacen que la concentración viral previa sea un paso indispensable. Los métodos de concentración se basan en las propiedades físicas y químicas de los virus, como lo son la carga iónica, el tamaño de la partícula viral, la densidad y el coeficiente de sedimentación. La elección del método de concentración de virus es dependiente de la matriz con la que se quiera trabajar. Existen distintos métodos de concentración de virus en aguas y alimentos entre los que se encuentran la adsorción-elución; ultrafiltración; ultracentrifugación; floculación; precipitación con PEG

Debido a la gran diversidad de microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental no es posible su determinación individual, y frente a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en las distintas matrices, se ha planteado trabajar con microorganismos indicadores que actuarían como marcadores subrogantes de la presencia de patógenos en las distintas matrices (Iván et al. 2010, Larrea-murrell et al. 2013, Luby et al. 2008).

En Argentina, la calidad del agua y la eficacia del tratamiento de las aguas residuales para la eliminación de microbios se evalúan con indicadores bacterianos (coliformes totales, fecales, *E.coli* y enterococos) (Rossen et al. 2008). Sin embargo, se ha demostrado que otros agentes como virus y protozoos presentan mayor resistencia a procesos de desinfección y mayor estabilidad en el ambiente que las bacterias (Rosa, G. La, Pourshaban, M., Iaconelli, M. & Muscillo 2010, T.-T. & E.K. 2005). A su vez, en algunos ambientes estas bacterias pueden ser nativas y multiplicarse. Por lo tanto, recientemente se ha establecido un consenso general sobre la necesidad de utilizar indicadores microbiológicos alternativos (indicadores virales), que brinden información sobre la posible presencia de virus en las distintas matrices (Anon n.d.).

Entre los indicadores virales propuestos para evaluar la contaminación se encuentran los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) Somáticos y F-específicos, y los poliomavirus (PyV) humanos y animales (Anon n.d., Bofill-Mas et al. 2000).

Estos bacteriófagos tienen la ventaja de estar altamente concentrados en efluentes cloacales, ser físicamente semejantes y tener patrones de persistencia similares a los virus entéricos de preocupación para la salud humana, no exhibir crecimiento en aguas ambientales y no ser patogénicos. La metodología para su detección y cuantificación es de fácil implementación y podría llevarse a cabo en los laboratorios donde regularmente se realizan determinaciones bacteriológicas, ya que no requiere de equipamiento adicional.

Cabe destacar que si bien la búsqueda de los bacteriófagos representaría un avance con respecto a la sola detección de bacterias como indicadores, no brindaría información sobre el origen humano o animal de la contaminación fecal. Esto es de gran importancia para decidir acciones correctivas con relación a la salud pública y el ambiente (Bofill-Mas et al. 2013).

En este sentido, los PyVs presentan la ventaja de ser virus altamente prevalentes y específicos de hospedador. Diferentes estudios han demostrado que estos virus se encuentran frecuentemente en aguas residuales y en otros ambientes acuáticos en todo el mundo, por lo que han sido propuestos como indicadores de contaminación viral en vertidos cloacales y en aguas de consumo (Bofill-Mas et al. 2010). Además, por su especificidad de hospedador, se ha propuesto la detección de PyV animales como trazadores del origen de la contaminación microbiana (Hundesda et al. 2010).

En este trabajo se abordará la evaluación de distintos métodos de concentración viral para la subsiguiente detección de patógenos y posibles indicadores de contaminación viral, en distintas matrices hídricas. Por otro lado se estudiarán parámetros microbiológicos alternativos, los bacteriófagos, como indicadores virales de contaminación, evaluando su correlación con los indicadores convencionales. Para esto se analizaron muestras a la entrada y a la salida de diferentes plantas de tratamiento de residuos industriales relacionadas con la actividad alimentaria y líquidos cloacales.

Objetivo

Implementar un sistema de control aplicable a la detección de contaminación viral en aguas, transferible a los sistemas de abastecimiento de aguas de consumo y tratamientos de efluentes cloacales y desinfección en el país.

