

# Evaluación de Sistemas de Microbial Source Tracking (MST) Independiente de Librerías y Cultivo, Aplicables en la Determinación del Origen de Eventos de Contaminación Fecal de Fuentes de Agua Potable en el Uruguay

Rey, F.<sup>1</sup>, Boccardi, L.<sup>1</sup>, Pereiro, M.<sup>2</sup>, Miguez, D.<sup>1</sup> & Ureta, A.<sup>1-3\*</sup>

1: Gerencia I+D+i Laboratorio Tecnológico del Uruguay, / Fundación LATI tud, Montevideo, Uruguay.  
 2: Laboratorio Regional SurEste, Obras Sanitarias del Estado, Maldonado, Uruguay.  
 3: Gerencia de Agua Potable, Obras Sanitarias del Estado, Montevideo, Uruguay.  
 \* dirección para correspondencia: aureta@gmail.com

## Introducción

El aseguramiento de la calidad microbiológica del agua potable depende en gran medida de las políticas de prevención, control y mitigación de potenciales eventos de contaminación fecal de las aguas ambientales empleadas como materia prima del proceso de potabilización. Para evaluar el riesgo así como para optimizar las respuestas destinadas a prevenir, controlar o mitigar dichos eventos es deseable contar con herramientas que permitan evaluar y discriminar entre su origen humano o animal. Con el objetivo de implementar el uso de estas herramientas en nuestro país, en este trabajo hemos evaluado la performance de sistemas de PCR de tiempo final y tiempo real previamente descritos (Referencias) que emplean blancos correspondientes a clusters Bacteroidales humanos o ruminantes así como al ADN mitocondrial de humanos, bovinos, ovinos y porcinos como sistemas.

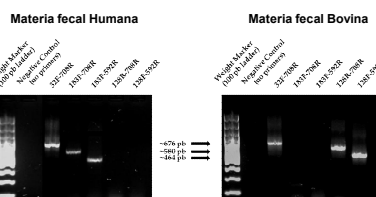
## Resultados

## Métodos

Matrices analizadas, extracción y purificación de ADN			
Matrices	Cantidad y Mecanismo de Procesamiento	Extracción de ADN	Purificación de ADN
Materia Fecal	0.5 g	Buffer CTAB	DNEasy (Qiagen)
Afluentes Residuales Domésticos	100 ml (Filtración)	Buffer CTAB	DNEasy (Qiagen)
Agua Superficial	1000 ml (Filtración)	Buffer CTAB	DNEasy (Qiagen)

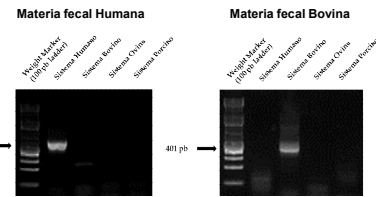
Sistemas de PCR empleados (Las figuras indican los sistemas ensayados)				
	Mitocondrial (Tiempo Final)	Bacteroidales (Tiempo Final)	Bacteroidales (Tiempo Real)	Escherichia coli (Tiempo Real)
Humano	Humito2-GID - Humito11-GID	Universal	32F-708R	Universal
Bovino	Bomito2-GID - Bomito12-GID	Humano	183F-708R / 183F-592R	qHae-969F-728R (SYBR Green)
Ovino	Ovito2-GID - Ovito12-GID	Ruminante	128F-708R / 128F-592R	HF183 TaqMan
Porcino	Pomito2-GID - Pomito14-GID			uaf1939b/ua2105b (SYBR Green)

### Especificidad de Sistemas de PCR de tiempo final para Bacteroidales



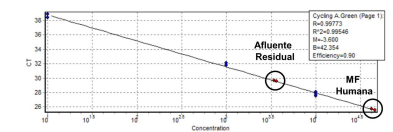
Grupo	Sistemas de PCR para Bacteroidales				
	32F-708R (Universal)	128F-708R (Humano)	128F-592R (Humano)	183F-708R (Ruminante)	183F-592R (Ruminante)
Humano	+	+	+	+	+
Bovino	+	-	-	-	-
Ovino	+	-	-	+	+
Porcino	+	-	-	-	-

### Especificidad de Sistemas de PCR de tiempo final para ADN Mitocondrial



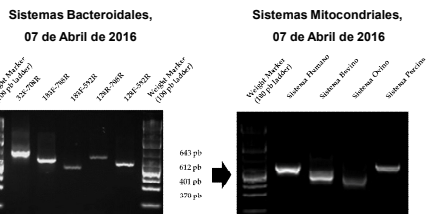
Grupo	Sistemas de PCR Mitocondrial			
	Humano	Bovino	Ovino	Porcino
Humano	+	-	-	-
Bovino	-	+	-	-
Ovino	-	-	+	-
Porcino	-	-	-	+

