



**SECCIÓN
VIROLOGÍA**
FCIEN | UDELAR



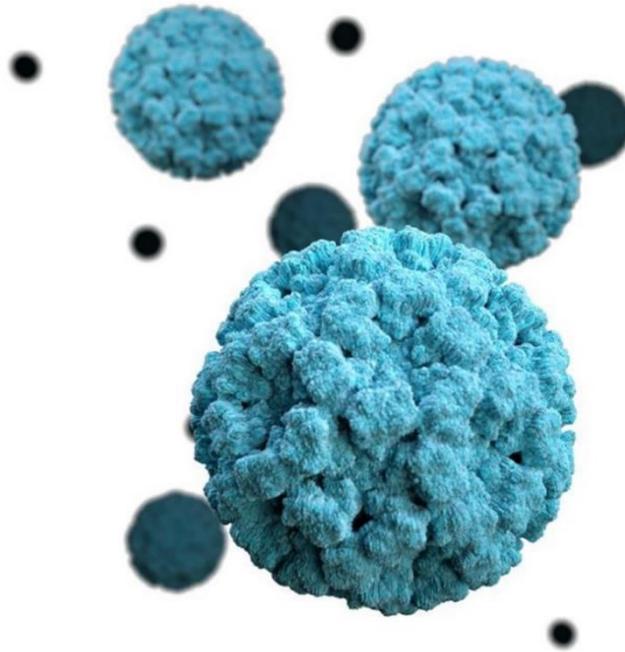
**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

Detección molecular de Norovirus a partir de muestras clínicas y ambientales en Montevideo

Santiago Cuevas Ferrer



Tesina de Grado Licenciatura en Biología Humana

Orientadora: Dra. Mabel Berois

Sección Virología, Facultad de Ciencias

Montevideo 2023

Agradecimientos

A mi tutora, Mabel Berois, quiero agradecerle por su orientación experta, su confianza y su constante apoyo a lo largo de este proceso. Sus consejos y conocimientos fueron fundamentales en la realización de este estudio.

A las instituciones que colaboraron en la búsqueda y gestión de muestras. Al Hospital Central de las Fuerzas Armadas, en particular a la Dra. Daniela Sandín, por su valiosa colaboración en la obtención de muestras clínicas. Asimismo, a la División Saneamiento de la Intendencia de Montevideo, que a través de la Unidad Operación y Disposición Final de Saneamiento brindó apoyo en coordinación y acceso para la toma de muestras de aguas residuales, en especial a Pablo Escalante, Gabriela Monestier, Nelson Ribeiro e Ignacio Ubilla. Su disposición y buena voluntad fueron fundamentales para el éxito de este proyecto.

A la sección de Virología y a todos sus miembros, quiero agradecer por abrirme las puertas y brindarme su apoyo, colaboración y buena onda, Adri, Sandra, Nati, Nati.M, German, gracias por enriquecer mis jornadas. Especialmente, agradecer a Lucia y Maby por su amistad, es muy ameno trabajar a su lado, sus discusiones y aportes enriquecieron mis investigaciones, mi experiencia académica y mi persona.

A mi familia, a mi madre, mi padre, mi hermano y a mi pareja, les agradezco profundamente por su apoyo incondicional en lo emocional, su paciencia y comprensión durante los largos períodos de trabajo y estudio. Sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

Agradezco a mis amigos y seres queridos por su apoyo, aliento y comprensión a lo largo de esta vida académica. En particular a Diego y Franco, quienes me acompañaron durante un periodo en la carrera y continuaron haciéndolo desde afuera. A Valen y Mauri, por ser excelentes personas, por acompañarme en el mundo de la virología, con nuestros propios proyectos, y por las enriquecedoras charlas de pasillo durante los tiempos de centrifugación.

Por último, quiero expresar mi gratitud a todos aquellos que, de una u otra manera, contribuyeron a la culminación de esta tesina.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTPs	Desoxirribonucleótidos 5´-triforfatados
kb	Kilobase
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
GI	Norovirus genogrupo 1
GII	Norovirus genogrupo 2
GIII	Norovirus genogrupo 3
GIV	Norovirus genogrupo 4
GV	Norovirus genogrupo 5
GVI	Norovirus genogrupo 6
GVII	Norovirus genogrupo 7
GVIII	Norovirus genogrupo 8
GIX	Norovirus genogrupo 9
GX	Norovirus genogrupo 10
H ₂ O	Agua
HBGA	Antígenos de grupo histo-sanguineo
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
NoV	Norovirus
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
RdRp	ARN polimerasa ARN dependiente
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
UV	Ultravioleta
VLP	Virus Like Particles – (Partículas del tipo viral)
xg	Fuerza centrífuga en términos de gravedad
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Celsius

Índice

Resumen.....	6
1.Introducción.....	8
1.1 Biología de Norovirus.....	9
1.1.1 Estructura y ciclo viral	9
1.1.2 Diversidad genética y evolución	12
1.1.3 Patogénesis y respuesta inmune.....	15
1.2.3 Epidemiología.....	18
1.2 Norovirus y la epidemiología basada en aguas residuales.....	22
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo General	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. Metodología	27
3.1 Muestras clínicas	27
3.2 Muestras ambientales.....	27
3.3 Concentración de partículas virales a partir de muestras ambientales	29
3.4 Extracción de ARN viral a partir de las muestras fecales y ambientales.....	29
3.4.1 Método Trizol.....	29
3.4.2 Método con Kit Comercial	29
3.5 Obtención de ADN copia a partir ARN extraído	30
3.5.1 A partir de oligonucleótidos hexaméricos aleatorios	30
3.5.2 A partir de oligonucleótidos específicos.....	30

3.6 Detección de Norovirus mediante PCR semi-anidada.....	32
3.7 Análisis de variabilidad genética de Norovirus	33
3.7.1 PCR región D	33
3.7.2 PCR ORF2/ORF3.....	34
3.8 Secuenciación y análisis filogenéticos	36
4. Resultados	36
4.1 Puesta a punto de los ensayos moleculares.....	36
Puesta a punto de RT-PCR semi-anidada para detección.....	37
Puesta a punto de RT-PCR Región D.....	38
Puesta a punto de RT-PCR ORF2/ORF3	38
4.2 Detección de muestras clínicas	40
4.3 Detección de muestras ambientales	40
4.4 Análisis de variabilidad de Norovirus a partir del gen VP1	43
4.5 Análisis globalizador de secuencias	44
Discusión.....	47
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Bibliografía	55
APÉNDICE.....	68
AP.1 Muestras Clínicas	68
AP.2 Sitios de muestreo de aguas residuales	68
Estación de Bombeo Cumparsita (EC)	68
Estación Bombeo Malvín (EM).....	69

Estación Bombeo Buceo (EB).....	69
Planta Pre-Tratamiento Punta Carretas (PPC).....	69
AP.3 Muestras Ambientales	70
ANEXO.....	72
A.1 Tabla de secuencias utilizadas en análisis filogenético	72
A.2.1 Tabla adaptada de resultados de Alberti 2012.....	74
A.2.2 Gráficas adaptadas de los resultados de Alberti 2012	75

Resumen

Norovirus es uno de los principales agentes causantes de diarrea en humanos, provoca alrededor de setecientos millones de infecciones al año, afectando de manera más acentuada a niños y adultos mayores. Más recientemente, el estudio de los Norovirus apunta a la caracterización genética no solamente a partir de muestras clínicas sino también a partir de muestras ambientales donde estos virus se encuentran presente. Los Norovirus, así como otros géneros de la familia *Caliciviridae* han sido encontrados frecuentemente en muestras de varias matrices de agua. En el presente trabajo se buscó identificar y describir la presencia y circulación de Norovirus en muestras clínicas y ambientales en Montevideo, Uruguay, con el fin de evaluar una posible asociación entre ellas, y comparar los resultados con datos previamente obtenidos por el grupo. Para cumplir con este objetivo se analizaron muestras fecales provenientes de pacientes con síntomas de diarrea y muestras de aguas residuales de la costa este de Montevideo. En el caso de las muestras ambientales el procesamiento implicó una previa concentración de partículas virales mediante la precipitación con polietilenglicol. Mediante la extracción de ARN y una RT-PCR semi-anidada, cuyo blanco es una región conservada del gen de la ARN polimerasa viral, se determinó la presencia de los dos principales genogrupos de Norovirus que afectan humanos GI y GII. Para identificar los genotipos se amplificó por PCR y secuenció una región hipervariable de la proteína de cápside del virus, seguido de los correspondientes análisis filogenéticos. Se logró la detección viral tanto en muestras ambientales como clínicas. Los resultados de la única muestra clínica positiva obtenida específicamente para este estudio sugieren una coinfección con ambos genogrupos. En aguas residuales se logró detectar Norovirus GII y GI en el 100% y 40% de las muestras respectivamente, con confirmación de algunas muestras al azar mediante secuenciación. En el análisis filogenético del gen de la ARN polimerasa viral se observó que las muestras GII seleccionadas presentaban asociaciones con las variantes GII.P6 y GII.P7. En el caso de las muestras GI, se asociaron con la variante GI.P3. En conclusión, el análisis de muestras clínicas y ambientales reveló la presencia y diversidad de Norovirus en

Montevideo, Uruguay. Además, la alta disponibilidad de muestras de aguas residuales, en contraste con las limitaciones en la gestión y obtención de muestras clínicas, resalta la utilidad del monitoreo a través de esta matriz ambiental como una herramienta valiosa para la vigilancia epidemiológica.

1.Introducción

La vigilancia basada en aguas residuales, aunque anteriormente subutilizada, ahora se integra estrechamente en el concepto de "Una Única Salud" (One Health), que reconoce la conexión entre la salud humana, animal y el entorno compartido. Los microorganismos patógenos liberados regularmente a través de las heces y la orina y que permanecen estables en aguas residuales son objetos de estudio valiosos para su monitoreo. Además, la detección de virus en muestras ambientales puede relacionarse directamente con las excreciones virales de humanos o animales (Diamond et al., 2022; O'Brien & Xagorarakis, 2019).

A diferencia de la epidemiología clínica con sus limitaciones, como la baja cobertura diagnóstica y costos elevados, el enfoque basado en aguas residuales no solo complementa los estudios clínicos, sino que también aborda desafíos importantes en términos de explorar la epidemiología en aguas residuales facilitando la identificación de enfermedades epidemiológicas, la detección de posibles brotes a nivel poblacional y la evaluación de las variantes en circulación. Estas contribuciones respaldan la implementación de medidas preventivas y correctivas (Huang et al., 2022).

Durante la pandemia de SARS-CoV-2, el monitoreo de aguas residuales se reveló como una herramienta valiosa al proporcionar datos epidemiológicos antes de que fueran detectados a nivel de población, especialmente en situaciones donde no había una cobertura diagnóstica completa (Diamond et al., 2022)

La detección molecular del Norovirus en muestras clínicas y ambientales es de suma importancia, dado que este patógeno es el principal desencadenante de brotes de gastroenteritis a nivel mundial, y actualmente no existe una vacuna disponible. La investigación de su presencia en estas muestras no solo contribuye a identificar y caracterizar posibles brotes a nivel poblacional y a evaluar las variantes en circulación, sino que también enriquece nuestro conocimiento y uso de esta nueva herramienta de vigilancia epidemiológica.

1.1 Biología de Norovirus

1.1.1 Estructura y ciclo viral

Los Norovirus (NoV) son virus pequeños de 27 a 40nm, no envueltos con simetría icosaédrica pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, género *Norovirus*. Son virus responsables de infecciones de gastroenteritis aguda en humanos con un rol prominente en brotes esporádicos y epidémicos de gastroenteritis. (Knipe & Howley, 2013)

Presentan un genoma ARN simple hebra polaridad positiva con un tamaño entre 7.3 y 8.5 kb. La Figura 1 ofrece una representación gráfica del genoma de NoV, mostrando claramente en el extremo 5´ la presencia de la proteína viral VPg unida covalentemente, mientras que el extremo 3´ se encuentra poliadenilado. Este genoma contiene tres marcos abiertos de lectura (ORFs: *Open reading frames*), ORF1 codifica una poliproteína que da lugar a seis proteínas no estructurales involucradas en la replicación viral. ORF2 codifica la proteína estructural mayor VP1, compuesta por dos dominios, el dominio de la cápside (*shell*: S) y dominio de protuberancia que se divide en dos sub dominios (P1 y P2), siendo P2 la región hipervariable. Mientras que ORF2 codifica la proteína estructural menor VP2, ambos ORFs traducidos en la región sub genómica del ARN (L. A. Ford-Siltz et al., 2021; Hardy, 2005; Knipe & Howley, 2013).

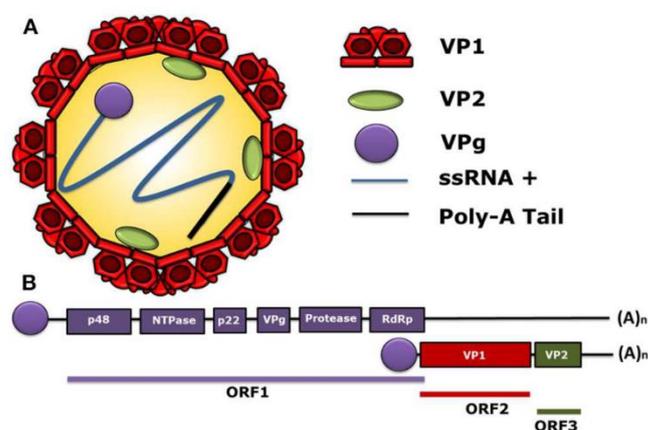


Figura 1- Esquema de estructura molecular de NoV Humano. A) Se observa una representación del virión con la proteína estructural VP1 formando la cápside. En su interior se observa una cantidad variable de la otra proteína estructural VP2. Y el genoma simple hebra RNA (+) poliadenilado y unido covalentemente a la proteína no estructural VPg. B) Un esquema general de la organización del genoma, donde está ORF1, que codifica a una poliproteína de proteínas no estructurales, seguido de ORF2 y ORF3 que codifican a las proteínas estructurales VP1 y VP2, representados en su formato sub-genómico. Imagen Adaptada de Campillay-Véliz et al., 2020

El ciclo replicativo de los NoV involucra varias etapas clave, como se muestra en la Figura 2. La etapa inicial del ciclo replicativo de un virus es el reconocimiento de receptores celulares específicos y otros componentes celulares. En el caso de los NoV humano el receptor principal aún no se conoce, se ha descrito el reconocimiento y unión a cofactores como HBGAs y sales biliares como paso previo que precede su entrada a la célula blanco (de Graaf et al., 2016; Graziano et al., 2019).

Posterior al reconocimiento virus con el o los receptores celulares ocurre la internalización de la partícula viral y posterior desnudamiento del mismo para liberar el genoma ARN al citoplasma donde ocurre el ciclo replicativo de los NoV (Campillay-Véliz et al., 2020). Existe gran diversidad de requerimientos de entrada y desnudamiento entre los *Caliciviridae*s, poco se sabe acerca de los NoV humanos, pero estudios indican que los calcivirus felinos puede entrar tanto por dependencia de clatrin o de pH, dependiendo de la acidificación endosomal para su desnudamiento. Por otro lado, los calcivirus murinos, parecen no entrar por la vía de las clatrin o caveolinas, sin dependencia de pH (Graziano et al., 2019; Knipe & Howley, 2013).

Una vez que el genoma viral ARN se encuentra disponible en el citoplasma, ocurre la interacción de la proteína VPg con factores de la iniciación de la traducción para generar el complejo de traducción mediante el reclutamiento de las subunidades ribosomales. El ORF1 es lo primero en ser traducido para formar una larga poliproteína que es procesada rápidamente por la proteasa viral NS6Pro en sitios específicos de clivado, para dar lugar a las proteínas no estructurales y esenciales para la replicación. (Campillay-Véliz et al., 2020; Knipe & Howley, 2013).

Durante la replicación, el genoma del virus ARN de polaridad positiva se transcribe a un ARN polaridad negativa, este es usado como molde para la síntesis de nuevas copias genómicas que serán integradas a las nuevas partículas virales o servirán de molde para la traducción de proteínas no estructurales, de la misma forma, la hebra complementaria ARN polaridad

negativa es utilizada para la síntesis de ARN subgenómicos que dan lugar a la producción de las proteínas estructurales VP1 y VP2 (Campillay-Véliz et al., 2020).

Por último, ocurre la formación de nuevas partículas virales y su posterior liberación, poco es conocido acerca de estos mecanismos. Sin embargo, se ha visto que el proceso de autoensamblaje de la proteína VP1 en partículas (VLPs), que comparten características morfológicas y antigénicas con los virus “*native*”, sugiere que VP1 podría desempeñar un papel fundamental en la formación de partículas infecciosas de NoV (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002). Aunque la VP1 puede autoensamblarse, se ha observado que el fragmento 3' UTR del ARN de los Norovirus Norwalk puede estimular la expresión de VP1 a través de interacciones relacionadas con el ARN y la cubierta proteica del virus (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Además, la presencia de la proteína VP2 se considera beneficiosa para la estabilidad de las partículas en formación, contribuyendo así a un proceso de ensamblaje más sólido y duradero (Pogan et al., 2018). En cuanto a la liberación de las partículas virales, hay evidencias *in-vitro* e *in-vivo* del desencadenamiento de la apoptosis de células infectadas con *Calicivirus*, y ésta podría tener un rol en la liberación (Campillay-Véliz et al., 2020; Knipe & Howley, 2013). Si bien, se suele asociar a la liberación de viriones no envueltos con la lisis celular, hay reportes de que pueden ser liberados, en células cultivadas, dentro de vesículas membranosas extracelulares, y son expulsados en las heces dentro de vesículas de origen exosomal o derivados de cuerpos multivesiculares, presentando unidades altamente virulentas para la transmisión fecal-oral (Santiana et al., 2018).

