

TECNICA DE DETECCIÓN FLUORO-INMUNOMAGNÉTICA DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUAS

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el desarrollo de nuevos métodos para la detección de patógenos en aguas con implicaciones a nivel de salud pública.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 El agua es un elemento que contribuye de manera fundamental a todo proceso vital, pero también puede llegar convertirse en un vector transmisor de enfermedades cuando su calidad no es óptima. Aquellas enfermedades transmitidas por el agua se les conocen como "enfermedades de transmisión hídrica" y pueden ser causadas por agentes biológicos o químicos. Las
15 enfermedades de origen biológico suelen ser contagiosas y sus agentes etiológicos pueden ser de tipo bacteriano, parasitario o viral.

Se considera que más de 140 tipos de virus entéricos pueden ser encontrados ser encontrados en fuentes hídricas (Pelaez D, *et al*, 2010). Entre estos se encuentra
20 los Rotavirus, Norovirus, Sapovirus, Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Reovirus (Kiulia, N. *et al*, 2015). Una investigación publicada este año, por el grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, sobre aguas procedentes de 102 municipios de Colombia mostró que el 50,7% de las muestras fue positivo para algún tipo de virus entérico. La mayor prevalencia fue de virus Hepatitis A con un
25 26,73%, seguido de enterovirus y rotavirus con 20.48 % respectivamente y adenovirus (18.05%). Además, los autores reportaron que los niveles de virus en aguas crudas y potables fue muy similar (48,26% y 45,83%, respectivamente) (Pelaez D. *et al*, 2016).

30 Una fuente hídrica contaminada con virus entéricos es de suma importancia a nivel de salud pública, ya que muchos de ellos pueden permanecer viables en las fuentes de agua, teniendo la capacidad de pasar las barreras físicas y químicas (cloro) de los procesos convencionales de potabilización, llegando incluso a cultivos que pueden convertirse en vectores de transmisión de enfermedades.

Por tal motivo, microbiólogos, epidemiólogos y responsables de la calidad de agua han debatido sobre la utilidad de hacer seguimiento y monitoreo a la presencia de virus como indicadores de contaminación, comprobando así la eficiencia de los procesos de potabilización. Actualmente en Colombia no existe ninguna regulación
5 sobre virus en muestras de aguas.

Desde el punto de vista analítico, los virus son difíciles de detectar debido a que se encuentran diluidos en agua (1 a 10^3 partículas virales/Lt de agua) (Kiulia, N., y otros, 2015). Los métodos de detección de virus en muestras como el agua, están
10 basados en métodos moleculares. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR acoplada a reverso transcriptasa (RT-PCR) y la PCR cuantitativa y en tiempo real (qPCR), son algunas de las más utilizadas y exhiben alta sensibilidad y especificidad. No obstante, existen limitantes tales como la ausencia de correlación entre el genoma viral detectado y su nivel de infectividad, haciendo
15 necesario emplear métodos adicionales como el cultivo celular para poder identificarlos.

El cultivo celular aunque sensible también es laborioso y costoso. Además, no todos los virus son capaces de generar efecto citopático con lo cual el proceso de
20 detección se dificulta. Incluso para algunos enterovirus como es el caso de Norovirus, no hay disponibles líneas celulares de propagación (Hamzaa IA et al, 2011).

El uso de métodos serológicos también es muy frecuente. Una de ellas es el
25 ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA). No obstante, una de las dificultades que presenta es que detectan títulos virales elevados, requiriendo pretratamientos para concentrar los virus (Kiulia, N. et al. 2015).

Para concentrar los virus, se emplean técnicas tales como la adsorción-elución.
30 Esta técnica se fundamenta en el uso de membranas eletropositivas o electronegativas que permiten la adsorción de las partículas virales debido a las interacciones electrostáticas entre ambos. Seguidamente, son eluidos de la superficie del filtro a través de soluciones como extracto de carne, glicina o hidróxido de aluminio, que son sustancias que compiten por los sitios de unión del
35 virus en la membrana, liberándolos a la solución (Calgua, B et al. 2013). La principal desventaja del método es la baja recuperación viral, ya que en un estudio

reportado por Fumian, T., et al, el método basado en adsorción-elución tuvo una tasa de recuperación de tan sólo el 3.5% (Fumian, T., et al, 2010).