Materiales y Métodos

Muestreo

En el periodo entre marzo y diciembre de 2011, se muestrearon un total de 17 muestras, correspondientes a la entrada de líquido cloacal crudo en las plantas de recolección o tratamiento del área metropolitana de Buenos Aires y conurbano: zona norte, sudoeste y sudeste. Posteriormente, en el periodo de abril a noviembre del 2013 se continuó el muestreo solo en el punto correspondiente a zona norte (n=8).

Se colectaron entre agosto 2015 y junio 2016, 19 muestras a la entrada y salida de diferentes plantas de tratamientos de residuos industriales relacionados con la actividad alimentaria (mataderos de pollos, equinos y bovinos), localizadas en la prov. de Buenos Aires. Se tomaron muestras de líquidos de entrada y salida de una planta de residuos domiciliarios de la prov. de Buenos Aires.

Métodos de Concentración de Virus en líquidos Cloacales y Residuos Industriales

Se evaluaron 2 métodos de concentración viral para determinar la eficiencia de recuperación a partir de afluentes cloacales: ultracentrifugación y floculación (Prata et al. 2012).

Se inocularon 3 muestras diferentes de afluentes cloacales, cada una de ellas por duplicado, con el bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa* PP7 (ATCC 15692-B2) como virus control, obteniendo una concentración inicial de 10⁶ UFP/ml. Un duplicado de cada muestra se concentró por ultracentrifugación y el otro por floculación.

Método de Concentración Viral en aguas de consumo

Se usaron 2 sistemas consecutivos de ultrafiltración. El sistema inicial con un punto de corte de 50kDa (los solutos de menor peso a 50kDa filtran mientras que los de mayor tamaño queden retenidos) (Microza AHP 2013) concentró una muestra de 50 litros de agua destilada hasta un volumen aproximado de 1,5 litros. El segundo, más pequeño, también con un corte de 50 KDa, se utilizó para la concentración de esa muestra de 1,5 litros hasta un volumen final de 50-100ml. Los puntos de muestreo I, S1, S1L, S2 se muestran en la figura 1 (Rajal et al. 2007)



Figura 1: puntos de muestreo. **A** Sistema 1. **B** Sistema 2

Evaluación de los métodos de concentración

Se extrajo ARN de las muestras iniciales sembradas con PP7 y de los distintos pasos de concentración viral. Posteriormente, se cuantificó PP7 por PCR en tiempo real, siguiendo el procedimiento publicado por Rajal y col 2007 (Rajal et al. 2007).

Cálculo de Recuperación Viral y Concentración Viral

La recuperación viral parcial de cada paso de filtración para los dos sistemas de columnas (grande y pequeña), así como la recuperación global para el procedimiento general, se determinaron utilizando el siguiente cálculo.

$$\% \text{ Recuperación (por cada paso de filtración)} = \left(\frac{\text{PP7 en la muestras despues del paso de filtracion}}{\text{PP7 en la muestras antes del paso de filtracion}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Recuperación global} = \left(\frac{\text{PP7 en la muestras final del paso de filtracion}}{\text{PP7 en la muestras inicial}} \right) \times 100$$

$$[\text{PP7}] \text{ en cada paso} = \frac{V \text{ de elución de extracción} \times V \text{ de RT} \times V \text{ del proceso}}{V \text{ agregado de RNA} \times V \text{ de muestra de extracción}} \times \text{Copias genómicas en c/u paso}$$

Evaluación de los bacteriófagos somáticos y F-específicos como indicadores de contaminación fecal.

El aislamiento de bacteriófagos somáticos y F- específicos se llevó a cabo utilizando el ensayo de doble capa de agar según la norma ISO 10705-1 / 2, respectivamente. La cuantificación de coliformes totales y fecales se realizó por la técnica del número más probable (NMP), según indica el Standard Methods 9221B y 9221E(American Public Health Association et al. 1999).