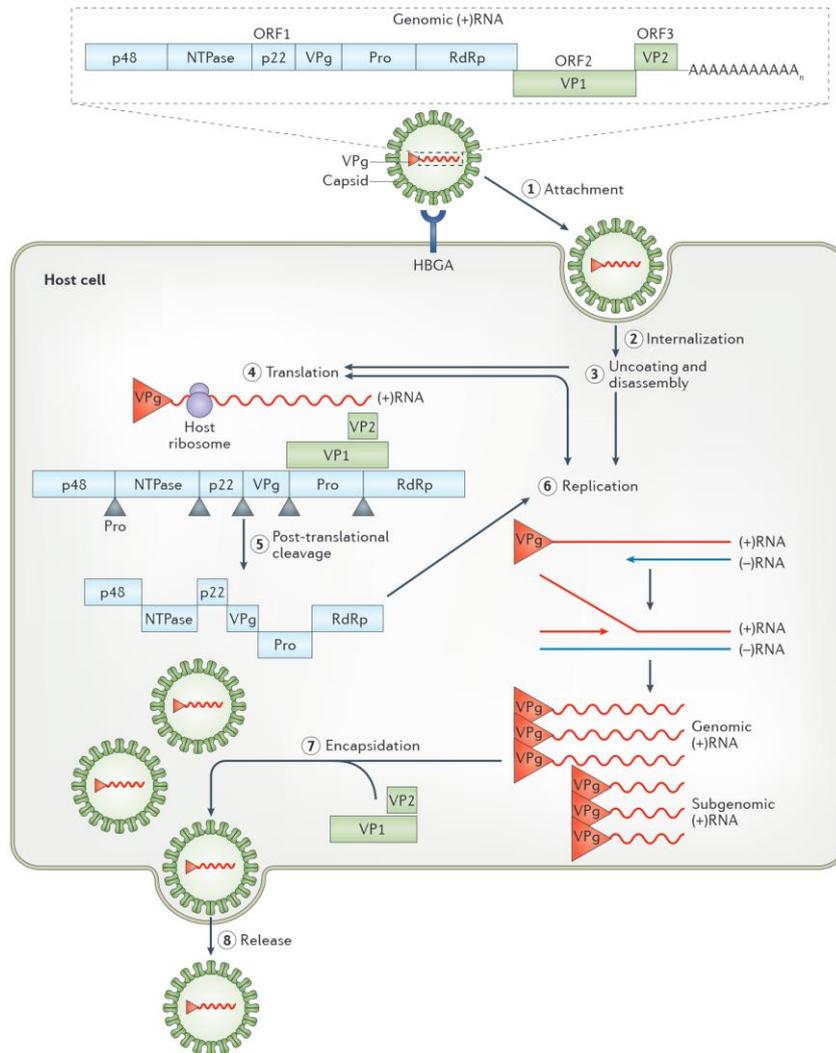


Figura 2 - Esquema del ciclo celular de Norovirus. 1. Entrada del virus. 2 y 3. Internalización y desnudamiento. 4. Traducción. 5. Clivado pos traduccional. 6. Replicación. 7. Encapsidación. 8. Liberación. Adaptada de de Graaf et al., 2016

1.1.2 Diversidad genética y evolución

Los NoV son un tipo de virus que exhibe una gran variedad genética. Se pueden clasificar en por lo menos diez genogrupos de GI a GX, mediante el análisis de secuencias de VP1 (Figura 3), a su vez estos genogrupos se pueden subclasificar en al menos 49 genotipos (Chhabra et al., 2019; Parra, 2019).

La diferencia principal entre los genogrupos y genotipos de NoV radica en el porcentaje de diferencias en la secuencia de aminoácidos. En términos generales, los genogrupos

principales difieren entre sí en un rango de aproximadamente un 40-60%, mientras que los genotipos dentro de un genogrupo presentan diferencias en el rango de aproximadamente un 20-40% (Parra, 2019).

Los genogrupos GI, GII, GIV, GVIII y GIX son los responsables de infecciones en seres humanos. Dentro del genogrupo GII, se destacan tres genotipos que también afectan a cerdos. El genogrupo GIII afecta al ganado bovino y ovino, mientras que el genogrupo GV se dirige a roedores. Los genogrupos GIV y GVI pueden infectar tanto a felinos como a caninos, mientras que GVII está compuesto exclusivamente de NoV caninos. Por último, el genogrupo GX representa una novedad al incluir nuevos NoV que se encuentran en murciélagos (Chhabra et al., 2019; Z. Wu et al., 2016).

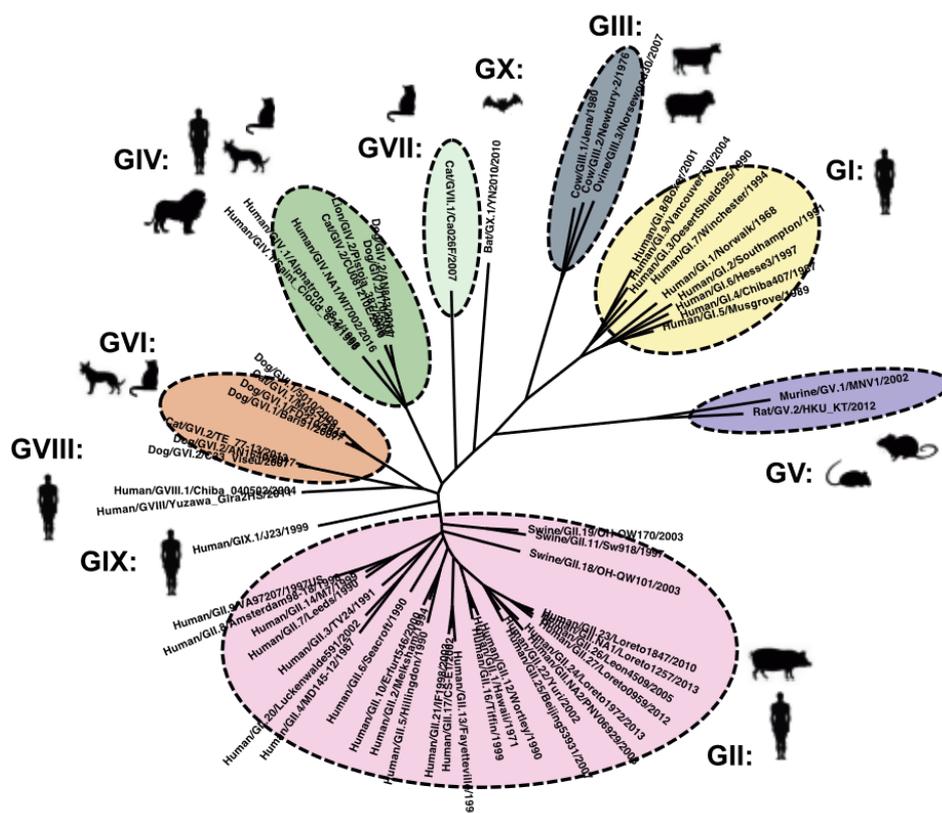


Figura 3 - Árbol filogenético de Norovirus basado en la proteína estructural VP1. Se puede observar a los 10 genogrupos englobados en diferentes colores con la representación del principal hospedador. Se utilizaron secuencias de genotipos representativos mediante el método de neighbor-joining. Imagen adaptado de Parra, 2019

Durante mucho tiempo, la clasificación de los NoV se basaba únicamente en una pequeña porción de 232 pares de bases de la ARN polimerasa ARN dependiente. Sin embargo, posteriormente se implementó una nomenclatura y un sistema de tipificación basados en la secuencia completa de VP1, lo que permitió clasificar ahora a estos virus en 10 genogrupos y dos nuevos genogrupos tentativos, en contraste con los seis genogrupos previamente conocidos (Chhabra et al., 2019). Dado que la diversidad de NoV puede ampliarse debido a la recombinación, se ha propuesto un enfoque de clasificación dual que integra la información de la RdRp en el proceso de genotipificación, conocido como P-clasificación. En este enfoque dual, se presenta primero el genotipo definido por VP1, seguido por el P-tipo, que se indica entre corchetes. Además, en el caso de aquellas variantes de NoV donde VP1 y RdRp que pertenecen a genogrupos diferentes, se agrega información adicional dentro del corchete de la siguiente manera: genogrupo.genotipo[P-grupo.P-tipo] (Chhabra et al., 2019; Kroneman et al., 2013).

La evolución de Norovirus se basa en las características de su genoma con procesos evolutivos como la deriva genética, basada en la acumulación de mutaciones puntuales y el salto genético, basado en la recombinación.

Como la mayoría de los virus de ARN, la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) es una de las principales determinantes de la diversidad genética (Deval et al., 2017). Se ha observado como la reducción de la fidelidad en la replicación de cepas pandémicas (GII.4), conlleva a una mayor tasa de mutación y velocidad de evolución viral en comparación con las cepas no pandémicas y menos detectadas (Bull et al., 2010). Sin embargo, otros estudios demuestran cómo la hiper-mutación o mutaciones espontáneas pueden significativamente contribuir a la diversidad genética y la evolución de NoV, contribuida por sustituciones U a C y A a G. Una posible mecánica subyacente detrás de estas mutaciones A a G es la ARN doble hebra adenosín desaminasa (ADAR), que edita adeninas a inosinas que luego forman pares de bases con citosinas (Cuevas et al., 2016).

Por otro lado, la recombinación es un proceso en el que se pueden generar virus quiméricos para generar nuevas recombinaciones y contribuir así a la diversidad. Se ha observado que para un genotipo en particular, GII.4, la recombinación intragenotípica es un factor impulsor de diversidad (Bull et al., 2006; Ludwig-Begall et al., 2018, 2021). Algunos genogrupos tienen la capacidad de infectar variedad de especies, sin embargo, la recombinación entre estos virus son raras, solo se han descrito casos en GIV y GVI asociado a NoV felinos y caninos (Vakulenko et al., 2023). Si bien se ha asociado la emergencia de NoV con cambios en VP1, esto ha cambiado desde hace unos años en los que se han identificado cambios en proteínas no estructurales, siendo la recombinación entre los genotipos pertenecientes al genogrupo GII los más comunes (Kendra et al., 2022), se ha identificado una región en particular, el sitio ORF1/ORF2 como un punto caliente de recombinación más común, también se han observado sitios individuales en VP1 y/o VP2 (Vakulenko et al., 2023).

1.1.3 Patogénesis y respuesta inmune

La enfermedad provocada por NoV puede afectar a todas las edades y varían desde casos leves hasta situaciones potencialmente mortales. Esta diferencia depende de características de cada hospedero, más específicamente, por factores cómo la interacción del virus con HBGAs celulares, así como la respuesta inmune y la microbiota del hospedero (de Graaf et al., 2016) y por otro lado la existencia de variantes más virulentas (Knipe & Howley, 2013).

La entrada del virus al organismo ocurre por la vía oral-fecal, ya sea por contacto directo persona-persona o el consumo de agua o comida contaminada. La estabilidad de los viriones al ácido les permite el pasaje por la vía gástrica (Knipe & Howley, 2013; Marsh et al., 2018).

El intervalo de tiempo típico en el que se desarrolla la incubación suele ser de 24 a 48 horas, y resolución de los síntomas durante las 12 a 72 horas después del inicio de la enfermedad. Es habitual la ocurrencia de brotes esporádicos, ya que una baja carga viral ya puede ser suficiente de causar una infección en una persona susceptible, aumentando la alta probabilidad de transmisión en entornos cerrados o semicerrados (Harris et al., 2010).

Las manifestaciones clínicas asociadas a una infección por NoV incluyen vómitos y diarrea con o sin fiebre y calambres estomacales. Siendo la diarrea el síntoma más frecuentemente reportado comenzando con la excreción viral a las 18 horas o más (de Graaf et al., 2016; Karst, 2010). Los síntomas derivados de una infección por NoV en humanos generalmente no duran más de dos semanas, durante ese período existen mayores niveles de excreción viral. Sin embargo, las personas sin síntomas, ya sean asintomáticas o posterior a la resolución de sus síntomas, pueden seguir excretando partículas del virus durante varias semanas, incluso a niveles considerablemente similares. Se ha observado que se puede llegar a detectar NoV en heces hasta dos meses posterior a la exposición (Karst, 2010; Teunis et al., 2015).

Algunos genotipos de NoV muestran diferencias en sus capacidades patogénicas. Por ejemplo, las cepas GII.4 suelen estar asociadas con síntomas más graves, mayores episodios de vómitos y diarrea con una duración más prolongada (Chan et al., 2006; Friesema et al., 2009; Huhti et al., 2011).

A pesar de la relevancia clínica y la carga que representan las infecciones por NoV para la sociedad, aún no se han desarrollado antivirales aprobados ni se han obtenido licencias para vacunas (Ludwig-Begall et al., 2021). Este retraso en el desarrollo se puede explicar por la amplia diversidad genotípica de NoV, la falta en su momento de un modelo de infección a nivel de cultivos celulares y en animales, y lo mucho que resta por comprender sobre la interacción del virus con la inmunidad (L. A. Ford-Siltz et al., 2021; Patel et al., 2009).

Se ha visto que la infección de NoV se puede responder tanto con la inmunidad humoral como celular. Los estudios de seroprevalencia han indicado que alrededor del 90% de las poblaciones adultas presentan seropositividad a NoV. No obstante, es probable que solo una pequeña proporción de estos anticuerpos sean neutralizantes. La variabilidad asociada con diferentes cepas en la generación de respuestas inmunitarias protectoras, la diversidad antigénica y la falta de protección cruzada entre ciertos genogrupos, genotipos y cepas, hacen

que sea más complicado determinar cuánto tiempo dura la inmunidad (Cates et al., 2020; Zhu et al., 2013).

Por otro lado, muchos de los estudios vinculados con el conocimiento de la inmunidad están asociados a estudio de respuesta con anticuerpos, por deficiencia de un buen modelo animal para estudios de la inmunidad adaptativa (Campillay-Véliz et al., 2020), hay evidencias que demuestran una respuesta inmunitaria celular específica, aumentando los niveles de diversas citoquinas, incluyendo el IFN- γ , así como las interleucinas IL-10 e IL-12p70, entre otras, durante la respuesta inmunitaria de tipo celular en individuos infectados con el NoV humano (Newman et al., 2015).

Otros estudios han evidenciado un incremento sustancial en la producción de IFN- γ en individuos desafiados con distintas cepas de NoV humano. Además, se ha observado una respuesta inmunitaria de tipo Th1 en individuos expuestos a diferentes cepas de NoV humano GI y GII, lo que sugiere la posibilidad de cierta protección cruzada (Campillay-Véliz et al., 2020; Lindesmith et al., 2010).

Tal como se ha mencionado anteriormente, la inmunidad tiene un rol importante en los patrones de reinfección, ya sea por las diferencias antigénicas de los genotipos o por los cortos periodos de la inmunidad, varios estudios han demostrado que individuos pueden ser infectados por múltiples genotipos a lo largo de la vida (Sakon et al., 2015). De esta misma forma, se evidencia una relación multifacética entre infecciones anteriores y la generación de respuestas inmunitarias cruzadas. Es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para determinar si estos virus, que están genéticamente relacionados, poseen propiedades antigénicas parecidas que podrían resultar en una mayor efectividad en la protección cruzada (L. A. Ford-Siltz et al., 2021).

Los esfuerzos de investigación se centran en el desarrollo de antivirales que puedan interferir en diferentes etapas del ciclo de replicación del virus, como la inhibición de la unión a receptores celulares y la interrupción de la proteasa viral. También se están explorando

posibles tratamientos con compuestos que actúan tanto sobre la replicación viral como sobre las defensas naturales del huésped (Netzler et al., 2019).

En cuanto a las vacunas, se busca desarrollarlas para proteger a poblaciones vulnerables, como personas inmunocomprometidas, niños y ancianos, así como a grupos de alto riesgo. Sin embargo, el desafío radica en la diversidad genética de NoV, lo que requiere la creación de vacunas multivalentes y actualizaciones periódicas para abordar las cepas en constante evolución. Además, la falta de un marcador universal de protección y la incertidumbre sobre la duración de la inmunidad después de la infección o la vacunación son obstáculos en el desarrollo de vacunas efectivas (Cates et al., 2020; L. A. Ford-Siltz et al., 2021; Ludwig-Begall et al., 2021).

A pesar de ciertos avances, los NoV humanos todavía constituyen una preocupación sin control efectivo en la actualidad, lo que subraya la importancia de seguir investigando en este campo y desarrollando iniciativas relacionadas con la epidemiología viral.

1.2.3 Epidemiología

El NoV humano es el principal agente no bacteriano causante de gastroenteritis esporádicas o epidémicas a nivel global, con un estimado de 685 millones de episodios de gastroenteritis aguda y 212.000 muertes anuales, generando a su vez billones de gastos económicos asociados con cuidados de la salud y pérdidas en producción (Bartsch et al., 2016). Estas infecciones son comunes a países desarrollados como en desarrollo, afectando a todas las clases socioeconómicas, aunque se puede encontrar una asociación con el riesgo de la adquisición y severidad de las infecciones (Lucero et al., 2021; Troeger et al., 2017).

Las principales vías de transmisión de NoV humanos son a través de contacto directo persona-persona, así como por el consumo de agua o comida contaminada.

Los viriones pueden encontrarse en aguas ambientales, ya sea por descarga directa o por efluentes no bien tratados de plantas de aguas residuales. Estos tienen la capacidad de resistir eficientemente en estos ambientes, ya que son resistentes a condiciones extremas,

como temperaturas muy bajas o muy altas, así como resistencia a la desinfección por cloro y alcohol, lo que deriva a la posibilidad de brotes (Keswick et al., 1985; Lopman et al., 2009; Lucero et al., 2021).

Los brotes epidémicos son particularmente comunes en entornos cerrados o semi-cerrados, tales como hospitales, casas de cuidados, escuelas y cruceros (Harris et al., 2010), estos brotes muestran un ciclo anual de periodicidad y dinámicas que dependen de una interacción compleja de variables, destacando los factores genéticos y ambientales (Marshall & Bruggink, 2011). A pesar de haber registros de una periodicidad anual con brotes esporádicos, otras fuentes indican ver brotes más claros en épocas de invierno y primavera (Huang et al., 2022; Kazama et al., 2017; Markt et al., 2023), posiblemente explicado por cambios en el comportamiento social así como asociaciones de una mayor actividad de NoV a menor temperatura y humedad; a su vez la persistencia en matrices ambientales se ve mejorada en estos meses debido a las bajas temperaturas y menor irradiación UV (Lopman et al., 2009; Nordgren et al., 2009).

Es importante destacar que, los genogrupos GI y GII son los dos de mayor relevancia en afecciones en humanos. Si bien en la actualidad existe un único genotipo GII.4 que ha sido el más predominante por más de 20 años, últimamente se ha reportado la cocirculación de otros genotipos que han causado amplios brotes y con predominancia en diferentes lugares geográficos (Kendra et al., 2022). En un meta-análisis de 2015 a 2020 se han detectado 31 genotipos circulantes en pacientes pediátricos, en los que se incluye el predominante GII.4, sin embargo, durante 2014 y 2017 varios brotes fueron asociados con GII.17 y GII.2. Por otro lado, otros genotipos han sido los segundos más predominantes como GII.3, GII.2 y GII.12, entre otros, como suele ocurrir los genotipos de GI son menos detectados como GI.3 y GI.4, siendo también los de menor incidencia de recombinación (Farahmand et al., 2022; Kendra et al., 2022).

Desde el primer reporte de la pandemia por GII.4 en 1996, se han identificado 5 más a lo largo de los años, Farmington Hills (2002), Hunter (2004), Den Haag (2006), New Orleans

(2009), and Sydney (2012), siendo ésta última la que ha perdurado por más tiempo como variante predominante (Pringle et al., 2015).

Inicialmente se había considerado que la predominancia de GII.4 estaba únicamente vinculado con cambios antigénicos que permiten el escape de la inmunidad. Sin embargo, se ha observado que la variante Sydney_2012 que ha circulado por más de diez años, tiene pocos cambios antigénicos en la cápside, por lo que su predominancia por un tiempo tan prolongado se podría explicar por la falta de robustez de la inmunidad contra dicha variante en adultos, facilitando la continua circulación y predominio de esta variante (Lindesmith et al., 2022; Parra et al., 2023). Por otro lado, se sugiere que puede existir un vínculo estrecho entre la emergencia de variantes de NoV con pacientes inmunocomprometidos (Yu et al., 2020).