Otra técnica empleada para la concentración viral es la ultrafiltración tangencial (UFT), la cual consiste en realizar una serie de filtrados en membranas de distinto tamaño de poro, dirigiendo la muestra a un filtro de flujo tangencial por medio de una bomba peristáltica de alta presión, produciendo dos fracciones: la filtrada de interés y la excluida por el filtro (Negrete, A. et al, 2014). En un estudio realizado por Alavandi et al, tras procesar 100 L de agua a través de esta técnica, se obtuvo un volumen final de 100 mL y un rango de recuperación viral que osciló entre un 7.5 a 89.61% (Alavandi et al, 2015). La técnica tiene varias limitantes. Una de ellas, es el tiempo. Se requieren 24 a 48 horas para realizar la concentración viral (Pelaéz, D. et al. 2010). Su aplicación también se ve limitada debido a la concentración simultánea de interferentes orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras que no permiten que los procesos de identificación viral posteriores tales como PCR o cultivos celulares, se lleven a cabo adecuadamente, generando falsos negativos.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, se han introducido otras técnicas de concentración. Entre estas cabe resaltar la separación inmunomagnética (IMS). El prefijo “**inmuno**” involucra el uso de anticuerpos (Ac), que son glicoproteínas en forma de “Y” las cuales son generadas por el sistema inmune de animales y humanos en presencia de una sustancia extraña o antígeno (Ag). Los Ac presentan afinidad intrínseca por el Ag que puede alcanzar hasta 10^{11} mol/L, donde el antígeno es reconocido a través de la interacción antígeno-anticuerpo (Ac-Ag) (Mortaza, I. 2013).

El sufijo “**magnética**” indica el uso de una partícula que presenta esta propiedad, cuya superficie es usada para inmovilizar anticuerpos (Ac) a través de diferentes métodos. La inmovilización debe asegurar que el Ac reconozca el antígeno y para esto debe quedar bien orientado sobre la superficie. Esto significa que la fracción constante o base de la Y quede en contacto con la superficie y los dos brazos o fracción variable quede disponible para la detección del antígeno. En este caso, se podría decir que cada anticuerpo (tipo IgG) puede unirse a dos antígenos (Villamizar R, 2009).

La propiedad magnética es aprovechada por tanto para concentrar y separar los antígenos a través de la aplicación de un campo magnético externo. La IMS ha sido propuesta para la detección selectiva de partículas virales intactas o infecciosas. Esta técnica ha sido acoplada a métodos molecular y ha posibilitado la identificación y cuantificación de virus entéricos tales como Hepatitis A (Lee, K., et al., 2012), Adenovirus (Haramoto E et al., 2010) Rotavirus (Yang W et al, 2011) a partir de diferentes muestras ambientales eliminando interferentes, incluido inhibidores de PCR.

Es así como, en esta patente se presenta una técnica mejorada de la IMS a la que se ha denominado **“Separación Fluoro-Inmuno-Magnética”** de partículas virales, que emplea una tipo de partícula que integra las propiedades magnéticas y de fluorescencia, para permitir eventos de separación, concentración viral y visualización en paralelo. De esta forma, se tiene un mejor control sobre el proceso de detección viral. Las partículas son funcionalizadas gracias a una cubierta rica en grupos aminos presente en su superficie, lo que facilita la adsorción del anticuerpo en posición correcta y por tanto, la detección sensible y selectiva de diferentes tipos de virus entéricos con implicaciones a nivel de salud pública. La utilización de anticuerpos como elementos de reconocimiento asegura la detección de partículas virales infecciosas sin la necesidad de emplear técnicas adicionales de cultivo en líneas celulares para evidenciar infectividad. Para confirmar la presencia del virus se hace necesario hacer extracción de material genético y para esto se emplea un kit comercial de rápida y sencilla aplicación. De esta forma, a través de la utilización de esta técnica, se abre un espectro de posibilidades en detección, ya que al emplear anticuerpos específicos se puede reconocer diferentes tipos de patógenos que incluye cualquier tipo de virus entérico e incluso quistes de parásitos, los cuales también se encuentran muy diluidos en aguas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una forma esquemática del proceso de funcionalización de las micropartículas fluoro-magnéticas, en donde las partículas magnéticas poseen un core o núcleo fluorescente y una capa externa magnética la cual se encuentra modificada con grupos aminos que facilita la unión de anticuerpos monoclonales para diferentes tipos de virus entéricos (i.e. Rotavirus, Adenovirus, Hepatitis A, Norovirus, Enterovirus) a través de los grupos carboxilos presentes en la fracción

cristalizable (Fc) de la glicoproteína. Esto garantiza la orientación adecuada del anticuerpo, permitiendo dos sitios para unión al antígeno. Después de cada paso de la funcionalización, las partículas son lavadas tres veces con PBS y agua destilada estéril para remover los anticuerpos que no fueron adsorbidos a las partículas.

La figura 2 muestra Representación Esquemática del Proceso de Captura, Concentración y Separación de Virus empleando partículas magneto-inmuno-fluorescentes, en donde la propiedad magnética de las partículas es usada para concentrar y separar el virus de interés presente en la muestra de agua, a través de la aplicación de un campo magnético externo.