Cálculo de la eficiencia de tratamiento de los efluentes industriales y cloacales

Para la determinación de la reducción de un indicador específico, se establece una relación entre la carga del indicador que fluye a la planta de tratamiento (o a una unidad de ella) y la correspondiente carga en el flujo de salida de la planta(Pundsack et al. 2001).

$$\text{Reducción (\%)} = \left[\left(\frac{\text{carga del indicador a la entrada} - \text{carga del indicador a la salida}}{\text{carga del indicador a la entrada}} \right) \times 100 \right]$$

$$\text{Reducción (log10)} = \log_{10} \left(\frac{\Sigma \text{carga del indicador a la entrada}}{\Sigma \text{carga del indicador a la salida}} \right)$$

Evaluación de los Poliomavirus (PyV) como indicadores de contaminación fecal

Para la detección de los PyV humanos los efluentes se concentraron por ultracentrifugación (Bofill-Mas et al. 2000), que resultó el método más eficiente. Los ácidos nucleicos se extrajeron con el equipo comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche LifeScience) y se almacenaron a -80°C. El remanente de las muestras fue inactivado y descartado de acuerdo al protocolo de residuos biológicos de la institución. Luego se realizó una *nested*-PCR sobre los genes de VP1/2, la cual se dividió en dos grupos: **A** (que detecta virus JC, BK, TS, H9, MW, MC) y **B** (que detecta KI, WU, H6 y H7). La posterior caracterización de las muestras positivas se realizó por secuenciación y análisis filogenético de los amplicones (Torres et al. 2016) (Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F 1997)(Hall TA 1999) (Guindon S 2003)

Resultados

Aguas de consumo: Ultrafiltración.

Para evaluar la eficiencia de recuperación del método de concentración por ultrafiltración, se realizaron 3 réplicas del ensayo, utilizando como control interno del proceso el bacteriófago PP7, en concentración final de 10⁶ UFP/ml. Para recuperar el PP7 retenido en el sistema se utilizó una solución de lavado 0.05 M de glicina/NaOH y 0.1% de Tween 80 (sc.L). Se tomaron 4 muestras por ensayo: inicial (I); concentrado del sistema 1 sin lavado (S1); concentrado del sistema 1 con lavado (S1L) y concentrado del sistema 2 (S2).

Se calcularon 3 tipos de recuperación: en cada uno de los pasos del sistema (PS1); en cada uno de los sistemas (PS1L; PS2) y la global del sistema (PGlobal). Los resultados se detallan en la tabla.

Pasos	% de Recuperación	
	Mediana entre ensayos	Rango entre ensayos
PS1	30,22	20,17-53,32
PS1L	44,85	20,88-74,30
PS2	5,29	3,43-13,39
PGlobal	3,91	0,71-4,10

Tabla 1: Mediana y rango del % de recuperación, de los 3 ensayos en cada paso

El porcentaje de recuperación que presenta el sistema 1 (PSL1) es de 44,85%. El sistema 2 mostró un porcentaje de recuperación de 5,29%. El sistema Global presentó un porcentaje de recuperación bajo, 3,91%.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que el paso de lavado con la sc.L es fundamental para el incremento de la recuperación viral. Por otro lado, el sistema 2 causó pérdidas del virus antes recuperado.

Trabajos anteriores han demostrado que el bloqueo de las membranas con suero fetal bovino o el lavado con la solución L incrementan el porcentaje de recuperación, debido a que evitan la adhesión y permiten la elución del virus del sistema (Oshima 2001), (Rajal et al. 2007).

Aguas de afluentes cloacales: Ultracentrifugación y floculación

Para la concentración de virus a partir de muestras de afluentes cloacales se evaluó la eficiencia de recuperación de 2 métodos (ultracentrifugación y floculación). Cada ensayo se realizó sobre 3 muestras. Se utilizó como control interno del proceso una concentración conocida, 10^5 UFP/ml final de PP7.

La capacidad de recuperación de los métodos de concentración se muestra en la tabla 2.

Metodo de concentración	Muestra	% recuperación	Mediana	Rango
Ultracentrifugación	853	69,9	34,4	13,9-69,9
	889	34,4		
	873	13,9		
Floculación	853	2,6	3,1	2,6-5,2
	889	3,1		
	873	5,2		

Tabla 1: % de recuperación de PP7 en los métodos de concentración

Los métodos de concentración viral exhibieron una eficiencia altamente variable, como ya ha sido descrita en este tipo de procesos (Victoria M, et. al, 2009).

El elevado porcentaje de recuperación de PP7, observado en el método de concentración viral por ultracentrifugación en relación con el de floculación, nos llevó a elegir el primer método para procesar las muestras de los afluentes.