Dado que más de la mitad de las infecciones emergentes de otros virus que afectan humanos pueden haberse originado a través de una zoonosis, es imposible no cuestionar la capacidad de transmisión interespecies de NoV. A pesar de la diversidad de genotipos de NoV, varios genogrupos comparten genotipos capaces de infectar humanos y otros mamíferos, tales como GII y GIV, por lo que el potencial para la zoonosis no está bien comprendido (L. Ford-Siltz et al., 2019). Basándose en la especificidad de VP1 para cada especie, es poco probable observar eventos de emergencia de NoV a partir de eventos zoonóticos (Parra, 2019). Si bien, hay algunas evidencias basadas en serología que podrían indicar transmisión de NoV animales a humanos, no es suficiente con estos resultados ya que no solo una infección activa podría inducir el desarrollo de anticuerpos, la exposición y la reactividad cruzada son cuestiones a tener en cuenta para declarar la transmisión. Aunque no se ha encontrado ningún NoV animal en heces humanas, en caso de que existan estos eventos serían casos aislados y poco detectables en caso de que sean asintomáticos, por esta razón se enfatiza la importancia de la vigilancia (Villabrana et al., 2019). En este mismo sentido, se argumenta la restricción de transmisión interespecies, con estudios genómicos en NoV GIV y GVI, en donde se observa como recombinantes de GIV y GVI circulan en caninos y felinos pero los GIV

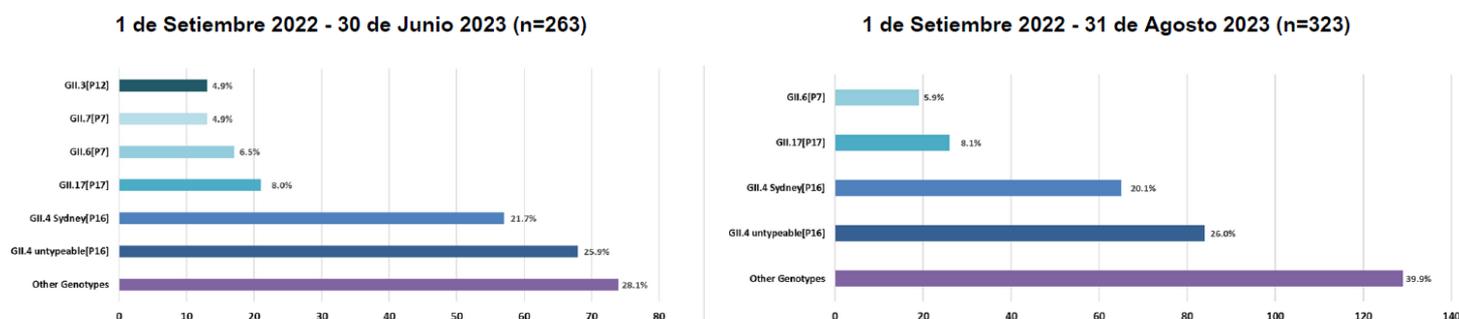
humanos se agrupan genéticamente separados de los GVI en proteínas estructurales y no estructurales (L. Ford-Siltz et al., 2019).

Por otro lado, se ha observado la presencia de NoV humanos en las muestras de materia fecal de animales, lo que podría indicar una posible zoonosis inversa. Sin embargo, es importante destacar que actualmente no existen suficientes estudios que permitan determinar si esta detección se debe a una infección activa en los animales o simplemente al consumo de material contaminado (Villabrana et al., 2019).

Desde el año 2009 se ha implementado una mejora de la vigilancia en el que se creó una red, llamada CalciNet que procura recolectar datos de brotes por NoV en EEUU, participan centros de salud federales, estatales y locales. En la Figura 4 se puede ver la distribución de brotes de genotipos de NoV en dicho país, a destacar es la impresionante variabilidad en la detección de NoV en un único país en cuestión de un par de meses, sumando un poco menos de 100 brotes cambian los porcentajes de detección de las diferentes variantes, sobre todo las minoritarias. GII.4 tiene una representación de cerca del 50% mientras que un 40% está representado por variantes que no alcanzan el 5% del total de los casos, pero da idea de la variedad de variantes circulantes. (Figura 4)

A su vez, dada la importancia clínica y epidemiológica que tienen los NoV se han desarrollado varias redes para el monitoreo de las tendencias de las variantes asociadas a los casos clínicos. NoroSurv es un portal web que pretende este cometido, y durante el 2016 a 2020, ha recolectado datos de 16 países de todos los continentes, obteniendo unas 1325 secuencias con sistema de doble genotipificación (genes RdRp y VP1) de niños menores de 5 años. Se pudo observar cómo más de la mitad de las secuencias correspondían a variantes de GII.4 Sydney de diferentes subtipos P16 y P31. Por otro lado el resto de las variantes detectadas correspondían en su mayoría a GII y en menor medida a GI, GII.2[P16], GII.3[P12], GII.6[P7] y GI.3[P3] (Cannon et al., 2021).

Distribución genotípica de brotes de NoV en Estados Unidos



La categoría de Otros Genotipos incluye genotipos de brotes que representan cada uno menos del 5% del número total de brotes. Estos genotipos son: GI.1[P1], GI.2[P2], GI.3[P3], GI.3[P13], GI.4[P4], GI.5[P4], GI.5[P5], GI.6[P6], GI.6[P11], GI.7[P7], GII.1[P33], GII.2[P16], GII.3[P12], GII.3[P25], GII.3[*Sin tipo*], GII.4 Sydney[P4], GII.4 *Sin tipo*[P4], GII.4 *Sin tipo*[*Sin tipo*], GII.6[*Sin tipo*], GII.7[P7], GII.10[P16], GII.12[P16], GII.13[P21], GII.14[P7], GII.17[P3], GII.17[P31], GIX.1[GII.P15].

Figura 4- Distribución de genotipos reportados en brotes de Estados Unidos. Se observa una actualización de la gráfica para observar las diferencias en el porcentaje de genotipos con el paso de los meses. Si bien los GII.4 siguen siendo los más predominantes, se puede observar cómo hay un cambio en la distribución de variantes minoritarias, incluidas aquellas en la categoría de *Other Genotypes*. Imagen adaptada con dos capturas de la situación del <https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html>, 2023

1.2 Norovirus y la epidemiología basada en aguas residuales

El estudio de NoV como epidemiología basada en aguas residuales se ha empleado a nivel global. La detección de NoV GI y GII en plantas de tratamiento de aguas residuales reveló tasas de presencia del 10% y 65%, respectivamente, durante los meses de invierno y otoño. Además, se observó un incremento del 25% en la presencia de NoV GI durante los meses de primavera y verano. Estos resultados indican que el comportamiento estacional del virus no sigue un patrón claro. Si bien hay reportes de su actividad en meses más fríos, estudios durante la pandemia por SARS_CoV_2 ha generado cambios comportamentales en las personas que podrían haber incidido en los niveles de detección de NoV debido a la cuarentena y medidas de aislamiento (Markt et al., 2023; Plaza-Garrido et al., 2023).

Por otro lado, el avance de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) ha ampliado las posibilidades de entender la diversidad genética de virus presentes en aguas residuales. A pesar de que los estudios de epidemiología molecular de NoV a menudo se realizan con muestras clínicas, estas pueden no ser representativas de la variante circulante en la población. En un estudio de 2016 mediante el monitoreo de aguas residuales y

utilización de tecnologías de NGS se observó la co-circulación de seis variantes no usuales, de los cuales cuatro eran recombinantes novedosos (Lun et al., 2018).

Sin embargo, son pocos los estudios que logran correlacionar los datos clínicos con los ambientales, por ello una revisión sistemática con un metaanálisis se centró en la correlación entre las aguas residuales y los brotes de gastroenteritis reportados, lo que se pudo observar es una correlación positiva entre los casos de GII detectados en aguas residuales y casos clínicos reportados, sin embargo, no se encontró correlación con GI (Huang et al., 2022). Esto se debe en gran medida a que la mayoría de los casos severos y sintomáticos están vinculados al genotipo GII.4, lo que limita la exploración de la diversidad genética de NoV en muestras clínicas (Lun et al., 2018). Por otro lado, se logró observar una distribución temporal en aguas residuales de las variantes dominantes en brotes gastroentéricos, demostrando así el potencial entre la asociación entre un seguimiento en muestreos clínicos como ambientales (Huang et al., 2022).

Referencias regionales, de Degiuseppe et al., 2020 en Argentina con resultados desde el 2013 al 2018 demuestran a partir de muestras de heces provenientes de 29 brotes de gastroenteritis aguda, NoV fue detectado en un 62,1% de los brotes (2 GI y 16 GII). Ambos brotes de GI fueron identificados del mismo genotipo, mientras que se detectaron 10 genotipos diferentes para GII, de los cuales al igual que los proyectos antes mencionados el GII.4 fueron los de mayor detección (Degiuseppe et al., 2020). Por otro lado, en Brasil, se ha detectado la circulación del genotipo GIV en muestras clínicas por antecedentes previos de dicho genotipo en aguas superficiales o no tratadas al norte del país (Fioretti et al., 2018; Teixeira et al., 2016).

En Uruguay existen estudios previos de detección de NoV en muestras clínicas y matrices ambientales, tanto planta de tratamiento de aguas residuales como recreacionales. Mediante un estudio de aguas residuales del noroeste y este del país, en las ciudades de Treinta y Tres, Melo, Fray Bentos, Salto, Paysandú y Bella Unión, se evidenció un 72% de las muestras positivas de un total de 116 muestras, ambos genogrupos fueron detectados, sin embargo,

se observó que las frecuencias de detección de GI eran menores a 50% en cinco de las seis ciudades muestreadas, mientras que GII presenta frecuencias mayores a 50%. En el mismo estudio, se identificó una alta diversidad genética presentando varios genotipos de los GI y GII, interesantemente se evidenció un reemplazo en la circulación de la variante GII.4 New Orleans 2009 por GII.4 Sydney 2012 (Victoria et al., 2016). Estudios similares evaluaron la eficiencia de remoción de virus entéricos en plantas de tratamiento de aguas residuales con metodologías de lodos activados y luz ultravioleta, se observó la detección de NoV en el afluente, así como en lodos activados, pero no se detectó NoV GII por PCR cuantitativa posterior al tratamiento con UV (Lizasoain et al., 2018).

Un trabajo más reciente, implementando la tecnología de NGS para la caracterización genética de variantes mayoritarias y minoritarias de NoV y otros virus en matrices ambientales (aguas residuales y superficiales del Río Uruguay). Se detectó NoV GI y GII en el 25% y 36% de las muestras de aguas residuales, respectivamente. Sin embargo, la detección en aguas superficiales disminuyó, a 6% para GII, sin que se detectara GI en dicha matriz. En los estudios filogenéticos, las secuencias de GII se agruparon en su mayoría con el genotipo GII.2, aunque se observaron también ejemplos de GII.4 Sydney 2012 y GII.6 (Victoria et al., 2021).

Hace más de una década, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio pionero sobre NoV en Uruguay. Este estudio fue notable por su enfoque integral, ya que se analizaron tanto muestras clínicas, provenientes de pacientes con gastroenteritis aguda, así como muestras ambientales, de aguas residuales y recreacionales. Durante el período comprendido entre 2008 y 2011, se recolectaron 230 muestras de heces de pacientes con gastroenteritis aguda en el sur de Uruguay. Los resultados revelaron que el 14,8% de estas muestras resultaron positivas para NoV, lo que indicó la circulación del virus en nuestro país por primera vez, reportando los genotipos GII.12 y GII.4. Por otro lado, el estudio de NoV a nivel ambiental, demostró altos niveles de detección en los meses de abril y mayo durante el año 2012 a partir de un muestreo realizado en puntos de la red del Sistema de Saneamiento

de Montevideo. De un total de 30 muestras se detectó NoV de genotipo GII en un 30% y GI en 3,3% (Alberti, 2012).

Es importante resaltar la relevancia de este tipo de trabajos, dado que el Norovirus representa un problema significativo de salud pública al ser el principal agente causante de gastroenteritis y carecer de tratamientos antivirales o vacunas efectivas. Su impacto en la salud pública ha sido subestimado en gran medida, a excepción de los brotes relacionados con alimentos contaminados, que requieren notificación y seguimiento riguroso (Ministerio de Salud Pública et al., 2015)

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar y analizar la presencia y distribución de Norovirus en muestras clínicas y ambientales de Montevideo

2.2 Objetivos Específicos

- Poner a punto una RT-PCR para detectar NoV en muestras clínicas y ambientales
- Implementar metodologías de laboratorio para la detección y caracterización de NoV a partir de muestras de heces y aguas residuales
- Caracterizar filogenéticamente los NoV detectados durante esta tesis
- Comparar los resultados obtenidos de detección y caracterización de NoV en esta tesis con los antecedentes de 2012

3. Metodología

3.1 Muestras clínicas

Fueron incluidas en este estudio un total de 7 muestras clínicas (Apéndice AP.1), compuestas por 4 muestras de archivo y 3 muestras actuales, específicamente colectadas para esta tesis. Las 4 muestras de archivo se seleccionaron en función de su disponibilidad en el cepario almacenado a -80°C y de los registros de positividad previa para NoV según antecedentes del grupo (Alberti, 2012). Estas muestras se utilizaron como controles positivos para el desarrollo y ajuste de las metodologías utilizadas en este estudio.

Con respecto a las muestras específicamente colectadas para esta tesis, una fue obtenida gracias a la colaboración de la Dra. Daniela Sandin del Hospital Militar (Dirección Nacional de Sanidad de las Fuerzas Armadas de Uruguay), y las otras dos se obtuvieron a partir de casos de gastroenteritis aguda que afectaron a personas cercanas al grupo de trabajo.

Por otro lado, las otras dos muestras se obtuvieron por casos cercanos de personas que presentaban síntomas de gastroenteritis aguda. Estas muestras se obtuvieron con el consentimiento informado de los mismos y se manejaron de manera anónima para respetar la privacidad.

Las muestras clínicas específicamente colectadas para esta tesis fueron obtenidas luego de recabar consentimiento informado firmado por escrito de los participantes, siendo además anonimizadas durante su procesamiento y la comunicación pública de resultados, para respetar la privacidad de los mismos.

3.2 Muestras ambientales

Las muestras de aguas residuales fueron obtenidas a partir de los vertederos próximos a la costa metropolitana de la ciudad de Montevideo, bajo la coordinación con la Unidad de Operación y Disposición Final de Saneamiento de la Intendencia de Montevideo (IM). Se realizaron 10 muestreos de enero a julio cada 15 o 20 días, cada uno de ellos con 4 muestras

de 500mL provenientes de los distintos vertederos: La Planta de Pre-tratamiento de Punta Carretas (PPC), la Estación de Bombeo La Cumparsita (EC), la Estación de Bombeo de Buceo (EB) y la Estación de Bombeo de Malvín (EM). La Figura 5 muestra las características de los sitios y su distribución geográfica. (Apéndice AP.2). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una conservadora para su inmediato procesamiento, de lo contrario fueron refrigeradas a -20°C por un máximo de 48 horas.

A



B



Figura 5 – Sitios de muestreo de aguas residuales. A) Imágenes tomadas en los diferentes sitios de muestreo, de izquierda a derecha, Emisor bombeo La Cumparsita, Planta Pre-tratamiento Punta Carretas, Emisor bombeo Buceo, Emisor bombeo Malvín. **B)** Ubicación geográfica de los vertederos situados en la costa este de Montevideo.

3.3 Concentración de partículas virales a partir de muestras ambientales

Para la concentración de partículas virales a partir de muestras ambientales se emplea la metodología de precipitación con polietilenglicol (PEG 8000) (Philipson et al., 1960).

Dicha metodología ya fue adaptada de Wu et al., 2020, y puesta a punto en comparación con otros dos métodos de concentración en el proyecto "Evaluación de una estrategia de monitoreo ambiental de SARS-COV-2 a partir de aguas residuales en dos ciudades de Uruguay" - Iniciativa UDELAR con apoyo del Espacio Interdisciplinario y OSE". En esta evaluación se utilizó virus subrogado el Coronavirus Bovino.

El procedimiento consta de una primera etapa de clarificación (volumen inicial de 50mL) en la que se centrifuga a una velocidad media (4750xg por 30 minutos a 4°C) para decantar la materia orgánica. El sobrenadante se mezcla con una proporción PEG 8000 y cloruro de sodio (NaCl), 4 g y 0.9 g respectivamente, se homogeniza, se deja incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a alta velocidad (12000xg por dos horas a 4°C). El pellet es un concentrado de virus que es reconstituido con una solución de tampón fosfato salino (PBS) para obtener un concentrado de 200 µL, que puede pasar a la extracción de ARN o congelar a -80°C.

3.4 Extracción de ARN viral a partir de las muestras fecales y ambientales

3.4.1 Método Trizol

La extracción del ARN viral con esta metodología se empleó para las muestras clínicas, para ello se realiza una suspensión al 20% de la materia fecal en PBS. A partir de allí usando TriZOL® (Invitrogen™ N°Cat. 15596018) siguiendo las indicaciones del fabricante se obtienen 60µL del RNA viral en agua ultrapura el cual es conservado a -80°C.

3.4.2 Método con Kit Comercial

Para la etapa de extracción del ARN viral a partir de los concentrados de muestras ambientales o muestras clínicas, se empleó un kit comercial, Quick-RNA™ MiniPrep Kit.

Zymo Research R1054. Para ello se comienza con un volumen de 200µL de concentrado de partículas virales o materia fecal suspendida al 20% en PBS al cual se le agrega el buffer de lisis, posterior al lisado se incorpora en las columnas correspondientes y se siguen las instrucciones del fabricante para obtener un eluido de RNA de 100µL en agua ultrapura.

3.5 Obtención de ADN copia a partir ARN extraído

A partir de la extracción de ARN total se hace una retrotranscripción (RT) utilizando la enzima Superscript II® (Invitrogen, N°Cat.18064014) para obtener cDNA. En este procedimiento se emplearon dos estrategias empleando diferentes cebadores.

3.5.1 A partir de oligonucleótidos hexaméricos aleatorios

Este procedimiento fue adaptado del procedimiento N006 de Alberti y Berois 2012 y el proporcionado por el fabricante de la enzima. Se realiza un round de RT-PCR con volumen final 20 µL. En principio se prepara un premix que contiene 8µL del ARN extraído con 1 µL de Random Hexamers 50 µM (Invitrogen™ N°Cat.N8080127), 1 µL de dNTPs (10µM) y 3 µL de dH₂O. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió en hielo durante 3 minutos.

Posteriormente, se agrega 7µL del mix de reacción que contiene: 4 µL de *5X First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL de DTT (5 mM) y 1µL de Superscript II ®. Se programó un ciclado con las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos; 42°C durante 50 minutos; 72°C durante 10 minutos.