La figura 3 enseña la caracterización Microscopía Confocal de las Partículas Magnéticas. A) Partículas solas B) Micropartículas funcionalizadas con anticuerpo monoclonal anti-Rotavirus C) Formación de cúmulos (clusters) inducidos por la presencia de Rotavirus (10^3 partículas virales/mL) en la muestra.

La figura 4 es una microscopía de Fuerza Atómica A) Partícula Fluoro-magnética B) Partícula viral de Rotavirus C) Partículas Biofuncionalizadas con anti-Rotavirus D) Complejo partícula-anticuerpo-virus después de haber sido expuestas a 10^3 partículas virales de Rotavirus, en donde se puede evidenciar la presencia de virus sobre la superficie de las partículas, siendo más evidente la agrupación formada sobre la parte inferior adsorbidos a través de los anticuerpos.

La figura 5 son Imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Microfotografía de Partículas magnéticas funcionalizadas después de haber sido expuestas a 10^6 partículas virales de Rotavirus B) Microfotografía de una partícula magnética B) Zoom de los Virus (Rotavirus) Unidos a las partículas magnéticas.

La figura 6 corresponde a una curva de calibración realizada con concentraciones diferentes de la vacuna Rotateq (contiene 5 serotipos diferentes de Rotavirus a una concentración inicial de 10^6 PV/mL) y los datos obtenidos para la recuperación del RNA usando partículas fluoro-inmunomagnéticas de acuerdo con la presente invención.

La figura 7 muestra la Electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus.

5 La figura 8 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación del RNA obtenido a partir de las pruebas de selectividad y de unión no específica a partículas fluoro-magnéticas funcionalizadas o no con el anticuerpo anti-Rotavirus

10 La figura 9 es una representación esquemática del pretratamiento de aguas crudas previo análisis con la técnica de Separación Fluoro-Inmuno-Magnética

La figura 10 corresponde a una curva de calibración realizada en muestras de agua cruda pre-tratada, esterilizada y contaminada artificialmente con diferentes
15 concentraciones de Rotateq

La figura 11 muestra la caracterización por microscopía de Fluorescencia de los Complejos micropartículas-anticuerpo después de haber sido expuestos a aguas crudas con potencial contenido de Rotavirus y Hepatitis A

20

La figura 12 corresponde a las Imágenes obtenidas con TEM empleando tinción negativa de A) Virus de la Hepatitis A (VHA) B) Rotavirus obtenidos a partir de aguas crudas

25 La figura 13 es la cuantificación del RNA viral obtenido a partir de muestras de agua cruda obtenidas a partir de 4 plantas de potabilización y sus respectivas fuentes hídricas abastecedoras empleando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética

30 La figura 14 es una electroforesis en gel de agarosa 1.8% que muestra la amplificación de una región de la proteína VP6 y VP1 específicas para Rotavirus y Virus de la Hepatitis A, respectivamente separados, concentrados y detectados usando la técnica de separación Fluoro-Inmuno-Magnética a partir de aguas crudas de 4 plantas potabilizadoras y sus respectivas fuentes de abastecimiento
35 hídrico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas, consiste en funcionalizar partículas fluoro-magnéticas, las cuales poseen en su superficie grupos aminos que permiten la unión de forma covalente a los grupos carboxilos presentes en la fracción constante (Fc) de anticuerpos específicos para diferentes tipos de virus entéricos.

La presente invención está dirigida a una técnica de detección fluoro-inmunomagnética de virus entéricos en aguas que comprende las siguientes etapas:

- a) Hacer reaccionar una solución de partículas fluoro-magnéticas con anticuerpo durante 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 33 y 37°C;
- b) Magnetizar las partículas
- c) Lavar el exceso de anticuerpo con PBS con pH 7.4.
- d) Resuspender las partículas funcionalizadas en PBS 0.15 mM y
- e) Agregar el agua con potencial contenido viral hasta completar un litro;
- f) Hacer la inmunoreacción durante un periodo entre 1 a 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante entre 120 y 150 rpm;
- g) Aplicar un campo magnético,
- h) Descartar el agua y recuperar los complejos magnetizados en PBS 0.15 mM.
- i) Caracterizar microscópica y molecularmente el complejo (micropartícula-anticuerpo-virus);

Adicionalmente, la técnica de detección fluoro- inmunomagnética de virus entéricos en aguas también puede comprender las etapas adicionales de

- j) Choque térmico a 90°C por 15 segundos a -4°C por 15 segundos de los complejos magnetizados del paso h)
- k) Centrifugar la solución del paso j) a 5000 rpm durante 15 minutos
- l) Cuantificar el RNA viral del sobrenadante.

La técnica de detección fluoro- inmunomagnética entéricos en aguas puede ser aplicada a cualquier clase de virus entéricos, como por ejemplo a adenovirus,

poliovirus, astrovirus, enterovirus, coxsackievirus, norovirus, virus Hepatitis A, reovirus y rotavirus, entre otros.