La variación de resultados que presentó el método de ultracentrifugación fue elevada, pero hay que considerar que a las variaciones propias del método se suma la variable de la composición de la matriz acuosa, siendo que los triplicados correspondieron a tres muestras diferentes, y sería esperable que las matrices no fueran homogéneas.

Evaluación de los bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal

Los indicadores bacterianos fueron detectados y cuantificados en todos los desechos industriales provenientes de diferentes actividades relacionadas con productos de origen animal y los residuos de líquido cloacal humano (gráfico 1A).

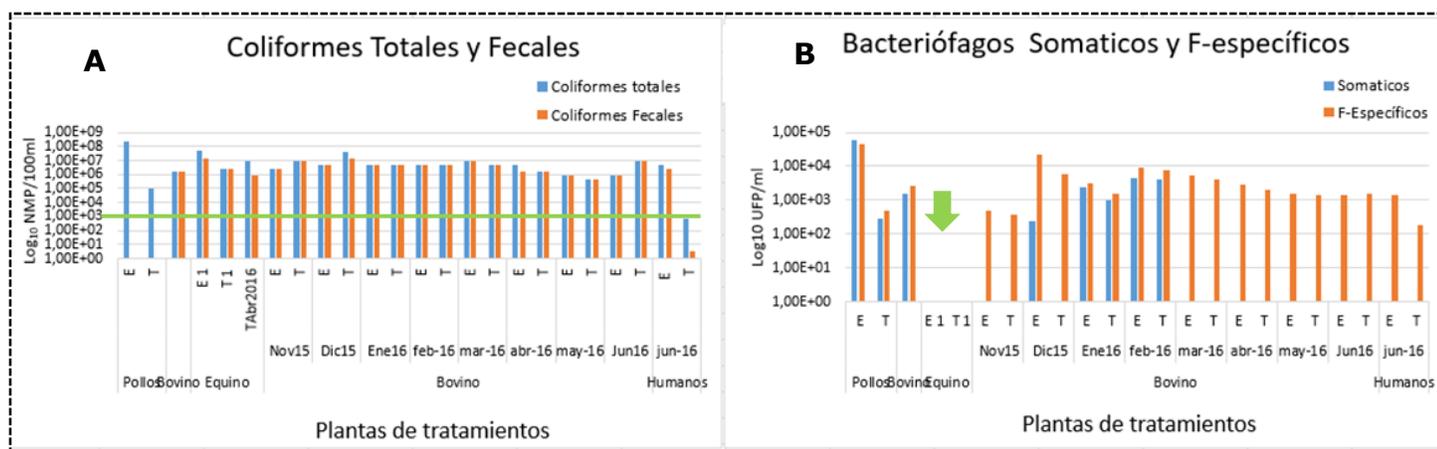


Gráfico 1: A. Log₁₀NMP/100ml de coliformes totales y fecales B. Log₁₀ UFP/ml de bacteriófagos somáticos y F-específicos a la entrada (E) y luego del tratamiento (T) en las distintas plantas de tratamientos. — Límite de vuelco permitido por la provincia de Buenos Aires. ↓ muestras de mataderos equinos.

Se obtuvieron valores mayores a 10³ NMP/100ml (límite de vuelco de residuos industriales, permitido por la prov. de Buenos Aires) en todas las muestras.

En particular, los bacteriófagos fueron detectados en todas las muestras provenientes de la industria bovina y aviar con niveles de detección mayores a 10²UFP/ml, y en las muestras de residuos cloacales humanos (gráfico 1B). Sin embargo, en los residuos industriales de origen equino, a pesar de la alta concentración de coliformes encontrada, solo se logró detectar a los bacteriófagos luego de una etapa de enriquecimiento, (según ISO 10705-

2 con las siguientes modificaciones: -uso de bacteria y medios indicados en la ISO10705-1). Una explicación probable es que las cepas bacterianas utilizadas en los análisis no fueron capaces de sostener el crecimiento de los fagos presentes en las heces de caballo. Además, otros autores propusieron que la cantidad de colifagos puede verse favorecida en aquellos animales (pollos, cerdos, vacas) que reciben antibióticos como aditivo alimentario. Habría así un alto número de hospedadores sensibles, con una mayor presencia de bacteriófagos en los residuos industriales de animales expuestos a altas concentraciones de antibióticos.(Hygiene 1986)

Comportamiento del bacteriófago frente a los tratamientos a los que son sometidos los efluentes

Se evaluaron las eficiencias de las distintas plantas de tratamientos mediante la cuantificación de indicadores bacterianos y de los bacteriófagos (tabla 3).