3.5.2 A partir de oligonucleótidos específicos.

Región D

La región D es un fragmento contenido en el dominio P1 de VP1 que se encuentra expuesto en la superficie de la cápside viral. Esta región se ha seleccionado por ser suficientemente informativa de la variabilidad de Norovirus.

El mix de reacción es similar al descrito anteriormente. En este caso se utilizan los cebadores específicos para genogrupo I y II denominados Cap A y Cap C respectivamente. Los cebadores se utilizan a una concentración de 10µM y se ajusta el volumen de agua para un volumen final de 20 µL. Siguiendo el procedimiento de Vinjé et al., 2004 y los procedimientos empleados por Alberti 2012, se prepara un premix que contiene 8µL del ARN extraído con 0.6 µL de cada cebador, Cap A y Cap C (10 µM), sumado a 1 µL de dNTPs (10µM) y 2.8 µL de dH₂O. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió en hielo durante 3 minutos.

Una vez pasado los 3 minutos de incubación se le agrega el mismo mix que se emplea para la RT que consta de: 7µL del mix de reacción que contiene: 4 µL de *5X First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL de DTT (5 mM) y 1µL de *Superscript II* ®. Se programó el ciclado con las siguientes condiciones: 42°C durante 50 minutos; 72°C durante 10 minutos.

ORF2/ORF3

Las principales diferencias con la metodología de retrotranscripción con cebadores específicos de la sección anterior es la utilización de un único cebador PanGIIR1 o PanGIR1 (según se quiera amplificar GII o GI) y el cambio de la concentración del mismo a 50 µM. Para ello se adaptó un protocolo de (Debbink et al., 2013) para la amplificación de un fragmento de ORF2/ORF3. Se redujo la cantidad de ARN de 8µL a 5µL en el premix que contiene 1 µL del cebador que corresponda PanGIIR1 o PanGIR1 (50 µM), sumado a 1 µL de dNTPs (10µM) y 6 µL de dH₂O. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió en hielo durante 3 minutos.

Una vez pasado los 3 minutos de incubación se le agrega el mismo mix que se emplea para las otras RT que consta de: 7µL del mix de reacción que contiene: 4 µL de *5X First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µL de DTT (5 mM) y 1µL de *Superscript II* ®. Se programó el ciclado con las siguientes condiciones: 42°C durante 60 minutos y a 72°C durante 15 minutos.

3.6 Detección de Norovirus mediante PCR semi-anidada

La técnica de PCR semi-anidada que utilizamos para este propósito fue descrita por Boxman y colaboradores en 2006 (Boxman et al., 2006). Esta estrategia involucra la realización de dos rondas consecutivas de amplificación a partir del cDNA generado a partir de la RT con oligonucleótidos hexaméricos aleatorios. En la primera etapa, se amplifica una región conservada de la ARN polimerasa mediante los cebadores JV13I y JV12Y, obteniendo un amplicón de 327 pb. Luego, en la segunda etapa, se amplifican de manera individual los genogrupos GI y GII utilizando las combinaciones de cebadores específicas: JV13I-G1c para GI y JV12Y-NoroII-Rc para GII (Tabla 1). Este round genera amplicones de 187pb y 236pb respectivamente, como se muestra en la Figura 6. Una ventaja adicional de esta metodología es que permite la identificación directa del genogrupo detectado mediante observación directa en el gel de agarosa.

Nombre	Target Gen	Secuencia 5' - 3'	Polaridad	Amplicon (pb)
JV13I	RdRp	TCATCATCACCATAGAAIGAG	-	327 pb
JV12Y	RdRp	ATACCACTATGATGCAGAYTA	+	
G1c	RdRp	TCNGAAATGGATGTTGG	+	187 pb
NoroII-Rc	RdRp	AGCCAGTGGCGATGGAATTC	-	236 pb

Tabla 1 – Cebadores utilizados para PCR semi-anidada para la detección de NoV. Adaptado de Boxman y cols 2006

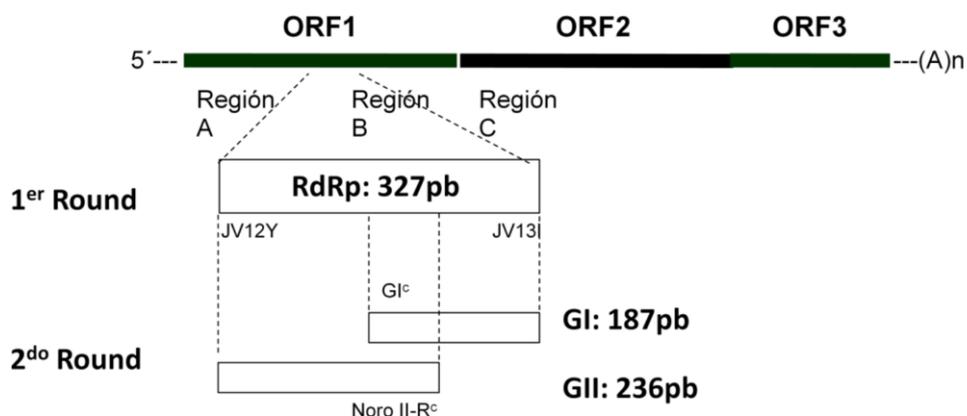


Figura 6 - Esquema del genoma de Norovirus con la disposición de los cebadores empleados en la PCR semi-anidada y los tamaños de amplificación esperados para cada round. Adaptada de Alberti (2012)

La primera ronda de PCR para obtener el amplicón de 327pb se realiza a partir de 2µL del cDNA generado en una etapa anterior en un volumen final de 25µL. Se prepara el mix de reacción de PCR: 2.5µL 10X PCR Buffer (-MgI), 0.5µL dNTPs (10µM), 0.75µL MgCl₂ (50mM), 0.75µL de cada uno de los cebadores JV13I (10µM) y JV12Y (10µM), 0.1µL de la enzima Taq Platinum Invitrogen (N°Cat. 10966), y cantidad suficiente de dH₂O para un volumen final de 25µL. Las condiciones de ciclado para la amplificación fueron: 94°C, 3min; 40 ciclos (94°C, 45 seg; 37°C, 45 seg; 72°C, 45 seg) 72°C, 7 min.

La segunda ronda de PCR consta del mismo mix de PCR que el primer round, variando el juego de cebadores. Las condiciones de amplificación son las mismas que para el primer round: 94°C, 3min; 40 ciclos de (94°C, 45 seg; 37°C, 45 seg; 72°C, 45 seg) 72°C, 7 min.

Para la visualización de los fragmentos amplificados se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) de *Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder*. El ladder está compuesto por 10 fragmentos de DNA purificados cromatográficamente de 1000 a 100 pb.

Al visualizar bajo luz UV utilizando *SYBR™ Safe DNA gel stain* como agente intercalante se espera ver una banda en 187 pb para NoV GI positivo y una banda en 236 pb para las muestras GII positivas. (Figura 6).

3.7 Análisis de variabilidad genética de Norovirus

3.7.1 PCR región D

Para aquellas muestras que den positivas para NoV se les realiza el estudio de variabilidad genética, para ello se amplifica un fragmento de 180 pb o 250 pb para los genogrupos GI y GII, respectivamente. Este fragmento está situado en la región D, región que codifica para el dominio P1 de la protuberancia de VP1. Esta metodología ha sido utilizada anteriormente en el grupo de Alberti A., 2012 basado en una técnica descrita por Vinje y cols., 2004.

Nombre	Target Gen	Secuencia 5´ - 3´	Polaridad	Posición	Amplicon (pb)	Genogrupo
Cap A	VP1	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	-	6897	177 pb	GI
Cap B1	VP1	TAT GTT GAC CCT GAT AC	+	6738		
Cap B2	VP1	TAT GTI GAY CCW GAC AC	+	6738		
Cap C	VP1	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	-	6667	253 pb	GII
Cap D1	VP1	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	+	6432		
Cap D3	VP1	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	+	6432		

Tabla 2- Cebadores utilizados para PCR región D para la amplificación de un fragmento de 250 pb o 180 pb de VP1 de NoV. Adaptada de Vinje y cols., 2004.

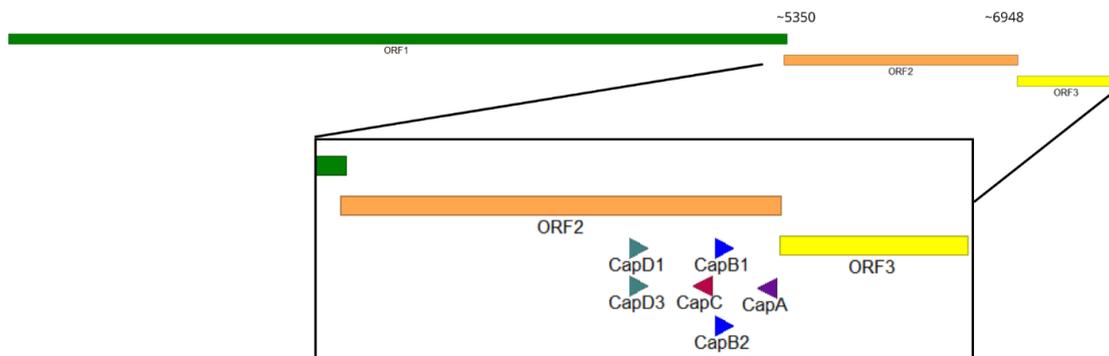


Figura 7 – Representación gráfica de hibridación de los cebadores para la región D. Utilizando como cepas de referencia Norwalk (M87661) para GI y Lordsdale (X86557) para GII. Se realizó una aproximación para disponer todos los cebadores de GI y GII en único esquema.

Para ello se utiliza como molde 5µL del cDNA. Se prepara el mix de PCR con 5µL 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 µL MgCl₂ (50mM), 1µL dNTPs (10mM), 0.2µL de Taq Platinum Invitrogen N°Cat. 10966, 1µL de cada uno de los cebadores CapA, CapB1, CapB2, CapC, CapD1, Cap D3, (Tabla 2, Figura 7) por último, completar con agua para un volumen total de 50µL (31.3µL de H₂O)

Para el ciclado, son 3 min a 94°C; 40 ciclos de (94°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 45 seg) y por último 72°C, 7 min. Los fragmentos amplificados se visualizan en un gel de agarosa 1% bajo luz UV utilizando SYBR™ Safe DNA gel stain como agente intercalante se espera observar una única banda en 250 pb para aquellas muestras positivas para NoV genogrupo GII y 180 pb para genogrupo GI, aproximadamente.

3.7.2 PCR ORF2/ORF3

Esta PCR permite la amplificación de ORF2 y ORF3 (Los cuales codifican para las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente) a partir de cebadores específicos para cada genogrupo. Se utiliza el producto de retrotranscripción con oligonucleótidos específicos para

dicha zona ORF2/ORF3 y se realizan mix diferenciales según el genogrupo a amplificar. La estrategia fue adaptada de Debbink et al., (2013).

Para ello se realiza el mix de PCR para 2 µL del cDNA generado con cebadores randómicos o con cebadores específicos para esta región ORF2/ORF3. Agregar 2.5 µL 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0.75 µL MgCl₂ (50mM), 0.5 µL dNTPs (10mM), 0.1 µL de Taq Platinum Invitrogen N°Cat. 10966, 1.25 µL de cada cebador según el genogrupo, Ring2PCR 10 µM y PanGIIR1 10µM para GII y Ring1PCR 10 µM y PanGIR1 10µM para GI (Tabla 3, Figura 8), por último, completar con agua para un volumen total de 25 µL (16.65 µL de dH₂O).

Para el ciclado, son 30 segundos a 98°C para desnaturalización inicial, luego 40 ciclos de (98°C, 10 seg. 42°C, 30 seg. y 72°C, 1min 30seg) y por último 72°C por 10 min. Los fragmentos amplificados se visualizan en un gel de agarosa 0.7% bajo luz UV utilizando SYBR™ Safe DNA gel stain como agente intercalante se espera observar una única banda según el genogrupo, de 2380 pares de bases aproximadamente para GII y 1813 pb para GI.

Nombre	Target Gen	Secuencia 5´ - 3´	Polaridad	Posición	Amplición (pb)	Genogrupo
Ring1PCR	ORF2/3	TGG ACA GGR GAT CGC RAT CT	+	5306	1813 pb	GI
PanGIR1	ORF2/3	GGC ARY CTW TCW GTA TTR AAA	-	7119		
Ring2PCR	ORF2/3	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+	5048	2380 pb	GII
PanGIIR1	ORF2/3	GTC CAG GAG TCC AAA A	-	7428		

Tabla 3 - Cebadores utilizados para la amplificación de la región ORF2 y ORF3 adaptada de Debbink et al., 2013

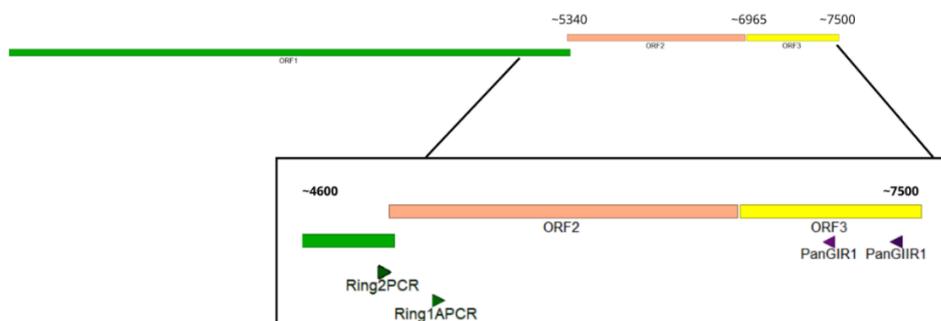


Figura 8 - Representación gráfica de hibridación de los cebadores para la PCR ORF2/ORF3. Utilizando como cepas de referencia para genogrupos GI la (Norovirus Hu/GI.1/Norwalk/1968/USA, Genbank numero de acceso: AF093797) y para GII (Norovirus Hu/GII.4/New Orleans/2010/USA GenBank número de acceso: JN595867. Se realizó una aproximación de las posiciones para poder representar los cebadores de ambos genogrupos en el mismo esquema (Tabla 3).

3.8 Secuenciación y análisis filogenéticos

Las muestras seleccionadas, que mostraron amplicones de tamaño adecuado en la RT-PCR semi anidada y en las RT-PCR de la región de la cápside, fueron enviadas a la empresa Macrogen Corea para su purificación y secuenciación mediante la tecnología de Sanger con los cebadores correspondientes. En el caso de las secuencias de la RdRp, se enviaron utilizando únicamente el cebador forward, mientras que para las secuencias de VP1, se enviaron con ambos cebadores forward y reverse.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y procesadas utilizando el Software BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), empleando para su alineamiento *ClustalW* (Thompson et al., 1994) secuencias obtenidas de la base de datos de NCBI (por sus siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information*) para abarcar a algunos genotipos que sean representativos de los 10 genogrupos de NoV existentes. La construcción de la representación filogenética se logró mediante el software PhyML v.3.0 (Guindon et al., 2010), utilizando el criterio de máxima verosimilitud, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos GTR, con soporte estadístico estimado a través de la prueba de razón de verosimilitud aproximada (aLRT).

4. Resultados

4.1 Puesta a punto de los ensayos moleculares

Puesta a punto de RT-PCR semi-anidada para detección

Se adaptó la metodología de RT-PCR semi-anidada para la detección de NoV en muestras clínicas. Esta metodología había sido empleada previamente en el laboratorio para la detección de NoV en matrices ambientales (Alberti, 2012). Para ello se emplearon las cuatro muestras clínicas de archivo seleccionadas del cepario (Hu/NV/Uru5609, Hu/NV/Uru4109, Hu/NV/Uru3809, Hu/NV/Uru0709). Para esta instancia se emplearon los ARN obtenidos a partir de la extracción con TriZOL® ya que fue el empleado por Alberti 2012 para estas muestras de archivo y además el kit Quick-RNA™ MiniPrep Kit de Zymo Research

Esta técnica en particular tiene la característica de permitir la detección directa del genogrupo de GI o GII en el gel de agarosa. Se observó que las cuatro muestras clínicas de archivo fueron positivas para el genogrupo GII, lo que se evidenció mediante la presencia de una banda con una longitud aproximada de 236 pb, como se muestra de manera representativa en la Figura 9 para la muestra Hu/NV/Uru5609. Basado en estos resultados donde no se aprecia diferencias cualitativas en los productos de PCR entre ambos métodos de extracción de ARN, se procedió a continuar en este trabajo con la metodología del kit.

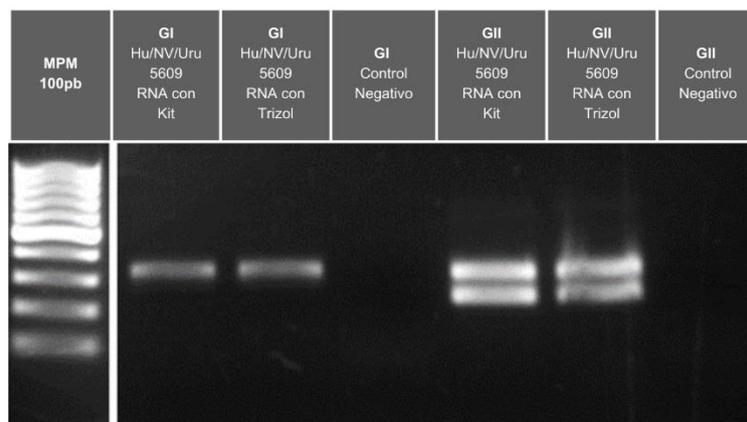


Figura 9 – Detección de NoV a partir de muestras clínicas de referencia, mediante RT-PCR anidada.

Gel de agarosa 2% con 7 carriles. De izquierda a derecha, los carriles representan lo siguiente: 1. Marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb. 2. Producto de RT-PCR con cebadores para GI utilizando ARN extraído con kit comercial de la muestra Hu/NV/Uru5609. 3. Producto de RT-PCR con cebadores para GI utilizando ARN extraído con Trizol. 4. Control negativo para GI. 5. Producto de RT-PCR con cebadores para GII utilizando ARN extraído con kit comercial. 6. Producto de RT-PCR con cebadores para GII utilizando ARN extraído con Trizol. 7. Control negativo para GII.

Puesta a punto de RT-PCR Región D

La puesta a punto de la RT-PCR para amplificar la región D se realizó utilizando la muestra Hu/NV/Uru5609, una de las cuatro muestras de archivo que inicialmente dieron resultados positivos para NoV GII. En un primer intento, se empleó la RT con cebadores específicos CapA y CapC. Sin embargo, dado que no se observó una amplificación exitosa en este primer intento, se procedió a un segundo intento en el que se utilizó un cDNA generado a partir del ARN extraído con el kit comercial y cebadores aleatorios. Como resultado de este enfoque,

en la Figura 10 se evidencia en un gel de agarosa al 2% la presencia de una banda con una longitud aproximada de 250 pb, que corresponde con el tamaño esperado.