Para tal fin, se toman 250 μ L de una solución de partículas fluoro-magnéticas (0.001% p/p) y se mezclan con 250 μ L del anticuerpo (10 μ g/mL), dejándolos reaccionar durante un periodo de 30 minutos a 2 horas, de preferencia 1 hora a una temperatura entre 35 a 40°C, de preferencia 37°C. Seguidamente, las partículas son magnetizadas y el exceso de anticuerpo es lavado dos veces usando PBS 0.15 mM pH 7.4 conteniendo 0.1% de BSA y una vez con agua destilada estéril.

Posteriormente, las partículas funcionalizadas son resuspendidas en 250 μ L de PBS 0.15 mM y son depositadas a 1 Lt de agua con potencial contenido viral. La inmunoreacción se lleva a cabo durante un periodo entre 1 a 3 horas, de preferencia 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante a una velocidad de entre 80 y 150 rpm, de preferencia 120 rpm. Finalmente, un campo magnético externo es aplicado con el fin de concentrar y separar el complejo. El agua es descartada y posteriormente los complejos magnetizados son recuperados en 250 μ L PBS 0.15 mM.

50 μ L del complejo (micropartícula-anticuerpo-virus) se caracteriza a través de microscopía confocal o de fluorescencia, para comprobar el proceso de separación inmunomagnética y la formación de agregados. En caso de existir altas concentraciones de virus en la muestra analizada, se pueden apreciar la formación de agrupaciones de partículas (clústers de 20-50 partículas).

El volumen restante (200 μ L), es sometido a un choque térmico (90°C/15 segundos -4°C/15 segundos) para romper la interacción antígeno-anticuerpo y así liberar los viriones unidos a las partículas. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm/15 min y el sobrenadante se emplea para hacer extracción y cuantificación del RNA viral y de esta forma confirmar la presencia del virus. El pellet conteniendo las micropartículas es colectado y reutilizado para otros ensayos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN MUESTRAS DE AGUA ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

OBJETIVO

Detectar Rotavirus en muestras de agua destilada estéril artificialmente contaminada, empleando la técnica de separación fluoro-inmuno-magnética.

5 METODOLOGÍA

1. Se preparó una solución 0.001% de las micropartículas magneto-fluorescentes y se funcionalizaron con el anticuerpo anti-Rotavirus (10 µg/mL) (Figura 1). Seguidamente, 500 µL de las micropartículas funcionalizadas fueron expuestas a 1 Lt de agua destilada estéril contaminada artificialmente con 1 a 10⁶ partículas virales/mL. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-inmuno-magnético como se explicó en el numeral 2 (Figura 2).
2. Para comprobar la eficiencia en la separación, se llevó a cabo una caracterización por microscopía confocal de las partículas antes, durante y después del proceso de detección viral (Figura 3).
3. Adicionalmente, para verificar si la formación de agrupaciones en las partículas eran inducidas por la presencia de virus, se llevaron a cabo análisis adicionales de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y microscopía electrónica (TEM) (Figura 4-5).
4. La interacción antígeno-anticuerpo se rompió aplicando choque térmico (90°C/15 segundos-4°C/15 segundos). Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm/15 minutos para facilitar la recuperación de los virus y la precipitación de las partículas fluoro-magnéticas.
5. A los virus recuperados se les realizó extracción y cuantificación de RNA. Los resultados fueron comparados con una curva patrón obtenido a partir del RNA obtenido directamente de la vacuna Rotateq diluida seriadamente a las concentraciones trabajadas (Figura 6).
6. El RNA extraído fue denaturado a 95 °C por 5 min y colocado inmediatamente en hielo por 5 min adicionales previo a llevar a cabo la RT-PCR OneStep Superscript III. El material genético amplificado fue revelado en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 7).
7. La selectividad del complejo micropartícula-anticuerpo en presencia de interferentes presentes comúnmente en el agua fue determinada. Para tal fin, se empleó una muestra de heces fecales presuntamente contaminadas con poliovirus y otros virus entéricos, provista por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS). Las micropartículas inmuno-

fluoromagnéticas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, como se describió anteriormente. Seguidamente se expusieron a 1L de agua contaminada las heces del paciente y se realizó la inmuno-reacción. Los virus concentrados fueron separados de las partículas magnéticas y posteriormente el RNA viral fue extraído y cuantificado. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

8. De la misma forma, se comprobó la posible absorción no específica al complejo micropartícula-anticuerpo. Para tal fin se tomaron micropartículas fluoro-magnéticas sin funcionalizar, es decir, sin el anticuerpo y se depositaron a 1L de agua previamente contaminada con Rotateq (i.e. 10^6 PV/mL). La muestra fue magnetizada, lavada con agua PBS y agua destilada estéril. Posteriormente se aplicó choque térmico a fin de separar los virus unidos y se realizó extracción de RNA. La presencia de interferentes se confirmó empleando RT-PCR OneStep Superscript III y se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1,8 % (Figura 8). El corrido electroforético se llevó a cabo por triplicado.