Muestra	Fecha	<i>Coliformes Totales</i>	<i>Coliformes Fecales</i>	<i>Bacteriófagos F-específicos</i>
		% Reducción	% Reducción	% Reducción
Pollos	Ago15	99,96	SD	98,91
Equino	Sep15	94,78	84,00	SD
Bovino	Nov15	<0	<0	20,98
	Dic15	<0	<0	72,27
	Ene16	0,00	0,00	50,00
	Feb16	0,00	0,00	17,84
	Mar16	53,76	53,76	27,27
	Abr16	65,12	0,00	31,74
	May16	53,76	53,76	12,50
	Jun16	<0	<0	<0
Humanos	Jun16	99,98	100,00	87,12

Tabla 3: Porcentaje de reducción de los indicadores de contaminación fecal en los tratamientos de los efluentes industriales y líquidos cloacales. * SD= Sin datos.

La eficacia del tratamiento en la planta de la industria relacionada con la actividad aviar y la planta de líquidos cloacales humanos mostró una reducción para los indicadores virales y bacterianos, aunque menor en el caso de los primeros. Esto podría deberse a una mayor resistencia de los fagos al tratamiento. Sin embargo a pesar de la reducción observada, los valores bacterianos exceden los límites microbiológicos de vuelco permitidos por la Provincia de Buenos Aires.

En cambio, en la industria bovina, los bajos o insignificantes porcentajes de reducción de los indicadores bacterianos y virales obtenidos revelan como resultado la ineficiencia de los procesos de tratamiento. Este resultado concuerda con la situación actual de la planta de tratamiento, que se encuentra en un período de reacondicionamiento, y la remoción de lodos en las lagunas intermedias genera un incremento de bacterias en la salida.

Evaluación de los Poliomavirus como indicadores de contaminación fecal

Es de gran interés la búsqueda de nuevos indicadores de contaminación viral. Por lo cual se quiso evaluar a los PyV como posibles indicadores.

Con este objetivo se evaluó la presencia de PyV en muestras de afluentes cloacales crudo del área metropolitana de Buenos Aires y conurbano (mediante la concentración por ultracentrifugación y la posterior detección por PCR).

Los resultados se observan en la tabla 4.

	Periodo	Muestras Analizadas	Muestras Positivas A	Muestras Positivas B	Muestras Positivas A1		Muestras Positivas A2
					JC	BK	
Afluente	2011	17	15	1	12	12	0
Afluente	2013	8	8	1	8	8	2

Tabla 4: Frecuencia de detección de PyV en los afluentes periodo 2011/2013.

En el periodo de marzo a diciembre del 2011, 15 de 17 muestras (88,24 %) fueron positivas para algún PyV, más precisamente, 12 de 17 muestras (70,59%) dieron positivo para JC y BK. La discriminación de estos dos virus pudo hacerse por la determinación del tamaño del segmento amplificado por PCR, en un gel de agarosa al 3 %. Otros investigadores del grupo de trabajo demostraron por secuenciación la correspondencia entre las bandas de cada tamaño y la amplificación de cada uno de los virus JC y BK (figura 3). En el periodo de abril a noviembre 2013 todas las muestras dieron positivo por lo menos para una clase de PyV.

Estos resultados nos indican la circulación constante de los PyV en la población.