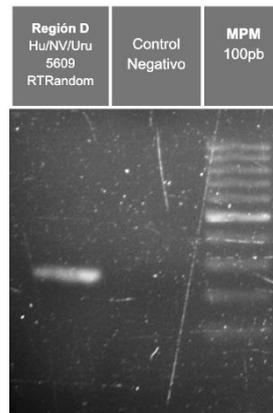


Figura 10 - Detección de NoV a partir de muestras clínicas de referencia, mediante RT-PCR de región D
Resultados en gel de agarosa 2% de la RT-PCR para la región D utilizando cebadores aleatorios. Los tres carriles representan los siguientes elementos, de izquierda a derecha: **1.** Productos de RT-PCR de la región D con el uso de cebadores aleatorios para la muestra Hu/NV/Uru5609. **2.** Control negativo. **3.** Marcador de peso molecular (MPM) 100pb.

Puesta a punto de RT-PCR ORF2/ORF3

En el proceso de optimización de la técnica de RT-PCR para ORF2/ORF3, que hasta entonces no se había utilizado en nuestro laboratorio, obtuvimos una exitosa amplificación de la región completa de la cápside en una de las muestras de archivo, Hu/NV/Uru5609. Durante el primer intento, se empleó cDNA generado con cebadores aleatorios, pero no se observó ninguna amplificación en el gel de agarosa al 0.7%. (Figura 11).

Ante esta situación, se tomaron medidas para mejorar las condiciones de la reacción. En el segundo intento, se adaptó el protocolo de retrotranscripción, siguiendo el método de Debbink et al. (2013), utilizando cebadores específicos. Dado que la muestra de archivo ya había sido confirmada como positiva para el genogrupo GII a través de PCR semi anidada de la RdRp, se utilizó un cebador específico para GII, el PanGIIR1, a una concentración de 50 μ M.

Además, se ajustó la temperatura de hibridación de la PCR, reduciéndola de 48°C a 42°C, para que coincidiera con la temperatura empleada en la etapa de retrotranscripción. Se logró

amplificar un fragmento de aproximadamente 2380 pares de bases, como se esperaba. Este resultado fue confirmado mediante la técnica secuenciación por Sanger. Se logró recuperar secuencias de calidad de 300 pb y 400 pb para los cebadores forward y reverse, respectivamente. Empleando la plataforma de *Norovirus Genotyping Tool* (Kroneman et al., 2011), se logró confirmar como NoV GII.4 a la muestra Hu/NV/Uru5609 utilizando los primeros 300 pb que corresponden al gen de VP1 y asociarla a una variante específica: Den_Haag_2006b (Figura 12).

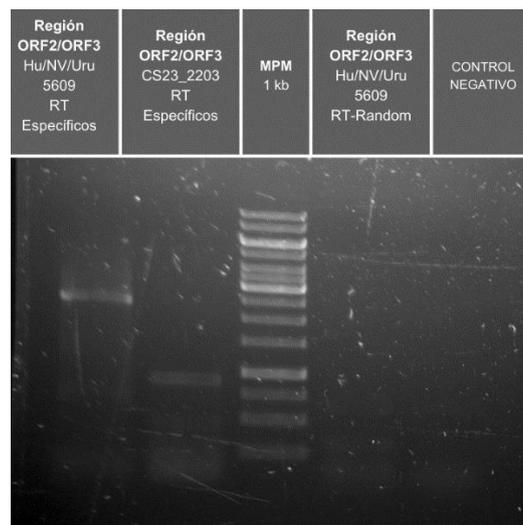


Figura 11 - Detección de NoV a partir de muestras clínicas de referencia, mediante RT-PCR region ORF2/ORF3.

En el gel de agarosa 0.7% se presentan 5 carriles: **1.** Muestra *Hu/NV/Uru5609* con retrotranscripción utilizando cebadores específicos. **2.** Muestra clínica *CS23_2203CP* con retrotranscripción utilizando cebadores específicos. **3.** Marcador de peso molecular de 1 kb, donde las bandas más intensas corresponden a 1000, 3000 y 6000pb. **4.** Muestra *Hu/NV/Uru5609* con retrotranscripción utilizando cebadores aleatorios. **5.** Control negativo.

Name	Length	Family Genus Genogroup	polymerase	capsid	Report	genome
Hu/NV/Uru5609 Cebador Fw: Ring2PCR	306	Caliciviridae Norovirus GII		GII.4 Den_Haag_2006b	Report	

Figura 12 - Resultado del análisis mediante herramienta BLAST de forma automática con la Norovirus Typing Tool v.2.0. De la muestra clínica de archivo, *Hu/NV/Uru5609*, secuenciada con el cebador Ring2PCR. Imagen tomada de Norovirus Typing Tool en la web (Kroneman et al., 2011)

4.2 Detección de muestras clínicas

Se analizaron en su totalidad las tres muestras clínicas (Apéndice AP.3), de las cuales solo una logró la amplificación exitosa de un fragmento del gen RdRp mediante la técnica de RT-PCR semi-anidada. Este resultado permitió la detección de NoV en la muestra clínica CS23_2203CP. La amplificación se visualizó a través de la observación de los fragmentos en un gel de agarosa al 2%, Figura 13. En dicho gel, se pudo constatar la amplificación de ambos genogrupos GI y GII, evidenciándose en la electroforesis la presencia de dos bandas: una de 327 pares de bases, correspondiente al amplicón del primer round, y una segunda banda de aproximadamente 187 y 236 pares de bases para los genogrupos GI y GII, respectivamente.

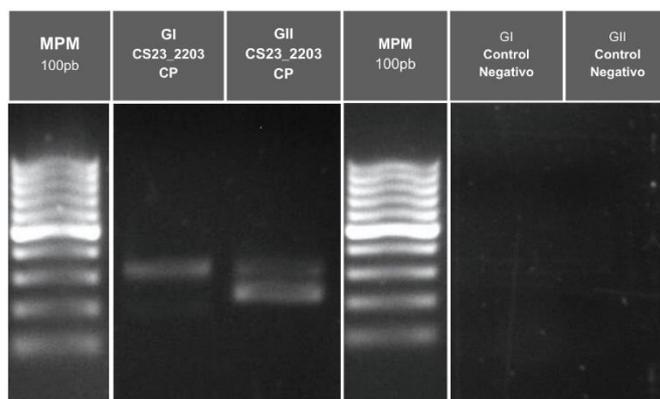


Figura 13 - Detección de NoV a partir de muestras clínicas obtenidas en esta tesina, mediante RT-PCR anidada. Gel de agarosa 2% con resultados de la corrida de PCR de la muestra clínica CS23_2203CP. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (MPM), cuya banda más intensa representa los 500pb. Los carriles 2 y 3 corresponden al producto de PCR de la muestra CS23_2203CP para GI y GII respectivamente. Los últimos tres carriles corresponden al MPM 100pb y los controles negativos correspondientes para GI y GII.

4.3 Detección de muestras ambientales

Se realizaron muestreos por un período de siete meses desde enero a julio del presente año cada 15 o 20 días obteniendo un total de 40 muestras (Apéndice AP.3) correspondientes a las 10 instancias de toma de muestra realizados en los cuatros sitios seleccionados: los tres vertederos y la planta de pretratamiento de aguas residuales de la costa de Montevideo, con las características de cada sitio descritas en el Apéndice A.1. Se logró la concentración de

partículas virales de estas muestras y posterior obtención del ARN total a partir del método con Kit comercial.

Por muestreo se realizó la detección de NoV genogrupo GI y GII por la PCR semi-anidada de una región de la RdRp, obteniendo los siguientes resultados. Se detectó NoV GII en el 100% de las muestras y NoV GI en el 40%. Estos resultados fueron evidenciados en el gel de agarosa 2% observando los fragmentos esperados de 236 y 187 pares de bases para GII y GI respectivamente, en algunos casos también se podía observar el fragmento del primer round correspondiente a 327 pares de bases aproximadamente. En la Figura 14 se muestra un resultado representativo de este análisis obtenido para el muestreo realizado en los cuatro sitios de muestreo, el día 3 de mayo.

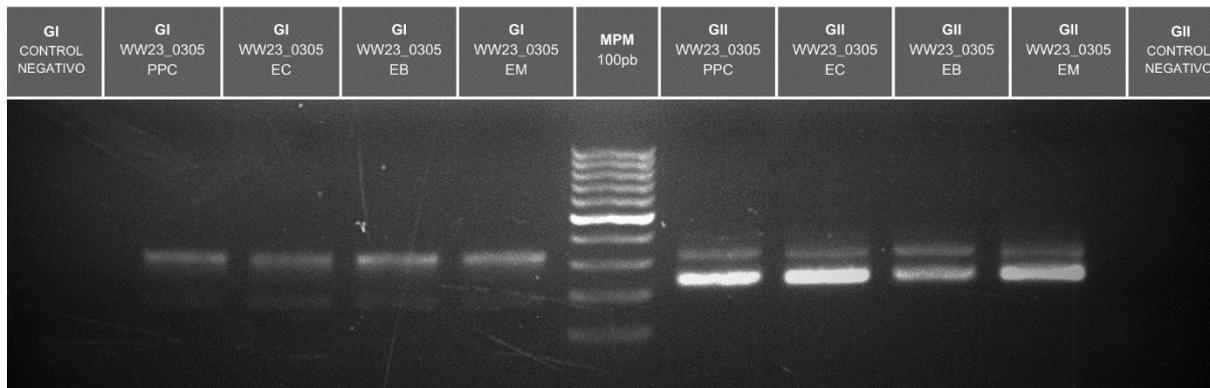


Figura 14 - Detección de NoV a partir de muestras ambientales recabadas en esta tesina, mediante RT-PCR anidada. En la figura se muestra un gel de agarosa con 11 carriles. De izquierda a derecha, los carriles representan lo siguiente: **1.** Control negativo para RT-PCR semi-anidada para genogrupo GI. **2 - 5.** Producto de la amplificación para genogrupo GI para las diferentes muestras ambientales, PPC, EC, EB y EM. **6.** Marcador de peso molecular de 100pb cuya banda más intensa corresponde a 500pb. **7-10.** Producto de la amplificación para genogrupo GII para las diferentes muestras ambientales, PPC, EC, EB y EM. **11.** Control negativo para la RT-PCR semi-anidada para genogrupo GII.

Es a destacar que ambos genogrupos, GI y GII, se identificaron en todos los sitios de muestreo (PPC, EC, EB y EM), y las diferencias de detección para GI entre los diferentes sitios fueron mínimas a pesar de ser aguas residuales provenientes de diversas áreas geográficas. (Figura 15 A).

En términos generales, se observa que el genogrupo GII muestra una presencia constante a lo largo de las estaciones en todos los sitios de muestreo. Por otro lado, el genogrupo GI presenta variaciones significativas a lo largo del período de muestreo. Se detecta con mayor abundancia en enero y febrero, luego disminuye su detección y experimenta un aumento durante los meses de invierno. (Figura 15 B y 15 C).

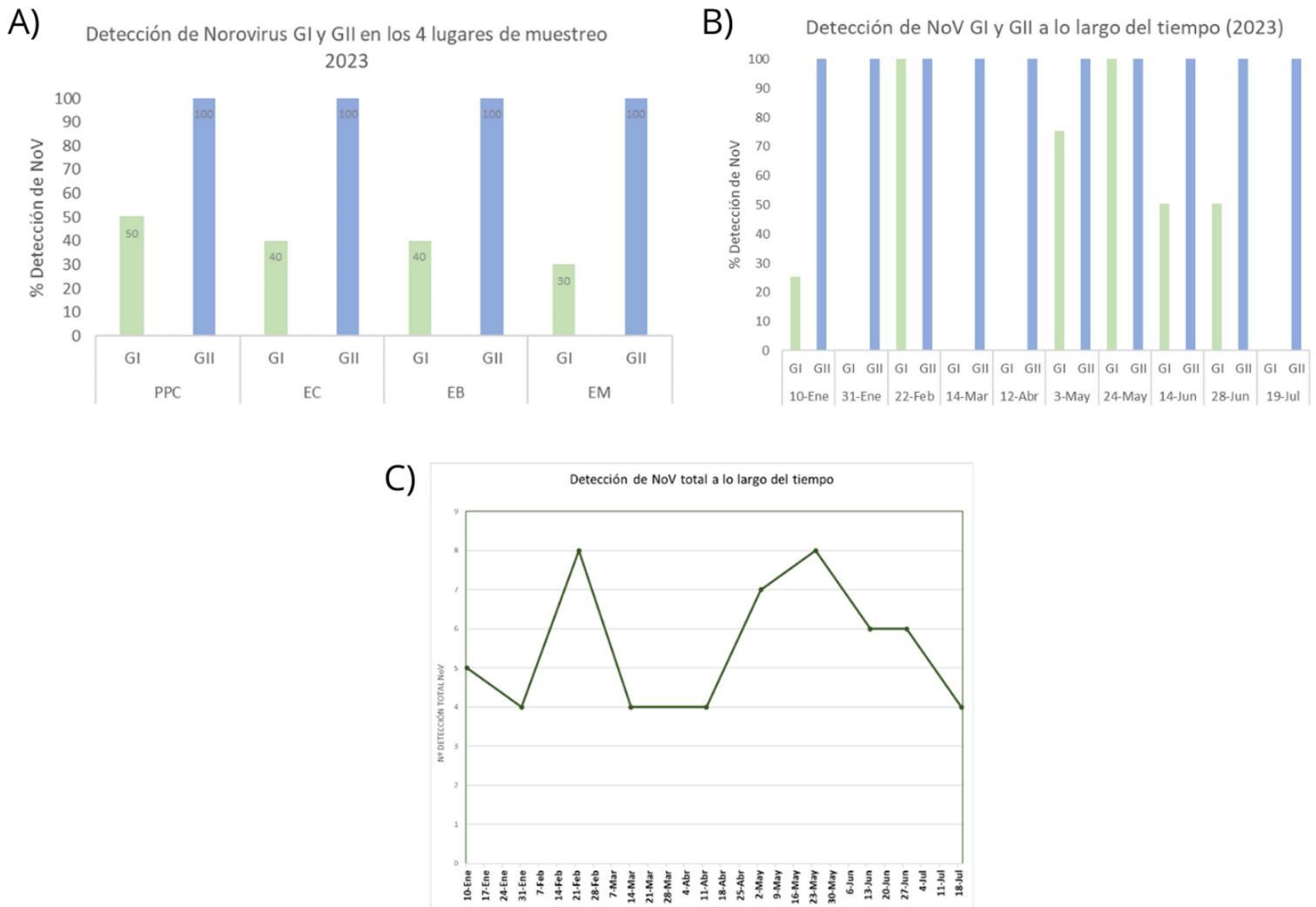


Figura 15 - Distribución de la detección de NoV en aguas residuales obtenidas en esta tesina.
A) Gráfico de la detección NoV genogrupos GI y GII asociados a los diferentes sitios de muestreo, Planta Pre-tratamiento Punta Carretas (PPC), Estación Bombeo La Cumparsita (EC), Estación Bombeo Buceo (EB), Estación Bombeo Malvín (EM). **B)** Detección de ambos genogrupos por muestreo a lo largo de los meses de enero a julio. **C)** Detección de NoV totales a lo largo del tiempo de muestreo enero – julio.

4.4 Análisis de variabilidad de Norovirus a partir del gen VP1

Tras la detección de las muestras positivas para Norovirus, se procedió a evaluar la genotipificación del virus mediante la amplificación del gen VP1.

Para la única muestra clínica CS23_2203CP que resultó positiva para NoV y que además demostró la presencia de ambos genogrupos, se llevaron a cabo varios intentos de amplificación del gen VP1. Inicialmente, se aplicó la metodología de la región D, debido a los antecedentes del grupo. Sin embargo, no se obtuvo ningún resultado de amplificación visible en el gel de agarosa al 1%. Dado este resultado, se llevó a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica y se evaluaron teóricamente varios procedimientos para la amplificación de una región informativa de VP1. Finalmente, se optó por adaptar el procedimiento de Debbink et al., 2013, que permite la amplificación del gen completo (Resultados 4.1 “Puesta a punto de RT-PCR ORF2/ORF3”)

Este procedimiento se aplicó a la muestra clínica, resultando en la obtención de una banda de amplificación visible en el gel de agarosa al 0.7%, aunque de un tamaño menor al esperado, con una longitud de 1000 pb en lugar de los 2380 pb o 1813 pb esperados para los genogrupos GII o GI, respectivamente (Figura 11). El producto de PCR se envió a secuenciar a MacroGen en Corea, utilizando los cebadores correspondientes. Sin embargo, la secuencia obtenida presentó una calidad muy deficiente, confirmando la falta de especificidad del producto amplificado.

Además, se llevó a cabo un intento de amplificación mediante la PCR ORF2/ORF3 en muestras ambientales, seleccionando aquellas que mostraron los mejores resultados de amplificación en la PCR semi-anidada RdRp. Sin embargo, este intento no arrojó resultados positivos.

4.5 Análisis globalizador de secuencias

La falta de secuencias de la región del gen VP1 nos llevó a secuenciar la región de RdRp, utilizada para la detección, con el fin de confirmar que la banda observada en el gel correspondía realmente al Norovirus. Esto también nos permitió establecer relaciones filogenéticas entre nuestras muestras y las secuencias de la base de datos GenBank. Con este propósito, se llevó a cabo la secuenciación mediante el cebador JV12Y (Tabla 1) para un total de cuatro muestras, que incluyeron una muestra clínica y tres ambientales. Como resultado de estas secuenciaciones, se obtuvieron siete secuencias en total. Entre estas secuencias, dos pertenecen a la muestra clínica CS23_2203CP y abarcan ambos genogrupos. Dos muestras ambientales WW23_1001EC y WW23_1001EB positivas para ambos genogrupos y, por último, se obtuvo una secuencia específica para el genogrupo GII a partir de la muestra WW23_1001PPC.

Se obtuvieron secuencias de alta calidad de cinco de las siete secuencias, las cuales fueron editadas y alineadas junto con 63 secuencias de diferentes genotipos y genogrupos para la construcción del árbol filogenético (Anexo A.1). Como se observa en la Figura 16, este análisis reveló que las secuencias de GI, CS23_2203CP y WW23_1001EC se agruparon junto al clado del genogrupo I, mostrando una mayor relación con GI.P3. De mismo modo, las secuencias de GII se agruparon entre sí, CS23_2203CP, WW23_1001EC y WW23_1001EB, y presentaron una relación filogenética cercana con GII.P6 y GII.P7.