RESULTADOS

En la figura 3A se aprecian las partículas magnéticas antes del proceso de funcionalización. Se puede evidenciar que las partículas se encuentran dispersas en el medio. Esto se debe a la repulsión electrostática que se genera por la carga positiva de los grupos aminos presentes en la superficie de las partículas. En la figura 3B, se aprecian las partículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus. Puede observarse pequeños agregados de partículas (2 ó 3 partículas) debido a la diferencia de cargas de los aminoácidos que componen el anticuerpo. Finalmente, en la figura 3C, se observa la formación de grandes agrupaciones (grupos de 5 a +30 partículas) como consecuencia de la exposición de las partículas a altas concentraciones del virus (10^6 partículas Rotateq/mL). La presencia del virus hace que las partículas se autoensamblen, generando agrupaciones (clústers) que varían de tamaño en función de la cantidad de virus presentes en la muestra. Este evento ha sido previamente descrito por Perez JM y colaboradores (Perez JM et al, 2003).

Para confirmar que la formación de agregados era mediada por virus, se llevó a cabo la caracterización a través de Microscopía de Fuerza Atómica. A través de esta técnica se determinó un diámetro inicial de las micropartículas de 562 nm (Figura 4A), lo cual se corresponde con la ficha técnica del producto. Una vez las micropartículas fueron funcionalizadas con el anticuerpo anti-Rotavirus, su diámetro aumentó aproximadamente en 10 nm (Figura 4C). La altura de una IgG es de 12 nm en posición vertical, esto significa, con la región Fab apuntando al analito. No obstante, debido al mecanismo de absorción sobre los grupos aminos, se pueden presentar rotación de la biomolécula permitiendo movimientos rotacionales (Tronin, A. et al., 1995) que generan variaciones en los valores (i.e. desde 10 nm a 12 nm).

Después de que las partículas funcionalizadas fueron expuestas al virus incrementaron significativamente su diámetro. La figura 4B muestra que una partícula viral de Rotavirus, alcanza un diámetro promedio de 100 nm, mientras que en la figura 5D puede evidenciarse la formación de un cúmulo de virus adsorbido a la superficie de las partículas funcionalizadas. Allí los virus son detectados a través de la interacción antígeno-anticuerpo mediada por fuerzas supramoleculares.

Muestras de la misma naturaleza fueron caracterizadas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de visualizar mejor el complejo y comprobar la presencia de los virus. En la figura 5, puede apreciarse la morfología de una partícula magnética, de una partícula de Rotavirus y del complejo partícula-anticuerpo-virus, confirmando así los hallazgos obtenidos a través de la caracterización con AFM.

La caracterización molecular permitió confirmar la presencia de Rotavirus. La figura 6 muestra la curva de calibrado empleando un stock de Rotateq a diferentes concentraciones (i.e. 10 a 10^6 partículas virales) y el RNA recuperado de los mismos stocks diluidos en 1 Lt de agua empleando las micropartículas fluoro-inmuno-magnéticas. Se puede apreciar que a mayor contenido viral mayor cantidad de RNA viral en las muestras. De acuerdo a los resultados, estadísticamente el modelo que más se ajusta con respecto a los datos presentados fue el de regresión lineal con una $R^2=0.89$. En el intervalo $0,8 \leq R^2 <$

0,9 se dice que existe una correlación aceptable, resaltando que este modelo se ajusta para esta patente en el intervalo de $9,5 \leq \text{RNA} \leq \infty$.

De igual forma, se puede apreciar en la gráfica, que los virus diluidos en 1 Lt de agua son eficientemente separados y concentrados, con porcentajes de recuperación promedio de 80.68 %. Lo anterior indica que en muestras de agua potable o pura existen muy pocos interferentes capaces de reducir la detección viral.

Además, se quiso comprobar que el RNA extraído, efectivamente perteneciera a Rotavirus y no a posibles interferentes de la matriz absorbidos de forma no específica a las partículas. De esta forma se procedió a amplificar y revelar el material genético. La figura 8 muestra el marcador de peso molecular, un control negativo (C-) y el control positivo (C+) correspondientes al segmento de 211 pb de la proteína de cápside VP6. Los pozos 7, 8 y 9 muestran las bandas obtenidas para 10PV, 10^3 PV y 10^6 PV de Rotateq diluidos en 1 litro de agua, separados y concentrados por separación fluoro-inmunomagnética mientras que los pozos 12 al 14, muestran las bandas obtenidas para las mismas concentraciones virales hechas concentradas por ultrafiltración tangencial (UFT) como método de referencia. Los resultados permitieron evidenciar que la técnica de Separación Fluoro-inmuno-magnética es tan efectiva como la UFT en la concentración viral. Además presenta la gran ventaja de requerir solo 2 horas para hacer la concentración del virus y de no necesitar pasos posteriores de cultivo celular para determinar la infectividad de las partículas virales detectadas.