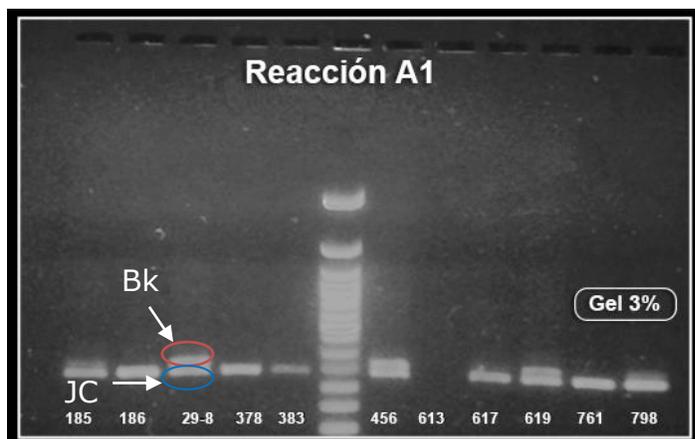


Figura 3: PCR para JC y BK, diferenciación por peso molecular

Conclusiones

A pesar de las altas variaciones que presentan los métodos de concentración utilizados en este trabajo, ultracentrifugación y ultrafiltración, para muestras de afluentes y aguas de consumo, respectivamente, presentaron un porcentaje de recuperación elevado. Es importante destacar la necesidad de un control interno para poder comparar con otros métodos o con trabajos de otros laboratorios.

En la industria aviar y en la planta de tratamiento de líquidos cloacales, los porcentajes de reducción de los indicadores bacterianos resultaron ser mayores que los virales, lo que indica que los bacteriófagos resultaron más resistentes que los indicadores bacterianos a los tratamientos. A su vez los bacteriófagos no mostraron estacionalidad. Estas características les conferirían ventajas como indicadores para distintos tipos de contaminación fecal, principalmente la asociada a humanos, pollos y bovinos.(Anon n.d.)

La técnica implementada ofrece la ventaja de medir la viabilidad viral, lo que no es posible con el uso de otros indicadores virales y resultan de fácil transferencia a los laboratorios de baja complejidad, dado que no requiere equipos sofisticados ni personal capacitado en análisis moleculares.

Este trabajo ha demostrado la alta circulación en la población de PyV reflejada en los resultados obtenidos en la detección y caracterización de las muestras de afluentes. Esto permitirá en un futuro utilizarlos como marcadores de la contaminación viral.

Bibliografía

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation, 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, p.541.
- Anon, US EPA 2004 Report to Congress on the Impacts and Control of CSOs and SSOs. US Environment Protection Agency, Washington, DC.
- Anon, USEPA. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality.
- Arcos, P. et al., Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua . , pp.69–79.
- Bofill-Mas, S. et al., 2010. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology journal*, 7, p.141.
- Bofill-Mas, S. et al., 2013. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *BioMed Research International*, 2013.
- Bofill-Mas, S., Pina, S. & Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), pp.238–245.
- Guindon S, G.O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Hundesda, A. et al., 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *Journal of Virological Methods*, 163(2), pp.385–389.
- Hygiene, E., 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. , (1981), pp.255–262.
- Iván, R. et al., 2010. Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. , 26(4), pp.327–335.
- Larrea-murrell, J.A. et al., 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas : revisión de la literatura. , 44(3), pp.24–34.
- Luby, S.P. et al., 2008. Tubewell water quality and predictors of contamination in three flood-prone areas in Bangladesh. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), pp.1002–1008.
- Oshima, K.H., 2001. Efficient and predictable recovery of viruses and *Cryptosporidium parvum* Oocysts from water by ultrafiltration system. *Technical Completion Report*, (February), p.62.

- Prata, C. et al., 2012. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(1), p.64.
- Pundsack, J. et al., 2001. Seasonal Pathogen Removal by Alternative On-Site Wastewater Treatment Systems. *Water Environment Research*, 73(2), pp.204–212.
- Rajal, V.B. et al., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41(7), pp.1411–1422.
- Rosa, G. La, Pourshaban, M., Iaconelli, M. & Muscillo, M., 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Ital.
- Rossen, A. et al., 2008. Indicadores bacterianos de contaminación fecal en el embalse San Roque (Córdoba , Argentina). , 330, pp.325–330.
- T.-T., F. & E.K., L., 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), pp.357–371.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, H.D., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.
- Torres, C. et al., 2016. High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina: Detection of JC, BK, Merkel-cell, Malawi, and human 6 and 7 polyomaviruses. *Science of the Total Environment*, 542, pp.192–202.
- Victoria M, Guimaraes F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, et al., 2009. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *J Virol Methods*, 156, pp.73–76.
- Wilhelmi, I., Roman, E. & Sánchez-Fauquier, a., 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(4), pp.247–262.