### Performance del Sistemas de QPCR para Bacteroidales Humanos (HF183 TaqMan) (Curva Standard - Cuantificación Relativa)



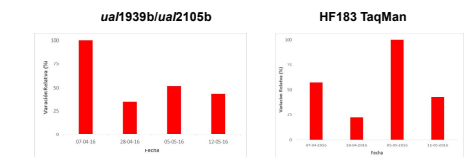
Matriz	Sistemas de PCR HF183 TaqMan
Materia Fecal Humana	+
Materia Fecal Bovina	-
Afluente Residual	+

## Seguimiento de Marcadores Bacteroidales y Mitocondriales en Afluentes Residuales Domésticos

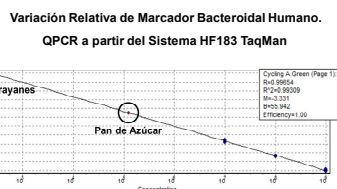


Fecha	Sistemas de PCR para Bacteroidales				Sistemas de PCR Mitocondrial			
	32F-708R (Universal)	183F-708R (Humano)	183F-592R (Humano)	128F-708R (Ruminante)	Humano	Bovino	Ovino	Porcino
07/04/16	+	+	+	+	+	+	+	+
08/04/16	+	+	+	+	+	+	+	+
14/04/16	+	+	+	+	+	+	+	+

Variación Relativa de *Escherichia coli* y Marcador Bacteroidal Humano. QPCR a partir de los sistemas *ua1939b/ua2105b* ( $R^2=0.99$ ,  $E=0.90$ ) y HF183 TaqMan ( $R^2=0.99$ ,  $E=0.99$ ) respectivamente. (Muestras No Compuestas)

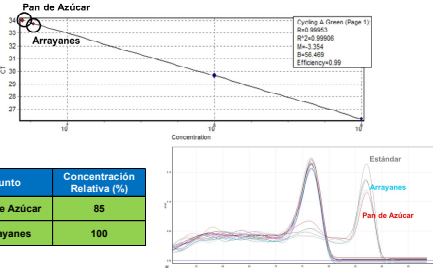


## Seguimiento de Marcadores Bacteroidales Humanos y Escherichia coli en Aguas Superficiales



Punto	Concentración Relativa (%)
Pan de Azúcar	100
Arrayanes	0.2

Variación Relativa de *E. coli*. QPCR a partir del Sistema *ua1939b/ua2105b*



Punto	Concentración Relativa (%)
Pan de Azúcar	85
Arrayanes	100

## Conclusiones

- La performance de los sistemas de PCR de tiempo final y tiempo real aquí mostrados permitirían su empleo para determinar el origen de potenciales eventos de contaminación fecal en aguas ambientales de nuestro país.
- En este sentido, mientras que los sistemas de PCR de tiempo final evaluados pueden emplearse como método de screening de fuentes de agua potable (ej. aguas subterráneas), los sistemas de PCR de tiempo real presentados pueden ser empleados en el seguimiento y control de eventos de contaminación fecal de aguas ambientales.

## Referencias

Boehm, A. B., L. C. Van De Werfhorst, J. F. Griffith, P. A. Holden, J. A. Jay, O. C. Shanks, D. Wang and S. B. Weisberg (2013). "Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study." *Water Res* 47(18): 6812-6828.

Kortbeek, R., A. Lucas, M. Imbeau, P. Payment and R. Vilemz (2009). "Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine and porcine in fecal-contaminated surface water." *Water Res* 43(17): 2002-2010.

Liu, R., C. F. Chen, C. H. Lun and S. C. Lau (2012). "Improving the performance of an end-point PCR assay commonly used for the detection of Bacteroidales pertaining to cow feces." *Appl Microbiol Biotechnol* 93(4): 1703-1713.

Maheux, A. F., F. J. Picard, M. Bossinot, L. Bissonnette, S. Paradis and M. G. Bergeron (2009). "Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/Shigella in water samples." *Water Res* 43(12): 3019-3028.

Vilemz, R., M. Imbeau, M. N. Vuong, L. Masson and P. Payment (2015). "An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers." *Water Res* 69: 143-153.

## Agradecimientos

Este trabajo se enmarca en el Programa Aguas del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y en el Convenio de colaboración correspondiente entre el LATU y la empresa Obras Sanitarias del Estado (OSE) del Uruguay.