En cuanto a la prueba de selectividad, se logró hacer la concentración y separación de partículas virales. Al realizar la extracción de material genético se obtuvo un total de 17.9 ng/ μ l de RNA viral. Este mismo fue amplificado y revelado. Las bandas ubicadas en los pozos 1 y 2 fueron muy tenues, no obstante la ubicada en el pozo 3 del corrido electroforético, se correspondió con el segmento 211 pb de la proteína de cápside VP6. Por tanto, se pudo concluir que la muestra tomada para análisis contenía entre otros virus entéricos, la presencia de Rotavirus que hizo que el anticuerpo monoclonal lo reconociera y posteriormente, a través de la técnica empleada se pudiera concentrar, separar y detectar (Figura 8).

Finalmente, los ensayos de absorción no específica evidenciaron la alta especificidad del complejo ya que se logró cuantificar tan solo 0.6 ng/ μ L de RNA después de emplear solo las micropartículas fluoro-inmunomagnéticas sin anticuerpo y expuestas a Rotavirus. En la amplificación y revelado no se logró evidenciar la presencia de ningún virus perteneciente al género Rotavirus (Figura 8-pozos 4-6). Este ensayo mostró que en ausencia del elemento de reconocimiento (anticuerpo anti-Rotavirus) no se dan eventos de absorción inespecífica sobre el complejo, lo cual puede atribuirse al uso del buffer de bloqueo empleado al cual se le adicionó BSA.

Ejemplo 2: DETECCIÓN DE ROTAVIRUS Y HEPATITIS A EN MUESTRAS DE AGUA CRUDA PROVENIENTE DE 4 PLANTAS DE POTABILIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO NORTE DE SANTANDER

OBJETIVO

Determinar la eficiencia de la técnica de separación fluoro-inmunomagnética en la detección de virus entéricos en matrices complejas.

METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRAS-PRETRATAMIENTO

Se realizó muestreo compuesto de aguas crudas provenientes de cuatro plantas de tratamiento ubicadas en el departamento Norte de Santander, tanto en la etapa de captación así como de la fuente de procedencia (Río Pamplonita y Río Zulia).

Las muestras fueron recogidas en frascos de vidrio estériles y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. Debido a la naturaleza de la muestra (aguas crudas con altas concentraciones de materia orgánica), se realizó un pretratamiento que consistió en realizar dos procesos sucesivos de filtración de material grosero empleando algodón y posteriormente una centrifugación a 3500 rpm/10 minutos como se muestra en la figura 9.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Una muestra de agua compuesta, obtenida a partir de la mezcla de 250 mL de agua cruda pre-tratada de cada una de las plantas fue esterilizada con calor húmedo a 121°C/15 min con el fin de eliminar posible presencia de contaminantes biológicos y virológicos. Las muestras de agua fueron contaminadas artificialmente

con 1 a 10^6 partículas virales/mL de Rotateq con el fin de realizar una curva de calibración que se comparó con el stock del virus sin diluir en agua cruda pretratada y determinar así los porcentajes de recuperación viral en matrices complejas. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de separación fluoro-
5 inmuno-magnético y caracterización molecular como se explicó en el numeral 2.

ENSAYOS DIRECTOS EN AGUAS CRUDAS

Se tomaron muestras de 1 Lt de agua proveniente de cada planta de potabilización así como de su fuente de procedencia, se filtraron (con papel filtro y
10 algodón), se centrifugaron y se le adicionaron micropartículas fluoro-magnéticas con anticuerpos monoclonales anti-Rotavirus y anti-Hepatitis siguiendo los mismos pasos explicados en el numeral 2. La inmunoreacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el numeral 2 al igual que la concentración y la separación fluoro-inmuno-magnética. Los complejos fueron caracterizados por microscopía de
15 fluorescencia para determinar la presencia de clusters. Además, la presencia de los virus fue evidenciada a través de microscopía electrónica y mediante caracterización molecular, realizando la extracción, cuantificación, amplificación y revelado por electroforesis de las partículas virales.

20 RESULTADOS

La contaminación artificial y posterior separación, concentración y detección viral se llevó a cabo con éxito. Se puede apreciar en la figura 10 los valores obtenidos para la extracción de RNA viral a partir de aguas crudas y comparados con el patrón. Estadísticamente los datos fueron ajustados a través del modelo de
25 regresión lineal donde se obtuvo un $R^2=0.923$, lo que indica que se encuentra en el intervalo $0,9 \leq R^2 < 1$, para una correlación excelente entre los datos.