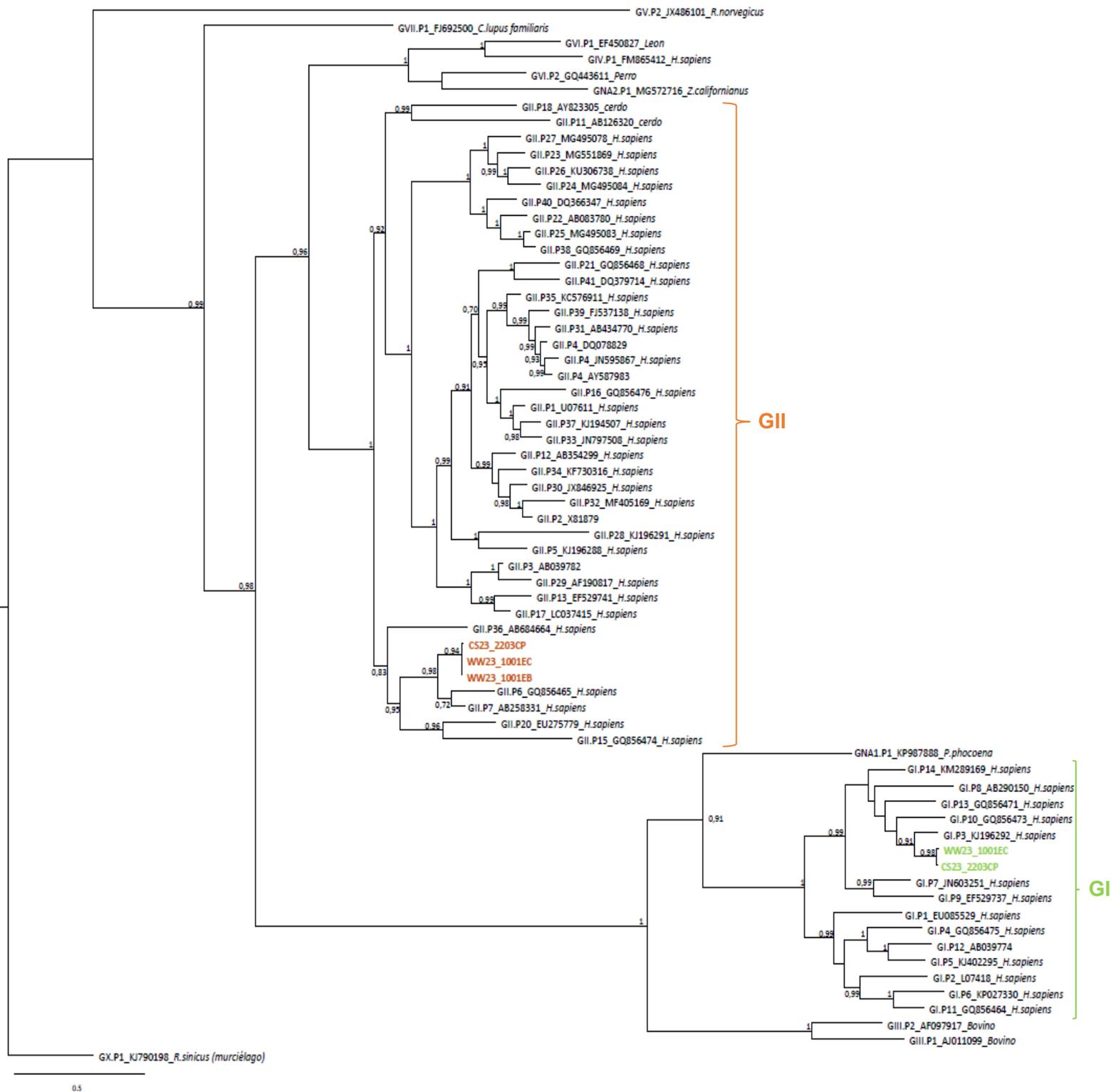


Figura 16 – Árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir de un fragmento de 300 pb de la RdRp de NoV. La filogenia se construyó bajo el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. Los soportes de clados se estimaron a través de la prueba de razón de verosimilitud aproximada (aLRT). Se utilizó la secuencia del Norovirus de murciélagos, Genogrupo X como grupo externo. Las secuencias utilizadas se pueden identificar en el Anexo A.1. Las secuencias de muestras propias se indican con color, con color anaranjado se encuentran aquellas que notaron amplificación para GII. En color verde son aquellas muestras que dieron positivas para GI.

Discusión

En el marco de este estudio, hemos alcanzado con éxito la detección de Norovirus en muestras tanto clínicas como ambientales mediante la implementación de una metodología de RT-PCR semi-anidada. Es importante destacar que esta metodología se basa en investigaciones previas de nuestro grupo, como el trabajo de Alberti en 2012 en el marco de su tesis de Maestría, que ya había utilizado esta técnica para la detección de NoV en muestras ambientales (Alberti, 2012). La elección de emplear la misma metodología en ambos tipos de muestras proporciona una serie de ventajas. En primer lugar, garantiza una mayor consistencia en los resultados obtenidos, lo que facilita significativamente la comparación y el análisis de datos entre los entornos clínicos y ambientales. Además, esta estrategia se traduce en un ahorro sustancial de tiempo y recursos, ya que evita la necesidad de desarrollar y validar múltiples protocolos distintos.

Un hallazgo inesperado en este estudio fue la detección de ambos genogrupos de Norovirus en la muestra clínica CS23_2203CP. Sin embargo, este resultado encuentra apoyo en trabajos previos que señalan la posibilidad de coinfección con diferentes genotipos y genogrupos de NoV, así como con otros virus entéricos, como el Rotavirus y el Sapovirus. Específicamente, se ha observado la coinfección con los genogrupos GI y GII, en el que diferentes P-tipos de GI.3 se han identificado en varios pacientes, lo que destaca la complejidad de la epidemiología del este virus (Liu et al., 2020; Umair et al., 2023).

En relación a la amplificación de la región ORF2, que codifica para la cápside VP1, no se obtuvieron resultados satisfactorios mediante ninguna de las dos aproximaciones utilizadas en este estudio para la muestra clínica actual CS23_2203CP. La aproximación basada en la RT-PCR de la región D, la cual se adaptó a partir del enfoque empleado por Alberti en 2012, se ajustó con éxito para las muestras de archivo, si bien sufrió modificaciones, ya que se empleó a partir del cDNA generado a partir de cebadores hexaméricos aleatorios, con RNA extraído a través del Kit comercial Quick-RNA™ MiniPrep Kit. Zymo Research R1054. Sin

embargo, no se observó amplificación en el caso de la muestra CS23_2203CP. Esto podría explicarse ya que es una región complicada de amplificar ya que los cebadores diseñados presentan una baja temperatura de hibridación, lo que aumenta la posibilidad de amplificar productos inespecíficos. Además, la región D se encuentra en una región altamente variable de ORF2, lo que podría complicar su amplificación en muestras más recientes, ya sea debido a la posible generación de productos inespecíficos o a cambios nucleotídicos significativos, a pesar de la presencia de cebadores altamente degenerados. (Vinjé, 2015). A pesar de esto, las expectativas eran moderadas, ya que estudios anteriores de nuestro grupo solo lograron amplificar la región D en 14 de las 34 muestras positivas para NoV (Alberti, 2012).

Estos resultados nos llevaron a abordar una nueva estrategia para la obtención del gen completo de la cápside. Se logró con éxito la amplificación de la muestra Hu/NV/Uru5609 con la RT-PCR ORF2/ORF3. Este logro es de gran importancia, ya que no solo facilitaría la genotipificación precisa de las variantes de NoV, sino que abre la posibilidad a otros estudios. Contando con esta información podemos expresar el gen de VP1 y evaluar su inmunogenicidad en forma de partículas similares a virus (VLPs) o mediante modelados bioinformáticos (Debbink et al., 2013). Sin embargo, a pesar de la exitosa adaptación de esta metodología para la muestra de archivo, la amplificación de la muestra CS23_2203CP generó un tamaño menor al esperado, y su secuenciación confirmó la inespecificidad del producto. Para mejorar estos resultados, se podrían realizar ajustes en la cantidad de enzima, los tiempos de extensión, la concentración de los cebadores, el número de ciclos, o se podría optimizar la concentración de Mg²⁺. Estas condiciones no son específicas para este caso en particular, sino que son generales para PCRs con productos inespecíficos (Debbink et al., 2013).

A pesar de lograr una amplificación exitosa de la muestra de archivo Hu/NV/Uru5609 para la región ORF2/ORF3 mediante PCR, y obtener un resultado de secuenciación que confirmó la puesta a punto de dicha metodología. Es importante destacar que debido a las limitaciones de la secuenciación por Sanger, siendo eficiente para la obtención de secuencias de

fragmentos no mayores a 1000 pares de bases (Hawkins, 2017), no se logró la secuenciación del fragmento completo de 2380 pb. La baja calidad de las secuencias resultó en la recuperación de solo 300 pb y 400 pb para los cebadores forward y reverse, respectivamente, lo que impidió la obtención de la secuencia consenso. No obstante, se logró caracterizar el NoV de la muestra de archivo como NoV GII.4 utilizando los primeros 300 pb que corresponden al gen de VP1 y, además, asociarla a una variante específica: Den_Haag_2006b.

Es relevante resaltar que la obtención de la secuencia completa del gen VP1 es fundamental para las aproximaciones mencionadas anteriormente. Para abordar esta limitación, se pueden considerar dos opciones, la utilización de otra técnica de secuenciación o realizar la búsqueda o el diseño de más de un juego de cebadores internos a Ring2PCR y PanGIIR1. Esta última opción permitiría secuenciar fragmentos más pequeños por separado y posteriormente ensamblarlas para obtener la secuencia completa del gen VP1, siendo el gen de interés para la caracterización de NoV.

Por otro lado, es importante destacar que el método de extracción de ARN empleado puede desempeñar un papel significativo en la amplificación de los productos de PCR. Por un lado, las muestras fecales a menudo contienen inhibidores para las PCR, lo que subraya la importancia de elegir un método de extracción adecuado para eliminar estos inhibidores. Si bien la extracción con columnas, como la que se utiliza en los kits comerciales de este estudio, puede ser una excelente opción para obtener ARN de alta pureza, es importante tener en cuenta que puede afectar el rendimiento para la amplificación de moléculas de ARN de gran tamaño. Aunque en el caso de las muestras de archivo se obtuvo un buen resultado con esta metodología para amplificar fragmentos de 2380 pares de bases, podría representar un desafío cuando se busque amplificar fragmentos de tamaño similar, aún más grandes, o incluso el genoma completo. En estas situaciones, se recomienda considerar métodos de extracción clásicos utilizados con muestras fecales, como el método Trizol, o métodos más actuales basados en perlas magnéticas. Estos enfoques han demostrado ser más efectivos

para la amplificación de moléculas de ARN de gran tamaño en condiciones similares. A su vez, se recomienda realizar el ADN copia inmediatamente luego de la extracción del ARN viral ya que se reduce la degradación de las moléculas de ARN de tamaño largo en los ciclos de congelado y descongelado (Kulka et al., 2019; Tohma et al., 2020).

Con respecto a la detección de NoV en aguas residuales, se recolectaron datos con una detección del 100% de Norovirus GII y 40% de Norovirus GI en los diferentes sitios de muestreo. Este patrón coincide con hallazgos previamente identificados en varios estudios, incluyendo el de Alberti, donde se observó una mayor prevalencia de GII en comparación con GI. Esto puede deberse a la predominancia de los genotipos GII, como GII.4 (Alberti, 2012; Huang et al., 2022).

Cuando comparamos estos resultados, Figura 15, con los datos recopilados por nuestro grupo hace más de una década, (Anexo A.2), notamos una mayor tasa de detección en el número de muestras. Alberti detectó NoV GII solo en 7 de las 24 muestras (29%) y NoV GI en solo una (4%) (Alberti, 2012). Esta diferencia es notoria y podemos proponer diversas explicaciones.

Una de las posibles explicaciones podría ser el paso del tiempo, ya que una década posterior implica cambios en la distribución poblacional y en la infraestructura de saneamiento, lo que podría haber aumentado la exposición al virus. En segundo lugar, se introdujo un nuevo procedimiento de concentración de partículas virales. Si bien la ultracentrifugación ha sido un método ampliamente utilizado en nuestro grupo y en particular en el trabajo de Alberti (2012); En este trabajo se optó por la precipitación con PEG 8000. Este método de separación de fases, es más rápido, más económico y menos dañino para la partícula viral, mostrando mejor recuperación para virus de ARN (Corpuz et al., 2020; Philipson et al., 1960). Lo cual pudimos corroborar en un ensayo de recuperación realizado por nuestro grupo para Coronavirus Bovino dónde se compararon ambos métodos y se observó un mejor desempeño con la precipitación con PEG 8000. Por último y no menos importante, se realizaron variaciones en el lugar específico de muestreo. Mientras que Alberti tomaba las muestras de los tres

vertederos a la salida, en este trabajo optamos por la toma de muestras en el interior de la instalación en la zona del pozo de bombeo. Esto podría haber resultado en muestras menos diluidas, con menor exposición al agua del estuario y, por consiguiente, menos influencia del entorno y la radiación solar. Es fundamental destacar que, en el sistema de alcantarillado de Montevideo, las aguas pluviales y residuales normalmente fluyen de manera independiente, aunque en eventos de lluvias intensas pueden mezclarse. Este aspecto adquiere una relevancia especial al evaluar la estacionalidad de la presencia del virus.

Al analizar la detección de NoV a lo largo del tiempo, observamos una tendencia que se asemeja a los hallazgos de Alberti en 2012. En la Figura 15C se indican las detecciones totales de NoV para cada fecha de muestreo, donde se observa una importante detección en los meses de verano. Es interesante mencionar que esto también fue observado en algunas ciudades del noroeste del país (Bortagaray et al., 2023; Victoria et al., 2016). Estos resultados contradicen algunos antecedentes que destacan la estacionalidad de NoV asociada al invierno (Huang et al., 2022; Markt et al., 2023). En este marco es importante considerar que la estacionalidad de NoV puede verse influenciada por múltiples factores, tales como la región geográfica, así como factores ambientales y sociales. En nuestro caso, se podría evaluar la contribución de la llegada de cruceros a Montevideo. Es crucial explorar más a fondo estos elementos para comprender mejor las dinámicas subyacentes que contribuyen a la detección de NoV a lo largo del tiempo.

Sin embargo, es importante destacar que nuestro estudio, en su estado actual, no proporciona una base suficiente para extraer conclusiones definitivas sobre la estacionalidad de NoV. Sería más conveniente llevar a cabo estudios que aborden no solo la detección del virus, sino también la carga viral mediante RT-qPCR a lo largo de todo un año. Esto permitiría un análisis más completo de la presencia y distribución del NoV en diferentes momentos del año, así como una comprensión más profunda de los factores que influyen en su incidencia estacional.

Por otro lado, es importante destacar la notable disparidad en el número de muestras recopiladas entre los dos enfoques. Mientras que se obtuvieron solo tres muestras clínicas

en un período de seis meses, con solo una de ellas proveniente del Hospital Militar, se recopilaron un total de 40 muestras de aguas residuales. Este contraste resalta la limitación en la gestión de muestras para un análisis epidemiológico de las variantes de NoV a través de muestras clínicas. En contraste, la disponibilidad de muestras de aguas residuales es significativamente mayor. Esto no solo permite analizar las variantes circulantes en la población que generan casos asintomáticos y, por ende, no se presentan en centros de salud, sino también la identificación de variantes minoritarias. Aunque este último aspecto escapa del alcance de esta tesina, es importante resaltarlo para motivar el estudio de agentes virales en aguas residuales como una estrategia suficiente para el monitoreo de variantes en una población (Diamond et al., 2022; Huang et al., 2022).

En el marco de nuestro estudio sobre la variabilidad de NoV, se ha construido un árbol filogenético que, en vista de la actual nomenclatura de genotipificación del virus, puede no ser la opción óptima. Como se mencionó al inicio, se está utilizando para clasificar NoV un sistema de genotipificado dual, que combina la información de la RdRp representada como un P-tipo con información de VP1 que permiten asignar el genotipo (Chhabra et al., 2019). Debido a la dificultad en obtener secuencias de VP1, decidimos analizar las secuencias parciales de RdRp, obtenidas mediante RT-PCR semianidada para la detección. Esto resultó en un árbol filogenético centrado en los P-tipos. A pesar de que nuestro análisis fue hecho con una secuencia parcial de la RdRp nuestras muestras se agruparon de acuerdo con lo esperado. Es interesante señalar que la única muestra clínica obtenida en este estudio, en la cual se detectó GI y GII mostró una cercanía filogenética con una muestra GI.P3 (Número de Acceso en GenBank: KJ196292). Esto es relevante ya que se ha observado que la variante GI.P3 se ha detectado en casos de coinfección de Norovirus GI y GII (Liu et al., 2020).

Conclusiones

- Se logró con éxito la detección de Norovirus en muestras clínicas y ambientales mediante RT-PCR semi-anidada la cual fue adaptada para las muestras clínicas.
- Se detectaron ambos genogrupos de NoV en la muestra clínica, que sugieren una coinfección de NoV GI y GII en dicho paciente.
- La amplificación de la región ORF2 del gen de VP1 no arrojó resultados satisfactorios para la muestra clínica, lo que sugiere la necesidad de ajustes en las condiciones de PCR.
- La adaptación de la metodología PCR ORF2/ORF3 permitirá futuros estudios sobre genotipificación y otras investigaciones relacionadas con Norovirus.
- La detección de NoV en aguas residuales mostró una mayor tasa de detección en comparación con datos de hace una década, posiblemente debido a cambios en la infraestructura de saneamiento, la metodología de concentración utilizada y el lugar de toma de muestra en el sitio de los vertederos.
- El análisis filogenético permitió agrupar las muestras de acuerdo con los genogrupos GI y GII, a pesar de las limitaciones en la genotipificación.
- La disponibilidad de muestras de aguas residuales que contrastó con la limitación en la gestión de muestras clínicas, subraya la importancia del monitoreo a través de aguas residuales.

Perspectivas

- La exitosa detección de NoV en aguas residuales subraya la importancia de continuar monitoreando estas fuentes. Este enfoque puede servir como una herramienta efectiva para la vigilancia de enfermedades virales en la población y la identificación de variantes emergentes. Deberán considerarse otros parámetros asociados a este monitoreo.
- Basado en los hallazgos actuales, una dirección futura es continuar la investigación sobre la epidemiología y variabilidad del NoV en Uruguay. Esto podría incluir la recopilación de datos a lo largo de varios meses para obtener una comprensión más completa de las tendencias estacionales y los cambios en la circulación del virus. Será necesario cuantificar mediante qPCR y realizar análisis de riesgo. Además, se podría evaluar el monitoreo del virus en otras matrices acuáticas, como aguas recreacionales y playas, debido al alto impacto que puede tener en la salud pública.
- Dado que se observaron limitaciones en la amplificación de ciertas regiones del genoma del NoV, especialmente en las muestras clínicas, es crucial explorar y optimizar las técnicas de amplificación para mejorar la caracterización del virus. Esto podría incluir ajustes en las condiciones de PCR, la evaluación de otros métodos de amplificación, como la PCR de genoma completo, o la puesta a punto de la metodología para la nomenclatura con genotipado dual basada en una One step RT-PCR de (Chhabra et al., 2021).
- La búsqueda de variantes de NoV minoritarias que no son detectables mediante las metodologías empleadas en esta tesis sugiere la posibilidad de ahondar en la secuenciación de nueva generación (NGS) o secuenciación masiva. Esto proporcionaría una idea más clara de la totalidad de las variantes circulantes en la población.

Bibliografía

- Alberti, L. Á. (2012). Detección molecular y diversidad genética de Norovirus en pacientes y en aguas residuales del Uruguay. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
- Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Ozawa, S., Hall, A. J., & Lee, B. Y. (2016). Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLOS ONE*, 11(4), e0151219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., & Estes, M. K. (2003). The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: A Novel Function for the VP2 Protein. *Journal of Virology*, 77(21), 11603-11615. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11603-11615.2003>
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, L. J., Chen, R., Prasad, B. V. V., & Estes, M. K. (2002). Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 76(8), 4044-4055. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4044-4055.2002>
- Bortagaray, V., Salvo, M., Mir, D., Colina, R., & Victoria, M. (2023). Molecular Characterization of Gastroenteric Viruses in Wastewater from Cities in Uruguay. *Food & Environmental Virology*, 15(4), 318-330. <https://doi.org/10.1007/s12560-023-09567-y>
- Boxman, I. L. A., Tilburg, J. J. H. C., Te Loeke, N. A. J. M., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., & Koopmans, M. (2006). Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 391-396. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.002>
- Bull, R. A., Eden, J.-S., Rawlinson, W. D., & White, P. A. (2010). Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. *PLOS Pathogens*, 6(3), e1000831. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000831>

- Bull, R. A., Tu, E. T. V., McIver, C. J., Rawlinson, W. D., & White, P. A. (2006). Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 327-333. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.327-333.2006>
- Campillay-Véliz, C. P., Carvajal, J. J., Avellaneda, A. M., Escobar, D., Covián, C., Kalergis, A. M., & Lay, M. K. (2020). Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 11, 961. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00961>
- Cannon, J. L., Bonifacio, J., Bucardo, F., Buesa, J., Bruggink, L., Chan, M. C.-W., Fumian, T. M., Giri, S., Gonzalez, M. D., Hewitt, J., Lin, J.-H., Mans, J., Muñoz, C., Pan, C.-Y., Pang, X.-L., Pietsch, C., Rahman, M., Sakon, N., Selvarangan, R., ... Vinjé, J. (2021). Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 27(5), 1438-1445. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204756>
- Cates, J. E., Vinjé, J., Parashar, U., & Hall, A. J. (2020). Recent advances in human norovirus research and implications for candidate vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 19(6), 539-548. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1777860>
- Chan, M. C. W., Sung, J. J. Y., Lam, R. K. Y., Chan, P. K. S., Lee, N. L. S., Lai, R. W. M., & Leung, W. K. (2006). Fecal Viral Load and Norovirus-associated Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1278-1280. <https://doi.org/10.3201/eid1208.060081>
- Chhabra, P., Browne, H., Huynh, T., Diez-Valcarce, M., Barclay, L., Kosek, M. N., Ahmed, T., Lopez, M. R., Pan, C.-Y., & Vinjé, J. (2021). Single-step RT-PCR assay for dual genotyping of GI and GII norovirus strains. *Journal of Clinical Virology*, 134, 104689. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104689>
- Chhabra, P., De Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, 100(10), 1393-1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>

- Corpuz, M. V. A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Campiglia, P., Belgiorno, V., Korshin, G., & Naddeo, V. (2020). Viruses in wastewater: Occurrence, abundance and detection methods. *Science of The Total Environment*, 745, 140910. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>
- Cuevas, J. M., Combe, M., Torres-Puente, M., Garijo, R., Guix, S., Buesa, J., Rodríguez-Díaz, J., & Sanjuán, R. (2016). Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.017>
- de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
- Debbink, K., Costantini, V., Swanstrom, J., Agnihothram, S., Vinjé, J., Baric, R., & Lindesmith, L. (2013). Human Norovirus Detection and Production, Quantification, and Storage of Virus-Like Particles. *Current Protocols in Microbiology*, 31(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15k01s31>
- Degiuseppe, J. I., Barclay, L., Gomes, K. A., Costantini, V., Vinjé, J., & Stupka, J. A. (2020). Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Argentina, 2013-2018. *Journal of Medical Virology*, 92(8), 1330-1333. <https://doi.org/10.1002/jmv.25684>
- Deval, J., Jin, Z., Chuang, Y.-C., & Kao, C. C. (2017). Structure(s), function(s), and inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase of noroviruses. *Virus Research*, 234, 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.018>
- Diamond, M. B., Keshaviah, A., Bento, A. I., Conroy-Ben, O., Driver, E. M., Ensor, K. B., Halden, R. U., Hopkins, L. P., Kuhn, K. G., Moe, C. L., Rouchka, E. C., Smith, T., Stevenson, B. S., Susswein, Z., Vogel, J. R., Wolfe, M. K., Stadler, L. B., & Scarpino, S. V. (2022). Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses. *Nature Medicine*, 28(10), 1992-1995. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01940-x>

- Farahmand, M., Moghoofei, M., Dorost, A., Shoja, Z., Ghorbani, S., Kiani, S. J., Khales, P., Esteghamati, A., Sayyahfar, S., Jafarzadeh, M., Minaeian, S., Khanaliha, K., Naghdalipour, M., & Tavakoli, A. (2022). Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020. *Reviews in Medical Virology*, 32(1), e2237. <https://doi.org/10.1002/rmv.2237>
- Fioretti, J. M., Fumian, T. M., Rocha, M. S., Dos Santos, I. D. A. L., Carvalho-Costa, F. A., De Assis, M. R., Rodrigues, J. D. S., Leite, J. P. G., & Miagostovich, M. P. (2018). Surveillance of Noroviruses in Rio De Janeiro, Brazil: Occurrence of New GIV Genotype in Clinical and Wastewater Samples. *Food and Environmental Virology*, 10(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9308-2>
- Ford-Siltz, L. A., Tohma, K., & Parra, G. I. (2021). Understanding the relationship between norovirus diversity and immunity. *Gut Microbes*, 13(1), 1900994. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1900994>
- Ford-Siltz, L., Mullis, L., Sanad, Y., Tohma, K., Lepore, C., Azevedo, M., & Parra, G. (2019). Genomics Analyses of GIV and GVI Noroviruses Reveal the Distinct Clustering of Human and Animal Viruses. *Viruses*, 11(3), 204. <https://doi.org/10.3390/v11030204>
- Friesema, I. H. M., Vennema, H., Heijne, J. C. M., de Jager, C. M., Teunis, P. F. M., van der Linde, R., Duizer, E., & van Duynhoven, Y. T. H. P. (2009). Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 46(4), 341-344. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.010>
- Graziano, V. R., Wei, J., & Wilen, C. B. (2019). Norovirus Attachment and Entry. *Viruses*, 11(6), 495. <https://doi.org/10.3390/v11060495>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the

performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41), 95-98.
<https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>

Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.031>

Harris, J. P., Lopman, B. A., & O'Brien, S. J. (2010). Infection control measures for norovirus: A systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. *The Journal of Hospital Infection*, 74(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.07.025>

Hawkins, G. A. (2017). Chapter 5—Analysis of Human Genetic Variations Using DNA Sequencing. En M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 77-98). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00005-9>

Huang, Y., Zhou, N., Zhang, S., Yi, Y., Han, Y., Liu, M., Han, Y., Shi, N., Yang, L., Wang, Q., Cui, T., & Jin, H. (2022). Norovirus detection in wastewater and its correlation with human gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(16), 22829-22842. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18202-x>

Huhti, L., Szakal, E. D., Puustinen, L., Salminen, M., Huhtala, H., Valve, O., Blazevic, V., & Vesikari, T. (2011). Norovirus GII-4 Causes a More Severe Gastroenteritis Than Other Noroviruses in Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(10), 1442-1444. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir039>

Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, 2(3), 748-781. <https://doi.org/10.3390/v2030748>

- Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., & Omura, T. (2017). Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), e03406-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03406-16>
- Kendra, J. A., Tohma, K., & Parra, G. I. (2022). Global and regional circulation trends of norovirus genotypes and recombinants, 1995–2019: A comprehensive review of sequences from public databases. *Reviews in Medical Virology*, 32(5), e2354. <https://doi.org/10.1002/rmv.2354>
- Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., & Hoff, J. C. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 261-264. <https://doi.org/10.1128/aem.50.2.261-264.1985>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (Eds.). (2013). *Fields virology* (6th ed). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., & Koopmans, M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology*, 158(10), 2059-2068. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5>
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., v d Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J., & Koopmans, M. (2011). An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 51(2), 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
- Kulka, M., Tohma, K., Coughlan, S., Green, K., Y., & Parra, G. I. (2019, octubre). Genomic analyses of human sapovirus reveal disparate patterns of evolution among genotypes and genome regions. [Poster #247.]. The 7th International Calicivirus Conference.

- Lindesmith, L. C., Boshier, F. A. T., Brewer-Jensen, P. D., Roy, S., Costantini, V., Mallory, M. L., Zweigart, M., May, S. R., Conrad, H., O'Reilly, K. M., Kelly, D., Celma, C. C., Beard, S., Williams, R., Tutill, H. J., Becker Dreps, S., Bucardo, F., Allen, D. J., Vinjé, J., ... Baric, R. S. (2022). Immune Imprinting Drives Human Norovirus Potential for Global Spread. *mBio*, 13(5), e01861-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01861-22>
- Lindesmith, L. C., Donaldson, E., Leon, J., Moe, C. L., Frelinger, J. A., Johnston, R. E., Weber, D. J., & Baric, R. S. (2010). Heterotypic Humoral and Cellular Immune Responses following Norwalk Virus Infection. *Journal of Virology*, 84(4), 1800-1815. <https://doi.org/10.1128/jvi.02179-09>
- Liu, D., Zhang, Z., Li, S., Wu, Q., Tian, P., Zhang, Z., & Wang, D. (2020). Fingerprinting of human noroviruses co-infections in a possible foodborne outbreak by metagenomics. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108787>
- Lizasoain, A., Tort, L. F. L., García, M., Gillman, L., Alberti, A., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., Pou, S. A., Cagiao, A., Rzasap, A., Huertas, J., Berois, M., Victoria, M., & Colina, R. (2018). Human enteric viruses in a wastewater treatment plant: Evaluation of activated sludge combined with UV disinfection process reveals different removal performances for viruses with different features. *Letters in Applied Microbiology*, 66(3), 215-221. <https://doi.org/10.1111/lam.12839>
- Lopman, B., Armstrong, B., Atchison, C., & Gray, J. J. (2009). Host, Weather and Virological Factors Drive Norovirus Epidemiology: Time-Series Analysis of Laboratory Surveillance Data in England and Wales. *PLOS ONE*, 4(8), e6671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006671>
- Lucero, Y., Matson Do, Ashkenazi S, George S, & O’Ryan M. (2021). Norovirus: Facts and Reflections from Past, Present, and Future. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/v13122399>
- Ludwig-Begall, L. F., Mauroy, A., & Thiry, E. (2018). Norovirus recombinants: Recurrent in the field, recalcitrant in the lab – a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *Journal of General Virology*, 99(8), 970-988. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001103>

- Ludwig-Begall, L. F., Mauroy, A., & Thiry, E. (2021). Noroviruses—The State of the Art, Nearly Fifty Years after Their Initial Discovery. *Viruses*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v13081541>
- Lun, J. H., Hewitt, J., Sitabkhan, A., Eden, J.-S., Enosi Tuipulotu, D., Netzler, N. E., Morrell, L., Merif, J., Jones, R., Huang, B., Warrilow, D., Ressler, K.-A., Ferson, M. J., Dwyer, D. E., Kok, J., Rawlinson, W. D., Deere, D., Crosbie, N. D., & White, P. A. (2018). Emerging recombinant noroviruses identified by clinical and waste water screening. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0047-8>
- Markt, R., Stillebacher, F., Nägele, F., Kammerer, A., Peer, N., Payr, M., Scheffknecht, C., Dria, S., Draxl-Weiskopf, S., Mayr, M., Rauch, W., Kreuzinger, N., Rainer, L., Bachner, F., Zuba, M., Ostermann, H., Lackner, N., Insam, H., & Wagner, A. O. (2023). Expanding the Pathogen Panel in Wastewater Epidemiology to Influenza and Norovirus. *Viruses*, 15(2), 263. <https://doi.org/10.3390/v15020263>
- Marsh, Z., Shah, M. P., Wikswø, M. E., Barclay, L., Kisselburgh, H., Kambhampati, A., Cannon, J. L., Parashar, U. D., Vinjé, J., & Hall, A. J. (2018). Epidemiology of Foodborne Norovirus Outbreaks – United States, 2009–2015. *Food Safety*, 6(2), 58-66. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2017028>
- Marshall, J. A., & Bruggink, L. D. (2011). The Dynamics of Norovirus Outbreak Epidemics: Recent Insights. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(4), 1141-1149. <https://doi.org/10.3390/ijerph8041141>
- Ministerio de Salud Pública, Departamento de Vigilancia en SaludDivisión Epidemiología, & División Epidemiología. (2015). Guía Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria.
- Netzler, N. E., Enosi Tuipulotu, D., & White, P. A. (2019). Norovirus antivirals: Where are we now? *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 860-886. <https://doi.org/10.1002/med.21545>

- Newman, K. L., Moe, C. L., Kirby, A. E., Flanders, W. D., Parkos, C. A., & Leon, J. S. (2015). Human norovirus infection and the acute serum cytokine response. *Clinical and Experimental Immunology*, 182(2), 195-203. <https://doi.org/10.1111/cei.12681>
- Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., & Lindgren, P.-E. (2009). Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research*, 43(4), 1117-1125. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.053>
- O'Brien, E., & Xagorarakis, I. (2019). A water-focused one-health approach for early detection and prevention of viral outbreaks. *One Health*, 7, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100094>
- Parra, G. I. (2019). Emergence of norovirus strains: A tale of two genes | *Virus Evolution* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/ve/article/5/2/vez048/5639700>
- Parra, G. I., Tohma, K., Ford-Siltz, L. A., Eguino, P., Kendra, J. A., Pilewski, K. A., & Gao, Y. (2023). Minimal Antigenic Evolution after a Decade of Norovirus GII.4 Sydney_2012 Circulation in Humans. *Journal of Virology*, 97(2), e01716-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01716-22>
- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., & 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>
- Philipson, L., Albertsson, P. Å., & Frick, G. (1960). The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. *Virology*, 11(3), 553-571. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90100-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90100-8)
- Plaza-Garrido, A., Ampuero, M., Gaggero, A., & Villamar-Ayala, C. A. (2023). Norovirus, Hepatitis A and SARS-CoV-2 surveillance within Chilean rural wastewater treatment plants based on different biological treatment typologies. *The Science of the Total Environment*, 863, 160685. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160685>

- Pogan, R., Dülfer, J., & Uetrecht, C. (2018). Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology*, 31, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.05.003>
- Pringle, K., Lopman, B., Vega, E., Vinje, J., Parashar, U. D., & Hall, A. J. (2015). Noroviruses: Epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiology*, 10(1), 53-67. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.102>
- Sakon, N., Yamazaki, K., Nakata, K., Kanbayashi, D., Yoda, T., Mantani, M., Kase, T., Takahashi, K., & Komano, J. (2015). Impact of Genotype-Specific Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-Year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases*, 211(6), 879-888. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu496>
- Santiana, M., Ghosh, S., Ho, B. A., Rajasekaran, V., Du, W.-L., Mutsafi, Y., De Jesús-Díaz, D. A., Sosnovtsev, S. V., Levenson, E. A., Parra, G. I., Takvorian, P. M., Cali, A., Bleck, C., Vlasova, A. N., Saif, L. J., Patton, J. T., Lopalco, P., Corcelli, A., Green, K. Y., & Altan-Bonnet, N. (2018). Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host & Microbe*, 24(2), 208-220.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.006>
- Sistema de Saneamiento. (2014, mayo 14). Intendencia de Montevideo. <https://montevideo.gub.uy/areas-tematicas/ambiente/saneamiento/sistema-de-saneamiento>
- Teixeira, D. M., Hernandez, J. M., Silva, L. D., Oliveira, D. de S., Spada, P. K. de P., Gurjão, T. C. M., Mascarenhas, J. D. P., Linhares, A. C., Morais, L. L. C. de S., & Gabbay, Y. B. (2016). Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 101-104. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9220-6>
- Teunis, P. F. M., Sukhrie, F. H. A., Vennema, H., Bogerman, J., Beersma, M. F. C., & Koopmans, M. P. G. (2015). Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiology & Infection*, 143(8), 1710-1717. <https://doi.org/10.1017/S095026881400274X>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tohma, K., Kulka, M., Coughlan, S., Green, K. Y., & Parra, G. I. (2020). Genomic Analyses of Human Sapoviruses Detected over a 40-Year Period Reveal Disparate Patterns of Evolution among Genotypes and Genome Regions. *Viruses*, 12(5), 516. <https://doi.org/10.3390/v12050516>
- Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R. C., Fullman, N., Thompson, R. L., Abajobir, A., Ahmed, M., Alemayohu, M. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Antonio, C. A., Asayesh, H., Avokpaho, E., Awasthi, A., Bacha, U., Barac, A., ... Mokdad, A. H. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(9), 909-948. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)
- Umair, M., Rehman, Z., Haider, S. A., Usman, M., Rana, M. S., Ikram, A., & Salman, M. (2023). First report of coinfection and whole-genome sequencing of norovirus and sapovirus in an acute gastroenteritis patient from Pakistan. *Journal of Medical Virology*, 95(2), e28458. <https://doi.org/10.1002/jmv.28458>
- Vakulenko, Y. A., Orlov, A. V., & Lukashev, A. N. (2023). Patterns and Temporal Dynamics of Natural Recombination in Noroviruses. *Viruses*, 15(2), 372. <https://doi.org/10.3390/v15020372>
- Victoria, M., Gamazo, P., Salvo, M., Colina, R., Tort, F., Mir Da Silva, D., Pereira, M., & Osorio, N. (2021). Informe final publicable de proyecto: Diversidad genética de los virus gastroentéricos en aguas residuales y superficiales en la cuenca del Río Uruguay.
- Victoria, M., Tort, L. F. L., Lizasoain, A., García, M., Castells, M., Berois, M., Divizia, M., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., Cristina, J., & Colina, R. (2016). Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement

along time. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1427-1435.
<https://doi.org/10.1111/jam.13058>

Villabruna, N., Koopmans, M. P. G., & de Graaf, M. (2019). Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses*, 11(5), 478. <https://doi.org/10.3390/v11050478>

Vinje, J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373-381. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>

Vinje, J., Hamidjaja, R. A., & Sobsey, M. D. (2004). Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 109-117.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.001>

Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., Lee, W. L., Armas, F., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, C., Poyet, M., Moniz, K., Washburne, A. D., Erickson, T. B., Chai, P. R., Thompson, J., & Alm, E. J. (2020). SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. *mSystems*, 5(4), 10.1128/msystems.00614-20.
<https://doi.org/10.1128/msystems.00614-20>

Wu, Z., Yang, L., Ren, X., He, G., Zhang, J., Yang, J., Qian, Z., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Du, J., Yang, F., Zhang, S., & Jin, Q. (2016). Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *The ISME Journal*, 10(3), 609-620. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.138>

Yu, J., Liang, Z., Guo, K., Sun, X., Zhang, Q., Dong, Y., & Duan, Z. (2020). Intra-Host Evolution of Norovirus GII.4 in a Chronic Infected Patient With Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00375>

Zhu, S., Regev, D., Watanabe, M., Hickman, D., Moussatche, N., Jesus, D. M., Kahan, S. M., Napthine, S., Brierley, I., Hunter, R. N., Devabhaktuni, D., Jones, M. K., & Karst, S. M. (2013). Identification of Immune and Viral Correlates of Norovirus Protective Immunity through

Comparative Study of Intra-Cluster Norovirus Strains. PLoS Pathogens, 9(9), e1003592.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003592>

APÉNDICE

AP.1 Muestras Clínicas

Fecha de Muestreo Clínicas	Código de Muestra	Extracción RNA	Fecha Extracción RNA	Nueva Nomenclatura
Muestra Archivo 30/12/09	SCA22/01	SCA RNA 22/01Kit SCA RNA 22/01Trizol	27/9/2022 18/11/2022	Hu/NV/Uru5609
Muestra Archivo 22/12/09	SCA22/02	SCA RNA 22/02Kit	14/3/2023	Hu/NV/Uru4109
Muestra Archivo 17/12/09	SCA22/03	SCA RNA 22/03Kit	14/3/2023	Hu/NV/Uru3809
Muestra Archivo 21/09/09	SCA22/04	SCA RNA 22/04Kit	14/3/2023	Hu/NV/Uru0709
22/03/23	SCCS 23/01	SCCS RNA 23/01	29/3/2023	CS23_2203CP
8/05/23	SCCS 23/02	SCCS RNA 23/02	29/5/2023 30/5/2023	CS23_0805HM
8/06/23	SCCS 23/03	SCCS RNA 23/03	9/6/2023	CS23_0806CP

AP.2 Sitios de muestreo de aguas residuales

Estación de Bombeo Cumparsita (EC)

Es la estación que bombea las aguas residuales provenientes del sistema Paraguay y Ciudad Vieja hasta la estación de Punta Carretas. Es decir que abarca, Palermo, Barrio Sur, Centro, Cordón, Aguada, Reducto, Villa Muñoz y Jacinto Vera, por otro lado, la Ciudad Vieja. Esta estación cuenta con limpieza automatizada y un sistema dividido de aguas residuales y pluviales al igual que el resto del sistema de Saneamiento (*Sistema de Saneamiento*, 2014).