Se pudo establecer que debido a la naturaleza compleja de la muestra, el nivel de sensibilidad de las partículas fluoro-inmuno-magnéticas disminuye en promedio un
30 36.51% con respecto a los ensayos realizados en agua destilada estéril y presentados en el ejemplo 1 (Figura 6). No obstante, el porcentaje de virus recuperados es de 44,17% el cual se encuentra por encima de otros estudios tales como el reportado por Haramoto E, en el que detectaron Norovirus humanos en muestras de agua de río empleando procesos de absorción-elución con filtro
35 electronegativos obteniendo porcentajes de recuperación del 15% (Haramoto E et al, 2009), mientras que el reportado por Fumian et al, solo alcanzó un 3.5 % en la

misma matriz usando un método similar (Fumian et al, 2010). Comparando directamente con otros estudios en el que emplearon separación inmunomagnética (IMS), Ha J et al, reporta la recuperación c el virus de la Hepatitis A y Norovirus a partir de alimentos mínimamente procesados alcanzando
5 niveles promedio de 6.2 % y 8.5 %, respectivamente (Ha J et al, 2014). Para la técnica que se ha desarrollado, los niveles de sensibilidad alcanzada son debidos probablemente a la eficiencia del pretratamiento aplicado a las muestras antes de ser aplicado el complejo micropartícula-anticuerpo y la correcta absorción del mismo a las partículas. Ya que asegurando que los anticuerpos tengan los dos
10 sitios de unión al antígeno orientados en la posición adecuada se aumenta la sensibilidad en la detección.

La caracterización por microscopía de fluorescencia de los complejos virales tanto con Rotavirus como con Hepatitis A en las muestras de agua provenientes de las
15 4 plantas de potabilización del departamento, permitió evidenciar la presencia de clúster en todos los casos (Figura 11A-B).

Posteriormente, se rompió la interacción antígeno-anticuerpo para facilitar la liberación de las partículas virales, la cuales fueron caracterizadas a través de
20 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) (Figura 12). El virus de la hepatitis A (VHA) comparte los rasgos morfológicos y estructurales básicos de otros grupos de la familia, como los enterovirus. Estructuralmente es circular, no envuelto con un tamaño de aproximadamente 30 nm de diámetro (Figura 12A). De otra parte, Rotavirus es un virus que presenta cápside icosaédrica, no envuelto de 50 a 65
25 nm de diámetro rodeada por una capa doble que confiere al virus aspecto de rueda, de ahí el nombre rotavirus. La triple capa proteica hace que el virus tenga un diámetro total de unos 80 nm de diámetro (Figura 12B).

Además, se realizó extracción y cuantificación de RNA viral de los dos virus y para
30 el caso de Rotavirus, los datos obtenidos se reemplazaron en la ecuación de la recta presentada en la figura 10. Se pudo determinar que este virus se encuentra en una concentración que oscila entre 6×10^5 PV/mL hasta $1,35 \times 10^6$ PV/mL en las diferentes muestras de aguas crudas analizadas provenientes de las 4 plantas de tratamiento analizadas incluyendo sus fuentes de abastecimiento.

El material genético fue amplificado y revelado en el Instituto Nacional de Salud, quienes confirmaron la presencia de los dos virus entéricos en las muestras analizadas. Las figuras 12 y 13 muestran las bandas correspondientes a un segmento de la proteína VP6 presente en la cápside de Rotavirus y de un
5 segmento de 192 pb correspondientes a la una región entre VP1 y 2A presentes en la cápside del VHA. Estos hallazgos permitieron comprobar la eficiencia de la técnica a la hora de detectar partículas virales en matrices complejas.

El VHA es un virus altamente contagioso que presenta dosis infectivas bajas. Este
10 es un virus entérico exhibe su tropismo por las células epiteliales de aparato digestivo, de donde se desplaza a través del torrente sanguíneo al hígado, órgano afectado responsable de producir la conocida "Hepatitis infecciosa". Los anticuerpos monoclonales acopladas a las partículas magnéticas, permitieron el reconocimiento del antígeno VP1 presente en la cápside viral, lo que facilitó su
15 concentración, separación y posterior detección en muestras de agua procedentes de la etapa de captación de 3 de las 4 plantas de potabilización analizadas (CAR, MON y POR) y en el agua proveniente del río Zulia, fuente hídrica que abastece de agua a una de las plantas estudiadas.