Estación Bombeo Malvín (EM)

Estación ubicada frente a la calle Colombes, donde llegan aguas de bombeo de Punta Gorda y estiaje de Arroyo Malvín. Por gravedad escurren hasta Punta Carretas (*Sistema de Saneamiento*, 2014).

Estación Bombeo Buceo (EB)

Ubicada en la explanada frente al Puerto del Buceo. Recoge aguas de una zona baja de Pocito que no puede conectarse por gravedad al interceptor costero, por lo que es bombeada desde la estación Buceo (*Sistema de Saneamiento*, 2014).

Planta Pre-Tratamiento Punta Carretas (PPC)

Este sitio de muestreo se encuentra en una instalación de tratamiento de aguas residuales y se divide en tres áreas principales: la Planta de Pre-Tratamiento, la Estación de Bombeo y el Emisor Subacuático.

La Planta de Pre-Tratamiento se ubica aguas arriba de la Estación de Bombeo y tiene como función retener sólidos gruesos, arena y material flotante del agua entrante. Luego, se eliminan las arenas y flotantes en piletas desarenadoras-desengrasadoras, (sitio donde se toma la muestra). La estación de bombeo recoge el líquido tratado de la Planta de Pre-Tratamiento y lo impulsa hacia una cámara que supera el nivel del Río de la Plata, para luego ser transportado por el Emisor Subacuático, una tubería que se extiende en dirección nort-sur y tiene una longitud de 2322 metros para dar liberación de estas aguas en el Río de la Plata (*Sistema de Saneamiento*, 2014).

AP.3 Muestras Ambientales

Fecha Muestreo 2023	Concentrado code	Fecha de concentrado	Extracción RNA Code	Fecha Extracción RNA	Nueva Nomenclatura
10-Ene	COSC 23/01 PC	14/2/2023	SCWW RNA 23/01 PC	28/3/2023	WW23_1001PPC
10-Ene	COSC 23/01 BLC	14/2/2023	SCWW RNA 23/01 BLC	28/3/2023	WW23_1001EC
10-Ene	COSC 23/01 BB	14/2/2023	SCWW RNA 23/02 BB	28/3/2023	WW23_1001EB
10-Ene	COSC 23/01 BM	14/2/2023	SCWW RNA 23/01 BM	28/3/2023	WW23_1001EM
31-Ene	COSC 23/02 PC	27/2/2023	SCWW RNA 23/02 PC	28/3/2023	WW23_3101PPC
31-Ene	COSC 23/02 BLC	27/2/2023	SCWW RNA 23/02 BLC	28/3/2023	WW23_3101EC
31-Ene	COSC 23/02 BB	27/2/2023	SCWW RNA 23/02 BB	28/3/2023	WW23_3101EB
31-Ene	COSC 23/02 BM	27/2/2023	SCWW RNA 23/02 BM	28/3/2023	WW23_3101EM
22-Feb	COSC 23/03 PC	22/2/2023	SCWW RNA 23/03 PC	13/4/2023	WW23_2202PPC
22-Feb	COSC 23/03 BLC	22/2/2023	SCWW RNA 23/03 BLC	13/4/2023	WW23_2202EC
22-Feb	COSC 23/03 BB	22/2/2023	SCWW RNA 23/03 BB	13/4/2023	WW23_2202EB
22-Feb	COSC 23/03 BM	22/2/2023	SCWW RNA 23/03 BM	13/4/2023	WW23_2202EM
14-Mar	COSC 23/04 PC	14/3/2023	SCWW RNA 23/04 PC	19/4/2023	WW23_1403PPC
14-Mar	COSC 23/04 BLC	14/3/2023	SCWW RNA 23/04 BLC	19/4/2023	WW23_1403EC
14-Mar	COSC 23/04 BB	14/3/2023	SCWW RNA 23/04 BB	19/4/2023	WW23_1403EB
14-Mar	COSC 23/04 BM	14/3/2023	SCWW RNA 23/04 BM	19/4/2023	WW23_1403EM
12-Abr	COSC 23/05 PC	12/4/2023	SCWW RNA 23/05 PC	20/4/2023	WW23_1204PPC
12-Abr	COSC 23/05 BLC	12/4/2023	SCWW RNA 23/05 BLC	20/4/2023	WW23_1204EC
12-Abr	COSC 23/05 BB	12/4/2023	SCWW RNA 23/05 BB	20/4/2023	WW23_1204EB

12-Abr	COSC 23/05 BM	12/4/2023	SCWW RNA 23/05 BM	20/4/2023	WW23_1204EM
3-May	COSC 23/06 PC	3/5/2023	SCWW RNA 23/06 PC	8/5/2023	WW23_0305PPC
3-May	COSC 23/06 BLC	3/5/2023	SCWW RNA 23/06 BLC	8/5/2023	WW23_0305EC
3-May	COSC 23/06 BB	3/5/2023	SCWW RNA 23/06 BB	8/5/2023	WW23_0305EB
3-May	COSC 23/06 BM	3/5/2023	SCWW RNA 23/06 BM	8/5/2023	WW23_0305EM
24-May	COSC 23/07 PC	24/5/2023	SCWW RNA 23/07 PC	25/5/2023	WW23_2405PPC
24-May	COSC 23/07 BLC	24/5/2023	SCWW RNA 23/07 BLC	25/5/2023	WW23_2405EC
24-May	COSC 23/07 BB	24/5/2023	SCWW RNA 23/07 BB	25/5/2023	WW23_2405EB
24-May	COSC 23/07 BM	24/5/2023	SCWW RNA 23/07 BM	25/5/2023	WW23_2405EM
14-Jun	COSC 23/08 PC	14/6/2023 15/6/2023	SCWW RNA 23/08 PC	15/6/2023	WW23_1406PPC
14-Jun	COSC 23/08 BLC	14/6/2023 15/6/2023	SCWW RNA 23/08 BLC	15/6/2023	WW23_1406EC
14-Jun	COSC 23/08 BB	14/6/2023 15/6/2023	SCWW RNA 23/08 BB	15/6/2023	WW23_1406EB
14-Jun	COSC 23/08 BM	14/6/2023 15/6/2023	SCWW RNA 23/08 BM	15/6/2023	WW23_1406EM
28-Jun	COSC 23/09 PC	28/6/2023	SCWW RNA 23/09 PC	28/6/2023	WW23_2806PPC
28-Jun	COSC 23/09 BLC	28/6/2023	SCWW RNA 23/09 BLC	28/6/2023	WW23_2806EC
28-Jun	COSC 23/09 BB	28/6/2023	SCWW RNA 23/09 BB	28/6/2023	WW23_2806EB
28-Jun	COSC 23/09 BM	28/6/2023	SCWW RNA 23/09 BM	28/6/2023	WW23_2806EM
19-Jul	COSC 23/10 PC	19/7/2023	SCWW RNA 23/10 PC	20/7/2023	WW23_1907PPC
19-Jul	COSC 23/10 BLC	19/7/2023	SCWW RNA 23/10 BLC	20/7/2023	WW23_1907EC
19-Jul	COSC 23/10 BB	19/7/2023	SCWW RNA 23/10 BB	20/7/2023	WW23_1907EB
19-Jul	COSC 23/10 BM	19/7/2023	SCWW RNA 23/10 BM	20/7/2023	WW23_1907EM

ANEXO

A.1 Tabla de secuencias utilizadas en análisis filogenético

Genogrupo	Número de acceso al GenBank	Largo Genoma	Host	País
GI.P1	EU085529	3081 pb	Homo sapiens	Sweden
GI.P2	L07418	7708 pb	Homo sapiens	UK
GI.P3	KJ196292	7745 pb	Homo sapiens	Japan
GI.P4	GQ856475	3119 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GI.P5	KJ402295	3108 pb	Homo sapiens	Hungary
GI.P6	KP027330	3013 pb	Homo sapiens	Taiwan
GI.P7	JN603251	1080 pb	Homo sapiens	Sweden
GI.P8	AB290150	1098 pb	Homo sapiens	India:Kolkata
GI.P9	EF529737	1082 pb	Homo sapiens	France
GI.P10	GQ856473	3173 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GI.P11	GQ856464	3109 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GI.P12	AB039774	7700 pb		Tokyo 208-0011, Japan
GI.P13	GQ856471	3132 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GI.P14	KM289169	2334 pb	Homo sapiens	Germany
GII.P1	U07611	7513 pb	Homo sapiens	Hawaii
GII.P2	X81879	3435 pb		UK
GII.P3	AB039782	7541 pb		Japan
GII.P4	JN595867	7559 pb	Homo sapiens	USA
GII.P4	AY587983	7558 pb		UK
GII.P4	DQ078829	3133 pb		Australia
GII.P5	KJ196288	7512 pb	Homo sapiens	Japan
GII.P6	GQ856465	3237 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GII.P7	AB258331	1552 pb	Homo sapiens	Japan
GII.P8	JX846926	4915 pb	Homo sapiens	USA: District of Columbia
GII.P11	AB126320	7537 pb	swine	Japan: Shizuoka
GII.P12	AB354299	1067 pb	Homo sapiens	Japan:Hiroshima
GII.P13	EF529741	1361 pb	Homo sapiens	France
GII.P15	GQ856474	3249 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GII.P16	GQ856476	3246 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GII.P17	LC037415	7555 pb	Homo sapiens	Japan: Kanagawa, Kawasaki City
GII.P18	AY823305	7612 pb	swine	USA
GII.P20	EU275779	1000 pb	Homo sapiens	Sweden
GII.P21	GQ856468	3174 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GII.P22	AB083780	7560 pb	Homo sapiens	Japan: Akita, Yuri
GII.P23	MG551869	7307 pb	Homo sapiens	Guatemala
GII.P24	MG495084	7249 pb	Homo sapiens	USA
GII.P25	MG495083	7200 pb	Homo sapiens	Bangladesh
GII.P26	KU306738	7233 pb	Homo sapiens	Nicaragua
GII.P27	MG495078	7237 pb	Homo sapiens	Peru
GII.P28	KJ196291	7543 pb	Homo sapiens	Japan

GII.P29	AF190817	3312 pb	Homo sapiens	Mendoza,Argentina
GII.P30	JX846925	7492 pb	Homo sapiens	Malaysia: Kuala Lumpur
GII.P31	AB434770	2408 pb	Homo sapiens	Japan:Osaka
GII.P32	MF405169	7536 pb	Homo sapiens	USA
GII.P33	JN797508	3317 pb	Homo sapiens	USA
GII.P34	KF730316	1004 pb	Homo sapiens	Japan
GII.P35	KC576911	5293 pb	Homo sapiens	Central African Republic: Bangui
GII.P36	AB684664	1064 pb	Homo sapiens	Japan:Tokyo
GII.P37	KJ194507	6326 pb	Homo sapiens	Netherlands
GII.P38	GQ856469	3061 pb	Homo sapiens	China: Beijing
GII.P39	FJ537138	7580 pb	Homo sapiens	USA
GII.P40	DQ366347	7558 pb	Homo sapiens	Japan
GII.P41	DQ379714	3564 pb	Homo sapiens	Australia
GIII.P1	AJ011099	7338 pb	Bovine	Germany
GIII.P2	AF097917	7311 pb	Bovine	UK
GIV.P1	FM865412	2966 pb	Homo sapiens	Italy
GV.P2	JX486101	7528 pb	Rattus norvegicus	Hong Kong
GVI.P1	EF450827	3389 pb	Lion	Italy
GVI.P2	GQ443611	3357 pb	Dog	Portugal
GVII.P1	FJ692500	7637 pb	Canis lupus familiaris	Hong Kong
GX.P1	KJ790198	6582 pb	Rhinolophus sinicus (Bat)	China
GNA1.P1	KP987888	6291 pb	Phocoena phocoena	Netherlands
GNA2.P1	MG572716	7900 pb	Zalophus californianus (California sea lion)	Hong Kong

A.2.1 Tabla adaptada de resultados de Alberti 2012

Fecha	Lugar	GI	GII
Ene-12	PPT	0	1
	VLC	0	1
	VB	0	0
	VMal	0	0
Feb-12	PPT	0	0
	VLC	1	0
	VB	-	-
	VMal	-	-
Mar-12	PPT	0	0
	VLC	0	0
	VB	0	0
	VMal	0	0
Abr-12	PPT	0	1
	VLC	0	1
	VB	0	0
	VMal		
May-12	PPT	0	1
	VLC	0	1
	VB	0	0
	VMal	0	0
Jun-12	PPT	0	1
	VLC	0	0
	VB	0	0
	VMal	0	0
TOTAL		1	7

Tabla adaptada de los resultados de Alberti (2012). Se observan las 6 instancias de muestreo de enero a junio, con los respectivos valores de detección de NoV en los diferentes sitios de muestreo. **PPT**: Planta de pretratamiento de Punta Carretas. **VLC**: Vertedero La Cumparsita. **VB**: Vertedero Buceo. **VMal**: Vertedero Malvin.

A.2.2 Gráficas adaptadas de los resultados de Alberti 2012

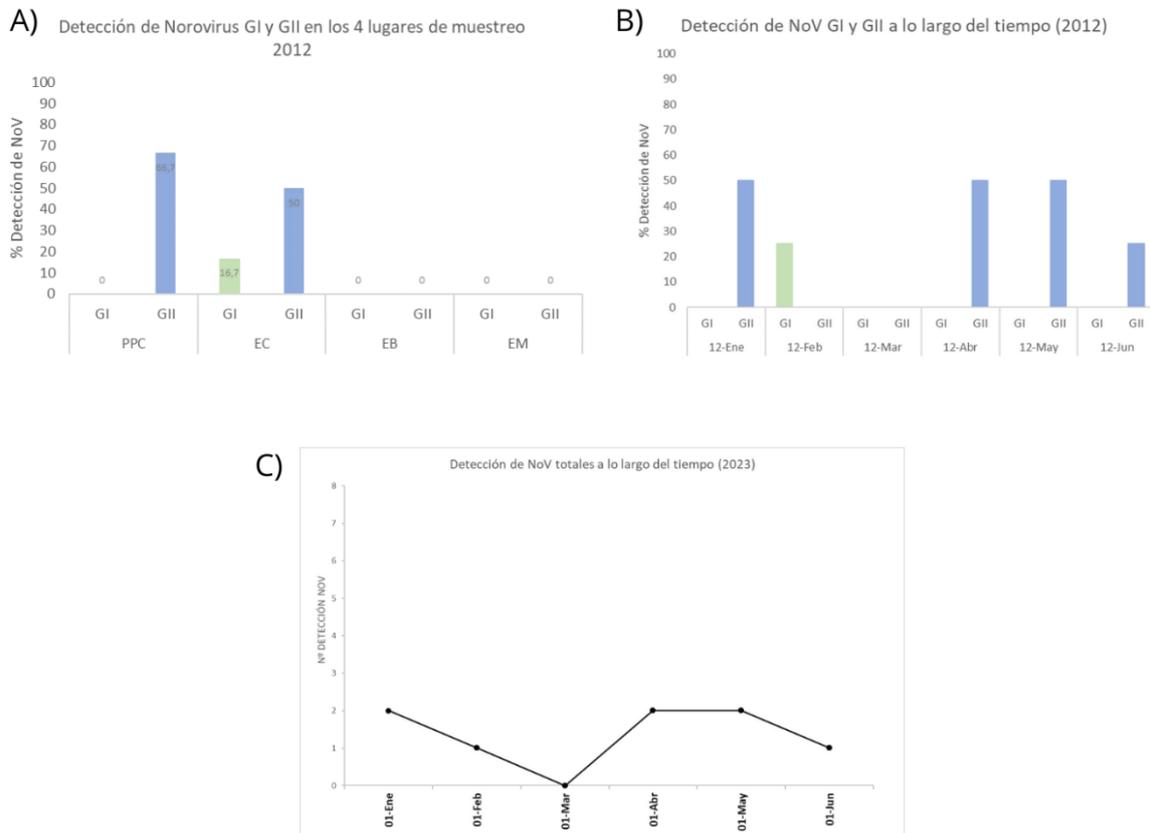


Figura A2 – Distribución de Norovirus en aguas residuales Alberti 2012. **A)** Gráfico de la detección NoV genogrupos GI y GII asociados a los diferentes sitios de muestreo, Planta Pre-tratamiento Punta Carretas, Estación Bombeo La Cumparsita, Estación Bombeo Buceo, Estación Bombeo Malvín. **B)** Detección de ambos genogrupos por muestreo a lo largo de los meses de enero a julio. **C)** Detección de NoV totales a lo largo del tiempo de muestreo enero – julio.