En el caso del género *Rotavirus* este se encuentra dividido en siete grupos
20 serológicos que van desde el A al G, los cuales a su vez presentan varios subgrupos. El grupo A al C son patógenos para humanos, mientras que los restantes tienen más afinidad por animales. El grupo A es el más patógeno y frecuente en humanos. A través de la técnica de separación fluoro-
25 inmunomagnética, se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para la detectar el epítipo VP6 en la cápside viral de Rotavirus del grupo A. Los análisis realizados permitieron identificar su presencia en todas las fuentes de captación de las 4 plantas de potabilización analizadas y en las muestras de agua provenientes de los ríos Pamplonita y Zulia. Este hallazgo sin duda, genera un
30 potencial riesgo para la salud pública de la población que emplea este tipo de aguas para recreación, riego e incluso consumo sin tratamientos adecuados de desinfección. La razón radica en el hecho de que este virus presenta una estructura morfológica basada en una triple capa protéica, lo que hace que sea catalogado como un virus altamente resistente a los procesos de cloración del
35 agua en comparación con otros virus entéricos (OMS-Guías para la calidad del agua potable). Por tanto, procesos deficientes de desinfección del agua podrían

permitir que el virus llegara a los consumidores a través de agua que puede estar desde el punto de vista bacteriológico, apta para el consumo humano.

5 **CONCLUSIÓN**

Se puede concluir que la técnica fluoro-inmunomagnética desarrollada permite la detección de Rotavirus, Hepatitis A y cualquier otro tipo de virus entérico, en muestras de agua estéril contaminada artificialmente así como en matrices complejas tales como aguas crudas. La técnica presenta unas características de realización interesantes (Tabla 1), que la hacen atractiva para su aplicación en la detección de cualquier patógeno que se encuentre diluído en agua incluyendo quistes de parásitos como *Giardia*.

REFERENCIAS

- 15 Alavandi, S., Bharathi AR., Kumar S., Dineshkumar N., Saravanakumar C., Rajan JS. Tangential flow ultrafiltration for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp pond water. *Journal of Virological Methods*. 2015. 218: 7-13
- Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Girones R. Detection and quantification of classic and emergin viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Research*. 2013. 47: 1797-2810
- 20 Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *Journal of Virology Methods*. 2010. 170(1-2):42-6.
- 25 Ha, JH, Choi, C., Ha, SD. Evaluation of Immunomagnetic Separation Method for the Recovery of Hepatitis A Virus and GI.1 and GII.4 Norovirus Strains Seeded on Oyster and Mussel. *Food and Environmental Virology*. 2014. 6:290-296.
- Haramoto E., Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research*. 2010. 44:1747–1752.
- 30 Hamzaa I, Jurzik L, Überlab K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011. 214: 424– 436.

Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G and Rose JB. Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. *Pathogens*. 2015. 4: 229-255.

Lee JH, Cheol G., Kimc JI., Yic HA, Lee CH. Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for the detection of enteric viruses. *Journal of Virological Methods*. 2013. 191: 16– 23.

Mortaza I. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry*. 51 2013. 51–70.

Negrete, A., Pai, A., Shiloach, J. Use of hollow fiber tangential flow filtration for the recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods*. 2014. 195: 240–246.

Peláez D, Rodríguez JA, Rocha EL, Rey GJ. Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica*. 2010.30:2

Peláez D, Guzmán BL, Rodríguez J, Acero F, Nava G. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. *Biomédica*. 2016: 36:169-78.

Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, Josephson L, Weissleder R. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *Journal of Analytical Chemistry Society*. 2003. 125, 10192-10193.

Tronin, A., Dubrovsky, T., Nicolini, C. Comparative Study of Langmuir Monolayers of Immunoglobulin G Formed at the Air-Water Interface and Covalently Immobilized on Solid Supports. *Langmuir*. 1995. 11, 385–389.

Villamizar R, 2009. Biosensors base on carbón nanotube field effect transistors for detecting pathogenic microorganisms. Universitat Rovira I Virgili. ISBN:978-84-692-9761-2/DL:T-203-2010. Disponible en www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9037/Villamizar.pdf

Yang W, Gu AZ, Zeng SY, Li D, He M, Shi HC. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2011. 84:447–453

Organización Mundial de la Salud OMS 206. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. ISBN 92 4 154696 4. Disponible en: www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3rev/es

Tabla 1. Parámetros de realización de la técnica

PARÁMETRO DE REALIZACIÓN	RESULTADO
Tiempo de Detección	2 horas
Sensibilidad	>80 %
Límite de Detección	10 partículas virales/1L agua crudas o potables
Sencillez	El procedimiento de funcionalización de la partícula magnética y de concentración de virus a partir de la muestra de agua se da en dos pasos y no requiere de ligandos químicos
Selectividad	Se detecta un solo grupo de virus debido al uso de anticuerpos monoclonales y estos mismos facilitan la detección de partículas virales completas infectivas, por lo cual no se hace necesario técnicas adicionales de detección
Costo	Se puede hacer producción en masa de anticuerpos policlonales en modelos murinos para disminuir costos